

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO EM FISIOTERAPIA

JOÃO LUIZ QUAGLIOTTI DURIGAN

**ESTUDO MORFOMÉTRICO DO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS SUBMETIDOS
À IMOBILIZAÇÃO ASSOCIADA À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
NEUROMUSCULAR**

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Ozores Polacow

Piracicaba – SP

2006

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO EM FISIOTERAPIA

JOÃO LUIZ QUAGLIOTTI DURIGAN

**ESTUDO MORFOMÉTRICO DO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS SUBMETIDOS
À IMOBILIZAÇÃO ASSOCIADA À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
NEUROMUSCULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Fisioterapia - da Universidade Metodista de Piracicaba como requisito para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia.

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Ozores Polacow

Piracicaba – SP

2006

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

BANCA EXAMINADORA :

Dr^a. Maria Luiza Ozores Polacow – Professora orientadora

Dr. Pedro Duarte Novaes – Professor examinador -UNICAMP

Dr. Carlos Alberto da Silva - Professor examinador - UNIMEP

SUPLENTES:

Dr^a. Tânia de Fátima Salvini – Professora suplente - UFSCar

Dr^a. Viviane Balisardo Minamoto – Professora suplente - UNIMEP

*"I Keep six honest serving men,
(They taught me all I Knew,)
Their names are What, Why, When,
And How, Where and Who"*

Kipling (The Elephant's Child)

DEDICATÓRIA

A Deus pela minha vida e por sempre estar guiando meus passos.

Aos meus pais, Maria Ivone Quaglioti Durigan e Victório Durigan que me incentivaram e auxiliaram em todos os momentos, e principalmente pela oportunidade que me proporcionaram na realização desse sonho.

À minha namorada Paula Lima Bosi, obrigado pela compreensão no tempo de ausência, pelo apoio incondicional nos momentos de dificuldade e por propiciar uma grande surpresa no ano de 2005.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À professora, orientadora, amiga, Dra. Maria Luíza Ozores Polacow, pela proposta e colaboração na realização desse trabalho, pelos conselhos e pela grande amizade. Mas principalmente, por abrir as “portas” para a realização desse grande sonho. Serei eternamente grato. Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Aos meus grandes e velhos amigos pela amizade incondicional, pois sempre, sabia a quem confiar.

À amiga Karina Maria Cancellero, pela grande ajuda no período experimental e principalmente pelo incentivo nos momentos difíceis. Admiro a sua dedicação aos seus amigos. Parabéns!

Ao professor e grande amigo Dr. Carlos Alberto da Silva, pela grande ajuda, conselhos, incentivo, e principalmente por ter me ensinado que na relação aluno/professor, pode surgir uma grande amizade, e é assim que o considero, um grande amigo.

Ao professor Dr. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro, pelas oportunidades e por conduzir de forma brilhante a coordenação do curso.

À professora Dr. Maria Imaculada Montebelo pela ajuda prestada durante a análise estatística.

A todos os professores do programa de pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Aos colegas de pós-graduação pela agradável convivência.

Aos funcionários dos laboratórios de histologia e fisiologia: Maria Cristina de Almeida Prado Ribeiro, Sandra Helena Nazato Ubices, Patrícia Carla Paulino Belotto e Melissa Victo pela amizade e inestimável ajuda durante a fase experimental.

À secretária do programa de pós-graduação, Miriam, meu agradecimento pela ajuda e dedicação durante esses dois anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio do programa “PROSUP/CAPES”.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da imobilização articular por órtese de resina acrílica em posição neutra do tornozelo durante 3 períodos (3, 7 e 15 dias) no músculo sóleo de ratos associado ou não com estimulação elétrica neuromuscular (EE) ($f=10\text{Hz}$, $T=0,4\text{ms}$, $i=5\text{mA}$, 20 minutos, diariamente). Ratos *Wistar* foram divididos em 7 grupos ($n=5$): controle (C), imobilizados por 3 dias (I3), por 7 dias (I7), e 15 dias (I15), imobilizados 3 dias associado a estimulação elétrica por 3 dias (IEE3), 7 dias (IEE7) e 15 dias (IEE15). Os animais foram eutanasiados e o músculo sóleo foi dissecado, pesado e amostras da sua porção ventral foram tratadas para inclusão em parafina e cortes de $7\mu\text{m}$ foram coradas em Hematoxilina-Eosina (H:E). Foram obtidos a área das fibras e a densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular do músculo sóleo por meio de um analisador de imagens (Image Pró-plus 4.0), em ambas as patas: imobilizada e contralateral. Os dados foram analisados pela ANOVA seguido do teste de Tukey para a variável massa muscular, e pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Tukey para a área das fibras, bem como para a densidade do tecido conjuntivo ($p<0,05$). Com relação a massa muscular (mg), não houve diferença significativa no grupo I3 ($127,2\pm 13,59$) quando comparado ao grupo C ($124,6\pm 5,07$). Por outro lado, quando foi comparado os grupos I7 ($81\pm 5,09$) e I15 ($114,6\pm 6,42$), houve significativa ($p<0,05$) redução em relação ao controle. Os grupos IEE3 (I3: $127,2\pm 13,59$ e IEE3: $120,4\pm 18,63$), bem como o IEE7 (I7: $81\pm 5,09$ e IEE7: $80,8\pm 8,67$) não apresentaram diferenças significativas se comparados com os respectivos grupos imobilizados. Já, no grupo IEE15 ($138,6\pm 6,42$) ocorreu aumento significativo ($p<0,05$) da massa muscular em relação ao grupo I15 ($114,6\pm 6$). A imobilização também reduziu significativamente ($p<0,05$) a área das fibras (μm^2) do músculo sóleo em todos os grupos estudados (C: $2574,88\pm 560,22$, I3: $1778,51\pm 504,19$, I7: $1438,1\pm 352,20$ e I15: $1624,03\pm 413,52$). Já a EE promoveu aumento significativo ($p<0,05$) na área das fibras em todos os grupos se comparados com os respectivos grupos imobilizados (I3: $1778,51\pm 504,19$ e IEE3: $1925,07\pm 369,36$, I7: $1438,1\pm 325,20$ e IEE7: $1522,79\pm 313,96$, I15: $1624,03\pm 413,52$ e IEE15: $2027,06\pm 643,10$). Com relação à densidade do tecido conjuntivo (%), observou-se aumento significativo ($p<0,05$) em todos os grupos submetidos à imobilização se comparados ao grupo controle (C: $8,82\pm 3,55$, I3: $34,92\pm 10,17$, I7: $27,92\pm 5,36$ e I15: $23,07\pm 8,79$). Por outro lado, a EE reduziu de forma significativa ($p<0,05$) a densidade do tecido conjuntivo em todos os grupos quando comparados com os respectivos grupos imobilizados (I3: $34,92\pm 10,17$ e IEE3: $18,48\pm 5,72$, I7: $27,92\pm 5,36$ e IEE7: $20,21\pm 8,77$, I15: $23,07\pm 8,79$ e IEE15: $18,35\pm 5,96$). A EE minimizou a redução da área das fibras musculares, bem como o aumento da densidade do tecido conjuntivo no músculo sóleo submetido à imobilização em todos os grupos analisados.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of joint immobilization by acrylic resin cast in neutral position during 3 periods (3, 7 and 15 days) in the rats soleus muscle associated with neuromuscular electrical stimulation or not (EE) ($f=10\text{Hz}$, $T=0,4\text{ms}$, $i=5\text{mA}$, 20 minutes, daily). Male *Wistar* were divided in 7 groups ($n=5$): control (C), immobilized during 3 days (I3), 7 days (I7), and 15 days (I15), immobilized 3 days associated with electrical stimulation during 3 days (IEE3), 7 days (IEE7) and 15 days (IEE15). The animals were euthanased and the soleus muscle was dissected, weighed and sample of its ventral portion were treated for inclusion in paraffin and stained in Hematoxylin-Eosin (H:E). The results were obtained through of analyses of the muscular fiber area and the intramuscular connective tissue density of the soleus muscle by means of an image analyzer (Image Pró-plus 4,0), in both the hindlimb: immobilized and contralateral. The data were analyzed by ANOVA followed of the Tukey test for the muscle mass, and by Kruskal-Wallis test followed of the Tukey test for the muscular fiber area, as well as for the intramuscular connective tissue density ($p<0,05$). With relation to the muscular weight (mg), there wasn't significant difference in the I3 group ($127,2\pm 13,59$) when compared with C group ($124,6\pm 5,07$). On the other hand, when it was compared the groups I7 ($81\pm 5,09$) and I15 ($114,6\pm 6,42$), there was significant ($p<0,05$) reduction in relation to C group. The groups IEE3 (I3: $127,2\pm 13,59$ and IEE3: $120,4\pm 18,63$), as well as the IEE7 (I7: $81\pm 5,09$ and IEE7: $80,8\pm 8,67$) didn't present significant differences when compared with immobilized groups. Besides, in IEE15 group ($138,6\pm 6,42$) occurred significant ($p<0,05$) increase of the weight muscular in relation to the I15 group ($114,6\pm 6$). The immobilization also reduced significantly ($p<0,05$) the muscular fiber area (μm^2) of the soleus muscle in all studied groups (C: $2574,88\pm 560,22$, I3: $1778,51\pm 504,19$, I7: $1438,1\pm 352,20$ and I15: $1624,03\pm 413,52$). Besides, the EE promoted significant increase ($p<0,05$) in all the groups in muscular fiber area if compared with the respective immobilized groups (I3: $1778,51\pm 504,19$ and IEE3: $1925,07\pm 369,36$, I7: $1438,1\pm 325,20$ and IEE7: $1522,79\pm 313,96$, I15: $1624,03\pm 413,52$ and IEE15: $2027,06\pm 643,10$). With relation to intramuscular connective tissue density (%), it was observed significant increase ($p<0,05$) in all the groups submitted to immobilization if compared with the control group (C: $8,82\pm 3,55$, I3: $34,92\pm 10,17$, I7: $27,92\pm 5,36$ and I15: $23,07\pm 8,79$). On the other hand, the EE reduced significantly ($p<0,05$) the intramuscular connective tissue density in all the groups when compared with the respective immobilized groups (I3: $34,92\pm 10,17$ and IEE3: $18,48\pm 5,72$, I7: $27,92\pm 5,36$ and IEE7: $20,21\pm 8,77$, I15: $23,07\pm 8,79$ and IEE15: $18,35\pm 5,96$). The EE minimized the reduction of the muscular fiber area, as well as the increase of intramuscular connective tissue density in the soleus muscle submitted to immobilization in all the analyzed groups.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Vista lateral (A) e anterior (B) da órtese composta pelo modelo de resina acrílica (1), rotadores laterais (2) e cinta abdominal (3).....46
- Figura 2. Órtese adaptada no membro posterior do animal, mantendo o ângulo de 90° da articulação do tornozelo.....46
- Figura 3. Vista superior do animal com a órtese adaptada no membro posterior esquerdo.....47
- Figura 4. Órtese adaptada no membro posterior do animal, sem interferir na deambulação, permitindo a descarga de peso no membro imobilizado.....47
- Figura 5. Posicionamento dos eletrodos para a aplicação da estimulação elétrica neuromuscular no membro posterior imobilizado, sendo um eletrodo na região inguinal (eletrodo 1) e outro na porção posterior da perna, acoplado dentro da órtese (eletrodo 2).....48
- Figura 6. Equipamento Dualpex 961 (Quark®) utilizado para a realização da estimulação elétrica neuromuscular.....49
- Figura 7 - Média \pm dpm da massa do músculo sóleo (mg) dos grupos controle (C), imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado por 7 dias (I7) e imobilizado por 15 dias (I15). n:5, $p < 0,05$,* comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos imobilizados.....55
- Figura 8 - Média \pm dpm da massa do músculo sóleo (mg) dos grupos imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 3 dias (IEE3), imobilizado por 7 dias (I7), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 7 dias (IEE7), imobilizado por 15 dias (I15) e

imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 15 dias (IEE15). n:5, p<0,05, * comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos.....56

Figura 9 - Média \pm dpm da massa do músculo sóleo (mg) dos grupos controle (C), pata contralateral 3 dias (CC3), pata contralateral 7 dias (CC7), pata contralateral 15 dias (CC15). n:5, p<0,05, *comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos contralaterais.....57

Figura 10 - Média \pm dpm da área do músculo sóleo (μm^2) dos grupos controle (C), imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado por 7 dias (I7) e imobilizado por 15 dias (I15). n:5, p<0,05,* comparado ao grupo controle, # comparado as outros grupos imobilizados.....59

Figura 11 - Média \pm dpm da área do músculo sóleo (μm^2) dos grupos imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 3 dias (IEE 3), imobilizado por 7 dias (I7), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 7 dias (IEE 7), imobilizado por 15 dias (I15) e imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 15 dias (IEE 15). n:5. p<0,05,* comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos imobilizados tratados com estimulação elétrica, † comparado aos respectivo grupo imobilizado.....60

Figura 12 - Média \pm dpm da área do músculo sóleo (μm^2) dos grupos controle (C), pata contralateral 3 dias (CC3), pata contralateral 7 dias (CC7), pata contralateral 15 dias (CC15). n:5, p<0,05,* comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos contralaterais.....61

Figura 13 - Média \pm dpm da densidade de área (%) do tecido conjuntivo do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado por 7 dias (I7) e imobilizado por 15 dias (I15). n:5, p<0,05,*

comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos imobilizados.....62

Figura 14 - Média \pm dpm da densidade de área (%) do tecido conjuntivo do músculo sóleo dos grupos imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 3 dias (IEE 3), imobilizado por 7 dias (I7), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 7 dias (IEE 7), imobilizado por 15 dias (I15) e imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 15 dias (IEE 15). n:5, $p < 0,05$, * comparado ao grupo controle, † comparado aos respectivo grupo imobilizado.....63

Figura 15 - Média \pm dpm da densidade de área (%) do tecido conjuntivo do músculo sóleo dos grupos controle (C), pata contralateral 3 dias (CC3), pata contralateral 7 dias (CC7), pata contralateral 15 dias (CC15) n: 5, * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos contralaterais.....64

Figura 16 - Fibras do músculo sóleo do grupo controle.....65

Figura 17 - Músculo sóleo imobilizado em posição neutra do tornozelo 3 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.....65

Figura 18 - Músculo sóleo imobilizado e tratado com EE por 3 dias. Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco) e redução do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo imobilizado durante 3 dias.....66

Figura 19 - Músculo sóleo imobilizado em posição neutra do tornozelo 7 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e

aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.....66

Figura 20 Músculo sóleo imobilizado e tratado com EE por 7 dias. Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco) e redução do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo imobilizado durante 7 dias.....67

Figura 21 - Músculo sóleo imobilizado em posição neutra do tornozelo 15 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.....67

Figura 22 - Músculo sóleo imobilizado e tratado com EE por 15 dias. Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco) e redução do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo imobilizado durante 15 dias.....68

Figura 23 - Músculo sóleo da pata contralateral durante imobilização por 3 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.....68

Figura 24 - Músculo sóleo da pata contralateral durante imobilização por 7 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.....69

Figura 25 - Músculo sóleo da pata contralateral durante imobilização por 15 dias. Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco) em relação ao grupo controle.....69

Figura 26 - Média \pm dpm de campos observados em open field dos grupos controle (C), submetidos à imobilização (I), n=5,* p<0,05 comparado ao grupo imobilizado.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos grupos experimentais, n = 5.....	44
Tabela 2. Composição dos grupos experimentais, n = 5.....	45
Tabela 3. Valores de probabilidades (p), nível crítico descritivo para o teste de Tukey HSD (Statistica® 6.1) para a variável massa muscular.....	101
Tabela 4. Valores de probabilidades (p), nível crítico descritivo para o teste de Tukey HSD (Statistica® 6.1.) para a área das fibras do músculo sóleo.....	102
Tabela 5. Valores de probabilidades (p), nível crítico descritivo para o teste de Tukey HSD (Statistica® 6.1.) para a variável densidade de área do tecido conjuntivo.....	103
Tabela 6. Valores de probabilidades (p), nível crítico descritivo para o teste “t” de student (Statistica® 6.1) para a variável movimentação exploratória.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

α - Alfa

β – Beta

μm – Micrômetros

μm^2 – Micrômetros quadrados

μs – Micro segundo

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

cm^2 – Centímetros quadrados

GLUT1 – Transportador de glicose 1

GLUT4 – Transportador de glicose 4

Hz – Hertz

IR - Receptor de insulina

IRS-1 - Substrato 1 do receptor de insulina

mA – Miliampere

mg – Miligramas

ms – Milisegundo

p - Valores de probabilidades

PI3-K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PVC – Policloreto de vinila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.....	22
2.2 DESUSO MUSCULAR.....	25
2.3 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR.....	38
3. OBJETIVO.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 ANIMAIS	44
4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44
4.2.1 Análise histológica.....	44
4.2.2 Análise da movimentação exploratória.....	45
4.3. PROCEDIMENTOS.....	45
4.3.1 TÉCNICA DA CONFECÇÃO DA ÓRTESE.....	45
4.3.2 Imobilização	45
4.4 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR.....	47
4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	50
4.5.1 Processamento das amostras do tecido muscular.....	50
4.5.2 Análise da área das fibras musculares.....	50
4.5.3 Análise do tecido conjuntivo intramuscular.....	51
4.6 ANÁLISE DA MOVIMENTAÇÃO EXPLORÁTORIA.....	52
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5. RESULTADOS.....	54
5.1 MASSA MUSCULAR.....	54

5.2 ÁREA DAS FIBRAS MUSCULARES.....	58
5.3 DENSIDADE DO TECIDO CONJUNTIVO INTRAMUSCULAR.....	62
5.4 ANÁLISE DA MOVIMENTAÇÃO EXPLORÁTORIA.....	70
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
9. APÊNDICE.....	101

1. INTRODUÇÃO

Fraturas ósseas, rupturas ligamentares, lesões musculares, doenças degenerativas, bem como as articulares, podem exigir, após cirurgia ou tratamento conservador, imobilização dos membros, comumente realizada por meio da aplicação de aparelho gessado.

Diversos estudos têm demonstrado que o desuso muscular induz uma gama de efeitos deletérios, tais como a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, hipotrofia muscular, redução das reservas de glicogênio, da densidade dos capilares, dos sarcômeros em série, da força e resistência à fadiga (JÓZSA et al., 1990; REARDON et al., 2001).

Na literatura há diversos trabalhos abordando os modelos de desuso muscular, como a denervação, tenotomia, suspensão de membro, repouso prolongado em leito e imobilização articular (MUSACCHIA et al., 1988). Esses modelos de desuso se diferem quanto ao período, posição articular e material para a confecção. Com relação à posição da articulação do tornozelo, bastante estudada, podem ser encontrados trabalhos em flexão plantar ou em dorsiflexão para que os músculos sejam avaliados em posições de encurtamento, alongamento, ou ainda posição neutra. Porém, nos estudos que utilizaram a posição neutra de tornozelo, há concomitante imobilização das articulações do joelho e quadril.

Nesse estudo, foi utilizado o modelo da órtese de resina acrílica na posição neutra da articulação do tornozelo, porém mantendo as articulações do joelho e quadril livres, tornando assim mais próximo possível da realidade clínica, além de ser funcional ao animal. Esse modelo foi escolhido, devido a trabalhos

anteriores desse grupo de pesquisa demonstrarem a sua eficácia em mimetizar os efeitos deletérios no sistema músculo-esquelético promovidos por outros modelos de desuso. Além disso, o modelo de resina apresenta algumas vantagens se comparado com o modelo de gesso como o baixo custo, baixo peso, possibilidade de ser ajustado para o mesmo animal ou em outros com tamanho similar, além de permitir a deambulação (CANCELLIERO, 2004).

A estimulação elétrica neuromuscular foi utilizada, já que em trabalhos anteriores foi observado que este recurso melhorou o perfil energético muscular na condição de imobilização articular e reduziu a proliferação do tecido conjuntivo em animais submetidos à denervação (SILVA et al., 1999; CANCELLIERO et al., 2003; POLACOW et al., 2003; CANCELLIERO, 2004; FORTI et al., 2004; GUIRRO et al., 2004).

Vale destacar que neste trabalho o tratamento com a estimulação elétrica neuromuscular foi aplicado imediatamente após a imobilização, fato incomum na prática clínica fisioterapêutica.

Como em trabalhos anteriores desse grupo de pesquisa, foi explorado o perfil metabólico e mecânico da musculatura sob a condição de imobilização articular promovida pelo modelo de resina acrílica, nesse trabalho optou-se pela avaliação de parâmetros morfométricos, tais como a área das fibras musculares por meio de um analisador de imagem (Image Pró-Plus 4.0 – Media Cybernects) e a densidade do tecido conjuntivo intramuscular do músculo sóleo através da planimetria por contagem de pontos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

O tecido muscular, responsável pelos movimentos corporais, é constituído por células alongadas e que contém grande quantidade de filamentos citoplasmáticos, responsáveis pela contração. As células do tecido muscular são denominadas estriadas devido a presença de um arranjo de proteínas contráteis miofibrilares, os miofilamentos, que se repetem de forma regular (LIEBER, 2002).

Estas células são dispostas paralelamente entre si, com vários núcleos periféricos. Os elementos contráteis ocupam a maior parte celular, que tem uma relação muito ordenada e específica entre si, organização essa responsável pelas estriações transversais vistas nos cortes longitudinais das fibras musculares esqueléticas e que deram a origem da denominação músculo estriado. Estas células têm até 30 cm, com um diâmetro que varia de 10 a 100 μm , com origem embrionária da fusão de células alongadas, denominadas mioblastos. A área de secção transversa varia de acordo com o músculo e o animal. Para o músculo sóleo de ratos adultos, a literatura relata valores de referência variando de 2084 a 3500 μm^2 (DELP e DUAN, 1996; COUTINHO et al., 2002; GOMES et al., 2004).

A análise muscular por meio de microscopia eletrônica revela a presença de filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina dispostos longitudinalmente nas miofibrilas e organizados em uma disposição simétrica e

paralela. A maior parte das proteínas do músculo estriado, cerca de 55% são formadas por estes filamentos (HUXLEY, 2002).

As fibras musculares podem ser classificadas basicamente em tipo I ou II. As identificadas como do tipo I, ou fibras lentas, geram energia predominantemente por meio do sistema aeróbio, possuem numerosas mitocôndrias volumosas, grande quantidade de mioglobina, baixa atividade da miosina ATPase, menor capacidade de manipular o cálcio e velocidade de contração reduzida. As fibras do tipo II, ou fibras rápidas, possuem uma maior atividade da miosina ATPase, alta velocidade de liberação e captação de cálcio, baixo números de mitocôndria e mioglobina, gerando energia predominantemente através do sistema anaeróbio (ZIERATH e HAWLEY, 2004).

As fibras musculares estão organizadas em grupos de feixes denominados fascículos, que são externamente envolvidos por uma camada de tecido conjuntivo denominado epimísio. Do epimísio partem septos de tecido conjuntivo que se dirigem para o interior do músculo e separam os feixes, denominados de perimísio. Cada fibra muscular, por sua vez, é envolvida por uma camada muito fina constituída pela lâmina basal da fibra muscular e por fibras reticulares do endomísio (OKITA et al., 2004).

A função deste tecido conjuntivo é manter as fibras musculares unidas, conservando as suas propriedades físicas durante a contração e permitindo que a força gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro. Essa organização do tecido conjuntivo tem grande significado funcional porque na maioria das vezes as fibras não se estendem de uma extremidade a outra do músculo (JARVINEN et al., 2002).

O tecido conjuntivo ainda é responsável por fornecer suporte estrutural para as fibras musculares, vasos sanguíneos e nervos durante o crescimento no músculo normal e na regeneração após lesão (SAVOLAINEN et al., 1988), e também pelo comportamento elástico observado no tecido muscular esquelético (JÓZSA et al., 1988; OKITA et al., 2004).

Um componente importante do tecido conjuntivo é a matriz extracelular, sendo funcionalmente e estruturalmente especializada em áreas onde o músculo está em contato com o tendão ou nervo. Para Buck e Horowitz (1987) as proteínas da matriz extracelular fazem parte do mecanismo de sinalização que envolve a miogênese, pois fornecem substâncias que ligam e constróem as ligações necessárias para este processo. Sanes et al. (1994) corrobora esta idéia ao afirmar que as interações da matriz extracelular são cruciais para o processo de sinalização de células musculares, sendo que os principais complexos de proteínas que desempenham estas funções são: as integrinas e as glicoproteínas distrofinas.

Segundo Otey et al. (1990) no complexo associado à integrina, a actina do sarcômero terminal liga-se a determinadas moléculas do sarcolema, como por exemplo: α -actina, talina, vinculina, paxilina, tensina, que se ligam à sub-unidade específica do músculo ($\alpha 7 \beta 1$ integrina). Esta finalmente liga-se à matriz extracelular (colágeno e proteoglicanas) e glicoproteínas, como por exemplo, a laminina específica do músculo (merosina), lectina e fibronectina (BURKIN e KAUFMAN, 1999).

A laminina é um componente da membrana basal e estudos comprovam que ela promove a adesão, proliferação do mioblasto e formação do miotubo (FOSTER et al., 1987; KROLL et al., 1994). Já a fibronectina, que também

participa da adesão e proliferação do mioblasto, aparece inibindo a proliferação do miotubo (PODLESKI et al., 1979). A força de tensão gerada pela fibra muscular se dá por cadeias de moléculas específicas que conectam o miofilamento contrátil por meio do sarcolema com a matriz extracelular.

2.2 DESUSO MUSCULAR

A plasticidade das fibras musculares esqueléticas permite que estas sejam capazes de se adaptar deflagrando mudanças no seu tamanho ou na tipagem. Múltiplos estímulos podem promover estas mudanças, merecendo destaque os modelos de desuso muscular, alterações hormonais, nutrição, estimulação elétrica neuromuscular, entre outros (SALVINI, 2000).

Nesse contexto, vários modelos experimentais foram desenvolvidos para determinar as mudanças que ocorrem no músculo após um período de desuso, já que cada modelo possui características específicas. Além disso, a maioria dos experimentos foi realizado em animais, devido principalmente a questões éticas. Investigações em humanos, voluntários ou pacientes, poderiam somente fornecer medidas de trofismo muscular, força de um grupo de músculos, características de contração e, talvez, alguns parâmetros morfológicos e químicos obtidos por meio de biopsia muscular (APPELL, 1990).

Historicamente, técnicas não invasivas e invasivas, como a desnervação, tenotomia e fixação da articulação por meio de pinos, fornecem a base para o conhecimento das alterações provocadas pelo desuso muscular. A desnervação é

alcançada por meio de secção ou esmagamento do nervo, ou ainda por bloqueio químico, eliminando a comunicação do músculo com o nervo, impedindo a ocorrência de reflexos musculares (MUSACCHIA et al., 1988).

Esse modelo impede o suprimento de substâncias tróficas do nervo para o músculo, extingue a atividade elétrica e contrátil e causa degeneração do nervo. Desse modo, o músculo esquelético sofre rápida hipotrofia subsequente à diminuição da taxa de síntese e aumento da taxa de degradação das proteínas miofibrilares (MITCHELL e PAVLATH, 2001). Também são observadas modificações no tecido conjuntivo como as alterações fibróticas no endomísio e perimísio com conseqüente redução da elasticidade muscular (SALONEN et al., 1985).

Na tenotomia, a conexão músculo-osso é interrompida, ocasionando um encurtamento artificial do músculo, mostrando-se ser um modelo eficaz de desuso para promover alterações no sistema músculo-esquelético. Porém, os resultados não podem ser comparados com as alterações provocadas pela imobilização. Jakubiec-Puka et al. (1992) observaram redução de 50% da massa do músculo sóleo de ratos após 12 dias de tenotomia. Abrams et al. (2000), relataram que as alterações músculo-esqueléticas são mais evidentes na primeira semana no músculo extensor longo dos dedos de coelhos após tenotomia.

Alterações no tecido conjuntivo e na densidade de capilares também são referidas na literatura. Józsa et al. (1990) estudaram o efeito da tenotomia nos músculos sóleo e gastrocnêmico de ratos, e observaram que após 3 semanas ocorreu aumento significativo do tecido conjuntivo de aproximadamente 38% no músculo sóleo e de 24% no gastrocnêmico simultaneamente com a redução da densidade dos capilares mais evidente no músculo sóleo.

Os efeitos da imobilização por meio de técnicas não invasivas, como a suspensão do corpo, repouso prolongado em leito, órteses de gesso, de resina acrílica e de tecido de algodão têm sido estudados com mais frequência. Esta expansão nos estudos tem por objetivo determinar os mecanismos e tentar minimizar o quadro de atrofia muscular.

Musacchia et al. (1988), em uma revisão sobre atrofia muscular por desuso, comparou os diferentes modelos de animais e sua influência em relação aos aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e de força do músculo. Em todos os experimentos, a principal característica observada foi a atrofia muscular e diminuição da atividade contrátil do músculo. Verificou também, que a atrofia muscular é um processo complexo e diferenças significativas são encontradas como resultados de modelos utilizados para provocar o desuso.

A imobilização por gesso é amplamente descrita na literatura e apresenta como vantagem a manutenção de um comprimento muscular constante. Desse modo, permite uma melhor comparação entre os músculos estudados (HESLINGA et al., 1995). Esse modelo de imobilização diminui a ação de músculos considerados estabilizadores posturais. Neste sentido, espera-se que as fibras musculares do tipo I, que são estabilizadores posturais, sejam mais susceptíveis à atrofia do que as fibras do tipo II de contração rápida. (LIEBER et al., 1988).

No final da década de 70, um novo modelo de desuso muscular foi proposto, onde os animais eram mantidos em suspensão ou hipocinesia. A expansão nos estudos com esse modelo foi incentivada pela NASA (“National Aeronautics and Space Administration”) com objetivo de simular as condições que acontecem em vôos espaciais (MOREY et al., 1979). Embora o método produza

condições diferentes da imobilização, os animais podem realizar contrações dinâmicas, porém com carga mínima. Assim, os efeitos provocados nos músculos são semelhantes aos produzidos pela imobilização com gesso ou fixações articulares (FITTS et al., 1986).

Outro modelo de desuso descrito é o repouso prolongado no leito. Andersen et al. (1999), observaram pessoas saudáveis normais por um período de 5 semanas em repouso em leito e sugeriram que ocorre um aumento nas fibras musculares em um “estado transitório” de contração lenta do tipo I para o tipo IIa e IIx de contração mais rápida, junto com uma atrofia geral das fibras.

Em 2002, Coutinho et al. propuseram um dispositivo alternativo para imobilização de ratos que restringe os movimentos de quadril, joelho e tornozelo com objetivo de estudar os efeitos do desuso muscular. Para tanto, utilizaram malha de aço e algodão com algumas vantagens se comparado com o modelo de gesso como o baixo custo, baixo peso e a possibilidade de ser ajustado para o mesmo animal ou em outros com tamanho similar.

Outro modelo proposto pelo grupo de metabolismo muscular da Universidade Metodista de Piracicaba foi a órtese de resina acrílica que promove a imobilização da articulação do tornozelo tanto em posição de encurtamento como em posição neutra. Esse modelo apresenta algumas vantagens se comparado com o modelo de gesso como o baixo peso, possibilidade de ser ajustado para o mesmo animal, impossibilita o animal de retirar órtese, e permitir a deambulação. Alguns trabalhos deste grupo de pesquisa demonstraram que este modelo provocou redução da massa muscular, das reservas de glicogênio, bem como da força máxima necessária para a ruptura muscular (CANCELLIERO et al., 2003; CANCELLIERO, 2004; DIAS et al., 2004; PETERMANN et al., 2004;

CANCELLIERO et al., 2005; DELFINO et al., 2005; DIAS et al., 2005; SCHWARZENBECK et al., 2005).

Independentemente do modelo de desuso utilizado, há concordância entre os estudos de que a redução da massa muscular com ausência de descarga de peso é resultado de atrofia das fibras musculares esqueléticas e aumento da degradação protéica. Porém, os mecanismos desencadeadores celulares e moleculares que levam a essa perda ainda não estão bem definidos (LAWLER et al., 2003).

Além dos diversos modelos utilizados para o estudo do desuso muscular, outros fatores se diferenciam como o tipo de fibra muscular analisada, a posição articular, o material utilizado para a confecção do dispositivo, além do período.

Muitos estudos foram direcionados à avaliação das respostas do músculo esquelético quando imobilizados, no que tange ao tipo de fibras mais susceptíveis à atrofia. Entre os anos 70 e 80, os estudos eram contraditórios quanto ao tipo de fibras mais susceptíveis. Alguns autores descreveram as fibras brancas (tipo II) (JAFFE et al., 1978; MCDUGALL et al., 1980) e outros se referiram às fibras vermelhas (tipo I) (BOOTH e KELSO, 1973; BOOTH, 1977; BOOTH, 1987; LEIVSETH et al., 1987; SAVOLAINEN et al., 1988). No entanto, há trabalhos que não evidenciaram qualquer diferença na resposta dos diferentes tipos de fibras à atrofia (MACDOUGALL et al., 1977; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978).

Herbison et al. (1978), avaliaram em ratos os efeitos da imobilização nos músculos flexores plantares em posição neutra durante 6 meses, observaram redução da massa em todos os músculos e diminuição das proteínas miofibrilares. A atrofia das fibras musculares tipo I e II foi igual nos músculos sóleo e a do tipo II foi maior que o tipo I para o músculo plantar, sugerindo que o grau

de atrofia seja específico para o tipo de fibra e sua localização no músculo ou músculo diferentes.

Tem sido observado que as fibras musculares lentas (tipo I) possuem maior vulnerabilidade à atrofia do que as fibras musculares rápidas (tipo II), devido a diferenças no seu metabolismo, sendo que a imobilização parece ter efeitos diferentes na síntese protéica dos diferentes tipos de fibras musculares (HESLINGA et al., 1995). Nesse contexto, foi observado que as enzimas oxidativas respondem por meio da diminuição da sua atividade durante a imobilização, sugerindo que as fibras musculares que possuem metabolismo predominantemente oxidativo (tipo I), foram as mais susceptíveis à atrofia muscular (APPELL, 1990). Estudos como o de Herrera et al. (2001) que trabalharam com inatividade muscular em membros posteriores de ratos, observaram que o músculo sóleo atrofia mais que o extensor longo dos dedos, provavelmente devido a composição do tipo de fibra e pela função destes durante a condição normal de descarga de peso.

Além da susceptibilidade à atrofia inerente ao metabolismo das fibras tipo I, outro fator que determina essa condição são as características de fibras posturais. Nesse sentido, Ploug et al. (1995) relacionaram a maior susceptibilidade do sóleo à atrofia por inatividade devido ser um músculo postural e assim possuir uma atividade basal maior do que os não posturais. Mercier et al. (1999) também encontraram maior redução da massa no músculo sóleo de ratos jovens e idosos comparado ao extensor longo dos dedos submetidos à suspensão da pata posterior por 21 dias. Em estudo recente, foi observado que a imobilização por duas semanas além de promover a redução significativa (77,9%)

das fibras lentas (tipo I) possibilitou o aumento significativo das fibras musculares rápidas (II) quando comparado ao grupo controle (TANAKA et al., 2004).

Esses estudos estão de acordo com a afirmação de Lieber (2002), reforçando o que a literatura relata, de que os músculos considerados antigravitacionários, os uni-articulares e os que possuem maior proporção de fibras lentas são os mais vulneráveis à atrofia.

A posição da imobilização parece ser um fator determinante no desenvolvimento dos efeitos deletérios no sistema músculo-esquelético. Fournier et al. (1983) imobilizaram a articulação de tornozelo em posição encurtada, neutra e alongada e avaliaram os músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos. Os resultados mostram que os músculos imobilizados em posição encurtada e neutra diminuíram significativamente a massa, após 28 dias de imobilização, mas isto não aconteceu na imobilização em posição alongada. No músculo sóleo, ocorreu redução de 55% da massa em posição neutra e 77% em posição encurtada e no músculo gastrocnêmio a redução foi de 54% na posição neutra, e de 53% na encurtada se comparado com o grupo controle.

Savolainen et al. (1988), estudam os músculos gastrocnêmio, tibial anterior e sóleo de ratos submetidos à imobilização articular de tornozelo por aparelho gessado durante 7 e 21 dias em posição encurtada e alongada e em todos os músculos houve redução da massa muscular, maior na posição encurtada do que na alongada, em ambos os períodos avaliados.

Jarvinem et al. (1992) compararam as propriedades elásticas da unidade músculo-tendão de gastrocnêmio de ratos que tiveram seu membro posterior esquerdo imobilizado com aparelho gessado, mantendo o joelho em flexão e o tornozelo em extensão, ou vice-versa, utilizando o membro contralateral como

controle. A redução da massa foi maior nos imobilizados em posição encurtada. Concluíram que a imobilização da unidade músculo-tendão do gastrocnêmio em posição encurtada é seguida por atrofia mais acentuada e uma diminuição nas propriedades elásticas que a imobilização em posição alongada.

A posição da imobilização também influencia o comprimento muscular. Se o músculo for imobilizado em encurtamento, ocorre redução significativa do comprimento muscular por diminuição no número de sarcômeros em série (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1973; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; APPELL, 1986; WILLIAMS et al., 1988). Pelo contrário, se mantido numa posição de estiramento, ocorre aumento do seu tamanho por elevação do número de unidades sarcoméricas (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1973; WILLIAMS et al., 1988).

O número de sarcômeros é provavelmente ajustado de forma a que seja permitido um comprimento ótimo destas estruturas e, assim, a um “overlap” ideal dos filamentos para desenvolver tensão durante as contrações (HERRING et al., 1984).

Para Heslinga et al. (1995) a diminuição do número de sarcômeros em série depende do músculo avaliado. Os autores observaram os efeitos da imobilização em posição encurtada por aparelho gessado de ratos nos músculos sóleo e gastrocnêmio. Observaram redução no número de sarcômeros em série no músculo sóleo, mas o mesmo resultado não foi observado para o músculo gastrocnêmio.

Na mesma linha de pesquisa outros estudos foram realizados para observar o comportamento do tecido conjuntivo frente a diferentes posições articulares de imobilização. Foi observado que em apenas 2 dias após a imobilização em posição encurtada houve rápido aumento na quantidade de

tecido conjuntivo no perímio do músculo sóleo de ratos, porém em posição alongada, não foram observadas alterações (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984). Resultados semelhantes foram descritos por Józsa et al. (1988) que verificaram aumento na quantidade de tecido conjuntivo em todos os músculos imobilizados de ratos (tibial anterior, sóleo e gastrocnêmio), de forma mais pronunciada na posição encurtada do que a alongada.

Desse modo, esses estudos permitiram comprovar que o músculo em posição de encurtamento apresenta características como a redução da massa e do número de sarcômeros em série, já a imobilização em posição alongada leva a ganho da massa muscular, aumento da síntese protéica e adição de sarcômeros em série. Também é possível evidenciar que o aumento na densidade de tecido conjuntivo ocorre na posição de encurtamento muscular (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984; SAVOLAINEM et al., 1988; YANG et al., 1997). Porém, ainda não estava claro se essas modificações observadas no tecido conjuntivo estariam relacionadas somente com a posição de encurtamento do músculo ou com a diminuição da sua atividade contrátil.

Nesse sentido, Williams et al. (1988), promoveram imobilização por aparelho gessado no músculo sóleo de coelhos nas posições de encurtamento e alongamento associados com estimulação elétrica durante 7 dias. Os autores relataram redução do tecido conjuntivo nos animais submetidos à estimulação elétrica bem como, ao alongamento passivo. Por outro lado, a estimulação elétrica aplicada nos músculos submetidos à posição de encurtamento acentuou ainda mais a redução de sarcômeros em série. Desse modo, esse estudo permitiu concluir que a atividade contrátil do músculo previne a proliferação do tecido conjuntivo, mas não a redução de sarcômeros em série.

Para manter as diversas posições articulares, vários materiais podem ser utilizados para a confecção do modelo de desuso. No estudo de Wagatsuma et al. (2002) foi utilizado a resina epoxy mantendo a flexão plantar do tornozelo. Na posição neutra de tornozelo, outros materiais foram utilizados, como a hexcelite (PLOUG et al., 1995) ou fixação por agulhas (HIROSE et al., 2000).

Não somente a posição articular, o tipo de fibra e o modelo de desuso, mas também o período de desuso interfere nos resultados. Em 1998, Thompson et al. relataram redução da massa na ordem de 19% para o sóleo e de 13% para o gastrocnêmio após uma semana de suspensão. Já Mercier et al. (1999), estudaram a suspensão após 21 dias e obtiveram redução de 40% na massa do músculo sóleo e 18% no músculo extensor longo dos dedos. Em 2004, Kourtidou-Papadeli et al. relataram redução de 33,87% no sóleo e 15,08% no extensor longo dos dedos durante um período de 45 dias de imobilização. Assim, pode-se observar que nos diversos estudos, em um mesmo modelo, há diferentes respostas teciduais, decorrentes das variações do tempo de desuso muscular.

Elder e McComas (1987) submeteram ratos jovens à suspensão por 14, 28 e 206 dias e observaram que o maior grau de atrofia ocorre nos 28 primeiros dias. Para Thomason et al. (1987), a atrofia do músculo sóleo em suspensão é mais pronunciada nos primeiros 30 dias com redução da síntese protéica na ordem de 50% já nas primeiras 24 horas. Já McNulty et al. (1992) avaliaram ratos em suspensão por 28 dias e observaram que o maior grau de atrofia ocorrem nos 7 primeiros dias.

Alguns trabalhos sugerem que a maioria das mudanças ocorre nos primeiros sete dias frente ao desuso muscular (BOOTH, 1977; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984; THOMASON et al., 1987; JÓZSA et al., 1988; OKITA et al.,

2004). Outros autores apontam evidências que existem alterações na massa e na área das fibras musculares anteriormente ao período de 4 dias de desuso (KONDO et al., 1993; SMITH et al., 2000; BODINE et al., 2001; AHTIKOSKI et al., 2001; AHTIKOSKI et al., 2003).

Diante do exposto, é necessário salientar que os estudos de imobilização apresentam caráter multifatorial diferindo quanto ao modelo e material utilizado para promover o desuso, tempo da imobilização, posição articular, atividade eletromiográfica e tipagem das fibras musculares analisada, e isso, conseqüentemente, determina os resultados (DURIGAN et al., 2005).

Apesar de muitas vezes ser necessário, diversos estudos têm demonstrado que o desuso muscular induz proliferação do tecido conjuntivo intramuscular tanto no perimísio quanto no endomísio, além de induzir aumento do “turnover” do colágeno no tecido conjuntivo (AMIÉL et al., 1982; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984; AHTIKOSKI et al., 2003; OKITA et al., 2004). Simultaneamente, ocorre redução na área das fibras musculares, bem como na densidade dos capilares (KANNUS et al., 1998; GOMES et al., 2004).

Todos esses estudos que tiveram por objetivo entender o mecanismo de desenvolvimento e adaptação do músculo esquelético à imobilização, permitiram algumas importantes observações que são enfatizadas por Salvini (2000): o músculo adapta-se às alterações em seu comprimento; a posição, encurtada ou alongada, em que o músculo é mantido é fator determinante nas alterações estruturais; o grau de atrofia muscular depende da posição de imobilização, e é maior no grupo encurtado; a perda de força acontece como uma característica funcional da atrofia.

Além disso, o desuso muscular provocado por condições de períodos longos no leito, colocação de órteses ou fixações em membros e microgravidades induzem resistência à insulina e a um estado catabólico nos músculos esqueléticos afetados de humanos (FERRANDO et al., 1996), porém ainda não está claro como o desuso muscular crônico ou a imobilização alteram a sinalização de insulina (HIROSE et al., 2000).

Na literatura, há contradição no entendimento dos efeitos da redução na atividade muscular sobre proteínas não miofibrilares causando uma especificidade na resposta, ou seja, em alguns modelos experimentais como a desnervação observa-se redução tanto na população de proteínas transportadoras de glicose do tipo GLUT4, quanto na efetividade das proteínas sinalizadoras citosólicas. No entanto, em modelos de imobilização de membros em humanos e suspensão dos membros posteriores em ratos, os estudos se contradizem com relação à expressão do GLUT4 e captação de glicose, dependendo de fatores como tempo e tipo de imobilização. Dois diferentes modelos experimentais de desuso muscular resultam em efeito discordante quanto à expressão do GLUT4, pois pouco se conhece sobre as relações fisiológicas que atuam na interface entre a expressão de proteínas não fibrilares e a sua modulação durante a imobilização (THOMASON e BOOTH, 1990).

Ploug et al. (1995) observaram a diminuição do transporte da glicose durante um curto período de imobilização (48 horas) nas fibras vermelhas de ratos, porém não houve diferença nas fibras brancas. Ainda observaram que não houve diminuição significativa dos transportadores GLUT1 e GLUT4 nos músculos estudados durante este período, além da não diminuição do número de receptores insulínicos e atividade kinase do receptor das fibras vermelhas. Assim,

concluíram que no curto período a resistência ao transporte de glicose é tipo de fibra específica e seletiva a contrações ou à insulina. Em contraste, no modelo de desnervação por três dias, foi observado diminuição dos transportadores GLUT4 pelo desenvolvimento da resistência ao transporte de glicose estimulado pela insulina (HENRIKSEN et al., 1991).

Hirose et al. (2000) estudaram a via sinalizadora da insulina em ratos que tiveram a pata esquerda imobilizada por fixação do joelho e tornozelo a 90° durante 7 dias, e verificaram redução na transdução do sinal intracelular estimulado pela insulina, sugerindo déficit na ativação do IR (receptor de insulina) e nas moléculas ativadas a partir deste, incluindo a fosforilação do IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) e a ativação da PI3-K (fosfatidilinositol 3-quinase), indicando que o quadro de resistência à insulina também pode ser desencadeado na imobilização.

O estudo de Cancelliero (2004) demonstrou aumento na captação de 2-deoxiglicose concomitantemente a reduções nas reservas de glicogênio nos músculos submetidos à imobilização articular após o período de 7 dias. Segundo Mondon et al. (1992) ratos que foram submetidos à suspensão apresentaram aumento da sensibilidade à captação de glicose induzida pela insulina e diminuição da sensibilidade à insulina associada com a diminuição da ligação da insulina e a atividade da tirosina quinase. Isso mostra que uma mesma via inicialmente ativada pode ser alterada entre os eventos que ocorrem na cascata desencadeada pela ligação da insulina ao receptor.

2.3 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR

No final do século XVIII Luigi Galvani documentou que os músculos de sapo contraíam-se sob a influência do que veio a ser chamado de “eletricidade”. Em 1833, Duchenne de Boulogne descobriu que era possível estimular os músculos eletricamente de maneira não invasiva e elaborou eletrodos cobertos de tecido para a estimulação percutânea. Também foi observado que havia certos locais, pontos motores, ao longo da superfície do corpo cuja estimulação causava contrações particularmente fortes (KITCHEN e BAZIN, 2003).

Por definição, as correntes estimuladoras de músculo e nervo são correntes elétricas capazes de causar a geração de potenciais de ação, por meio de eletrodos de superfícies, sendo um procedimento terapêutico não invasivo de grande utilidade clínica, que tem sido usado frequentemente na reabilitação de diversas patologias. Clinicamente, a estimulação elétrica é usada para o fortalecimento e hipertrofia muscular em casos envolvendo imobilização ou onde haja contra-indicação para o exercício dinâmico, não somente em patologias, mas também no ambiente espacial (MERCIER et al., 1999). Neste sentido, esse recurso vem sendo utilizado para recuperar a força muscular, reduzir o tempo de reabilitação e prevenir a atrofia muscular decorrente da imobilização (ARVIDSSON et al., 1986; AVRAMIDIS et al., 2003).

Alguns estudos demonstram a utilização da estimulação elétrica neuromuscular em seres humanos. Cabric et al. (1987) avaliaram os seus efeitos no músculo gastrocnêmio de homens, com freqüências de 50 Hz e 2000 Hz, forma de onda triangular durante 21 dias e observaram hipertrofia e hiperplasia

nos músculos submetidos à intervenção. Também foi relatado que freqüências de 50 Hz e 2000 Hz foram capazes de promover aumento na força isométrica máxima na ordem de 58% no músculo tríceps sural em humanos durante 21 dias (CABRIC e APPELL, 1987).

Guirro et al. (2000), demonstraram aumento de força isométrica máxima do músculo quadríceps de mulheres, independente dos parâmetros da corrente utilizados durante 3 semanas. O protocolo da estimulação elétrica constou de duas correntes com pulsos quadrático bifásico simétrico, com razão de 5:5 segundos On/Off, sendo uma de média freqüência (2500 Hz modulada em 50Hz) e a outra de baixa freqüência (50Hz).

A estimulação elétrica neuromuscular tem sido proposta no intuito de minimizar os eventos desencadeados pelo desuso muscular, buscando melhorar as condições homeostáticas das fibras musculares. Foi observado que o recurso promoveu elevação na atividade contrátil das fibras musculares e desse modo a dinâmica de captação e metabolismo da glicose e a atividade das vias metabólicas celulares foram aumentadas, uma vez que os músculos de ratos submetidos somente à estimulação elétrica neuromuscular apresentaram maiores reservas de glicogênio (SILVA et al., 1999; CANCELLIERO et al., 2003; CANCELLIERO, 2004; FORTI et al., 2004; GUIRRO et al., 2004; DIAS et al., 2005).

Nesse contexto, Etgen et al. (1993) avaliaram o conteúdo de GLUT 4 no músculo plantar de ratos após estimulação elétrica crônica, e verificaram aumento de 82% em seu conteúdo. Períodos maiores de estimulação elétrica, 30 a 40 e 60 a 90 dias, mostraram somente tendência ao aumento no conteúdo do GLUT 4, atingindo um platô em torno de 30 a 40 dias. Um resultado importante do estudo

de Hamada et al. (2003) foi que a captação de glicose corporal em ratos é agudamente aumentada em resposta a 20 minutos de estimulação elétrica neuromuscular e este aumento perdura por pelo menos 90 minutos após a finalização do recurso.

Também foi observado que a estimulação elétrica neuromuscular reduziu a atrofia muscular minimizando a redução da área de secção transversal, fibrose intersticial e deficiência de suprimento sanguíneo no músculo tibial anterior de coelhos imobilizado por 3 semanas (QIN et al., 1997). Resultados semelhantes foram descritos por Polacow et al. (2003), que relataram redução da densidade de área do tecido conjuntivo em músculos desnervados após 15 dias de estimulação elétrica, apontando para possível redução da fibrose.

Kanaya e Tajima (1992) estudaram a influência da estimulação elétrica no músculo tibial anterior denervado e após reinervação. Para tanto utilizaram frequência de 2 Hz, pulsos retangulares, com largura de fase de 100 us, 30 minutos diariamente durante 12 semanas. Os autores concluíram que a estimulação elétrica retardou a redução da massa do músculo e do diâmetro da fibra muscular, reduziu a fibrose intersticial e melhorou a recuperação da lesão por um período de até 1 ano após a reinervação.

Misawa et al. (2001) compararam os efeitos da estimulação elétrica no músculo tibial anterior e extensor longo dos dedos de ratos após lesão de medula espinhal. A estimulação elétrica foi aplicada após um dia de lesão, com largura de fase de 0,2 ms, com razão de 4:4 segundos on/off, 60 minutos diariamente durante uma semana. Observou que a atrofia muscular foi minimizada de forma mais efetiva nas fibras musculares estimuladas com frequência de 100 Hz do que

as estimuladas a 20 Hz e um aumento maior da força nas fibras musculares estimuladas com frequência de 100 Hz do que as estimuladas com 20 Hz.

A estimulação elétrica em ratos retardou a atrofia das fibras do tipo I e II do músculo extensor longo dos dedos 28 dias após secção de um segmento do nervo ciático (PACHTER et al., 1982). Nemeth (1982) relatou que a contração do músculo desnervado promovida pela estimulação elétrica previne a perda de enzimas oxidativas e a atrofia após 28 dias da desnervação no músculo sóleo de porco-da-índia.

Do ponto de vista da atividade enzimática, não foram observadas alterações na concentração das enzimas anaeróbicas após estimulação elétrica crônica (8 semanas), no entanto, a atividade das enzimas citrato sintetase, 3-hidroxiácido-CoA dehidrogenase e citrocromo-c oxidase foram significativamente aumentados após 4 semanas de estimulação elétrica de baixa frequência, sem aumento significativo após 4 semanas adicionais (TRERIAULT et al., 1994).

Adaptações no suprimento vascular podem ser iniciadas devido às alterações no volume e fluxo sanguíneo promovidos pela imobilização ou pela estimulação elétrica (JÓZSA et al, 1990). Desse modo, foi observado que durante a imobilização por 4 semanas em ratos ocorre redução de 34% no volume sanguíneo ao nível do capilar (CARMELI et al, 1993). Por outro lado, foi demonstrado por meio de análise morfométrica e técnicas estereológicas, que os músculos tibial anterior e extensor longo dos dedos de coelhos estimulados eletricamente (f:10 Hz, 8 horas por dia por 4 dias) apresentaram elevação na densidade, no fluxo capilar, bem como aumento da resistência a fadiga muscular (HUDLICKA et al., 1982).

Nesse contexto, a estimulação elétrica com frequência de 2500 Hz modulada em 50 Hz durante 30 minutos nos músculos tibial anterior e extensor longo dos dedos de ratos promoveu aumento da perfusão vascular que persistia por algum período (CLEMENTE et al., 1991). Currier et al. (1986) relataram que a estimulação elétrica também pode alterar o fluxo sanguíneo no músculo gastrocnêmio de humanos, utilizando-se frequências de 2500 Hz moduladas em 50 Hz. O aumento do número de capilares por fibra muscular em animais também tem sido observado (MYRHAGE e HUDLICKA, 1978; QIN et al., 1997).

A proposta desse trabalho foi caracterizar o perfil morfométrico do músculo sóleo submetido à imobilização articular do tornozelo em vários períodos de tempo em posição neutra, por meio da órtese de resina acrílica, já que em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa foram demonstrados alterações no perfil metabólico e mecânico nos músculos submetidos a este tipo de imobilização. Além disso, pouco se conhece sobre os efeitos da estimulação elétrica na imobilização em posição neutra induzida por órtese de resina acrílica com relação às avaliações morfométricas. Nesse sentido, em virtude da frequência com que a estimulação elétrica é utilizada na prática clínica, denota-se uma grande importância no desenvolvimento de trabalhos que determinem a sua influência na recuperação dos efeitos deletérios decorrente do desuso.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da imobilização por órtese de resina acrílica em posição neutra durante 3 períodos (3, 7 e 15 dias) no músculo sóleo de ratos associado ou não com estimulação elétrica neuromuscular, nos seguintes parâmetros: massa muscular, área das fibras e densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 45 ratos albinos, da linhagem *Wistar*, com idade variando entre 3 a 4 meses (250-300g) fornecidos pelo biotério da UNIMEP, Piracicaba, SP. Os animais foram alimentados com ração (Purina para roedores) e água *ad libitum*, sendo submetidos a ciclo fotoperiódico claro escuro controlado de 12 horas, sob temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$).

4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Análise histológica

Trinta e cinco animais foram divididos em 7 grupos, conforme a tabela 1.

Tabela 1. Composição dos grupos experimentais, n = 5.

Grupos	
1.	Controle (C)
2.	Imobilizados 3 dias (I3)
3.	Imobilizados 7 dias (I7)
4.	Imobilizados 15 dias (I15)
5.	Imobilizados 3 dias + estimulação elétrica (IEE3)
6.	Imobilizados 7 dias + estimulação elétrica (IEE7)
7.	Imobilizados 15 dias + estimulação elétrica (IEE15)

4.2.2 Análise da movimentação exploratória

Para essa análise, 10 animais foram divididos em 2 grupos (n=5): controle e imobilizado em durante 7 dias (tabela 2):

Tabela 2. Composição dos grupos experimentais, n = 5.

Grupos	
1.	Controle (C)
2.	Imobilizados 7 dias (I)

4.3. PROCEDIMENTOS

4.3.1 Técnica da confecção da órtese

Para a confecção da órtese foi utilizada moldagem com alginato de potássio, vazamento do molde com gesso pedra, manipulação da resina e preparo da órtese (CANCELLIERO, 2004).

4.3.2 Imobilização

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg peso) e a pata posterior esquerda foi imobilizada com órtese de resina acrílica na posição neutra de tornozelo (90°), deixando as articulações do joelho e quadril livres (Figuras 1 e 2).

O modelo foi adaptado no membro posterior, associado a uma cinta de PVC (diâmetro 40mm) por dois rotadores laterais (15mm de extensão), os quais permitiram a sua livre movimentação (Figuras 2 e 3). O conjunto, com aproximadamente $22,72g \pm 2,25$ de peso, permitiu livre deambulação do animal, havendo descarga de peso no membro imobilizado, sendo uma movimentação do membro em bloco, com movimentos ântero-posterior e lateral de quadril (Figura 4).

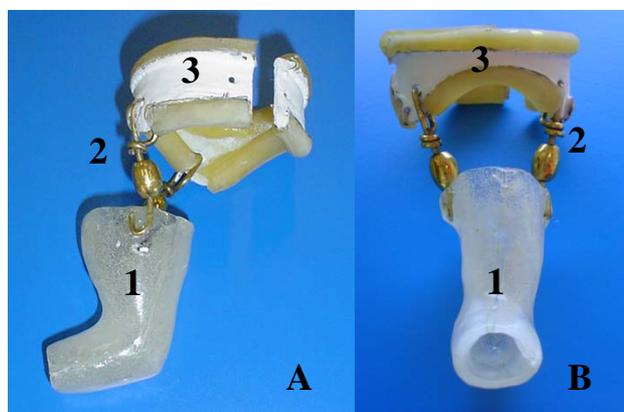


Figura 1. Vista lateral (A) e anterior (B) da órtese composta pelo modelo de resina acrílica (1), rotadores laterais (2) e cinta abdominal (3).



Figura 2. Órtese adaptada no membro posterior do animal, mantendo o ângulo de 90° da articulação do tornozelo.



Figura 3. Vista superior do animal com a órtese adaptada no membro posterior esquerdo.



Figura 4. Órtese adaptada no membro posterior do animal, sem interferir na deambulação, permitindo a descarga de peso no membro imobilizado.

4.4 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR

Para a execução do protocolo de estimulação elétrica, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg peso) e o membro posterior esquerdo foi tricotomizado para garantir uma maior efetividade da estimulação e do posicionamento dos eletrodos. A estimulação elétrica neuromuscular foi

realizada em sessão diária de 20 minutos, por um período de 3, 7 e 15 dias. Um eletrodo foi colocado na região inguinal e o outro no músculo tríceps sural acoplado dentro da órtese (Figura 5).

O equipamento utilizado para a estimulação elétrica neuromuscular foi o Dualpex 961 (Figura 6), além de 4 eletrodos de silicone-carbono com 1 cm² cada, bem como gel de acoplamento.

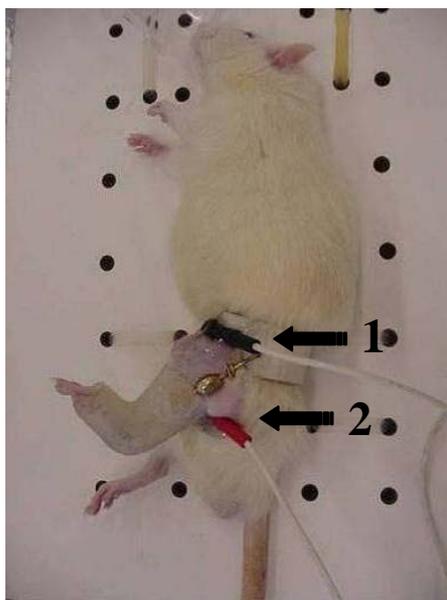


Figura 5. Posicionamento dos eletrodos para a aplicação da estimulação elétrica neuromuscular no membro posterior imobilizado, sendo um eletrodo na região inguinal (eletrodo 1) e outro na porção posterior da perna, acoplado dentro da órtese (eletrodo 2).

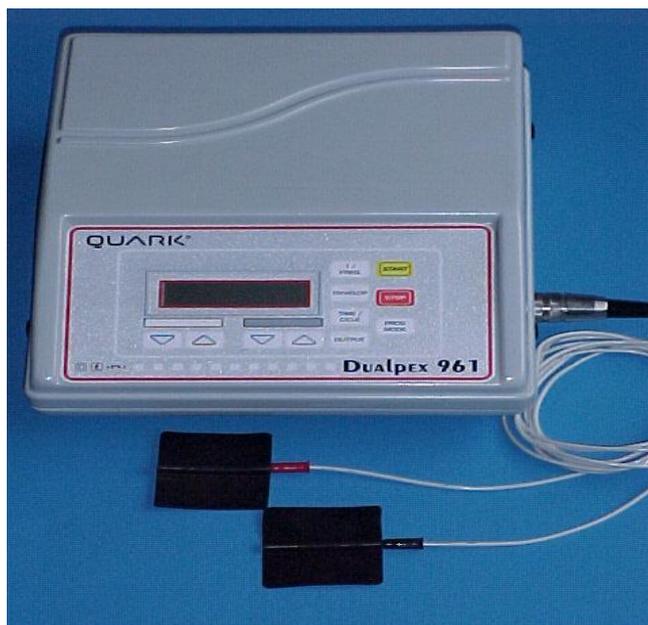


Figura 6. Equipamento Dualpex 961 (Quark[®]) utilizado para a realização da estimulação elétrica neuromuscular.

Como parâmetros físicos da corrente, foi estabelecida uma frequência de 10 Hz em função da ênfase dada ao músculo sóleo, constituindo principalmente por fibras do tipo I, com largura de fase de 0,4 ms e pulso quadrático bifásico. A intensidade da corrente foi padronizada em 5.0 mA, a partir da visualização da contração muscular. A cada 5 minutos foi aplicado um acréscimo de 1.0 mA à corrente para não haver acomodação.

4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

4.5.1 Processamento das amostras do tecido muscular

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o músculo sóleo foi exposto, retirado, pesado e em seguida, a parte central do seu segmento ventral foi colocado em solução tamponada de formol a 10% para fixação. Foram processados também, o sóleo do membro contralateral.

Após 48 horas de fixação, as peças passaram por desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol sendo incluídas em paraplast. Cortes transversais não seriados de 7 μm de espessura foram obtidos da porção ventral do músculo sóleo, que foram corados por Hematoxilina-Eosina (H:E).

4.5.2 Análise da área das fibras musculares

Foram selecionados 5 cortes e para cada um deles foram captadas 5 áreas, por meio de um sistema de captação e análise de imagens constituído de um software Image Pró-plus 4.0 (Media Cybernects), câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com resolução de 640 por 480 pixels com objetiva de 10 vezes, sendo que o software permitiu visualizar as imagens em uma área da tela (área de flame) de aproximadamente 190464,12 μm^2 .

Foram analisadas as áreas de secção transversa de 375 fibras do músculo sóleo por animal, assim determinadas: 15 fibras por área, sendo 5 áreas por corte, e 5 cortes por animal. Para a escolha das fibras a serem analisadas, utilizou-se de um retículo com quadrados de $12100 \mu\text{m}^2$ contendo 20 intersecções de reta, e foram consideradas as fibras que coincidiam com 15 intersecções, de forma aleatória.

4.5.3 Análise do tecido conjuntivo intramuscular

Para essa análise foi utilizado o sistema de planimetria por contagem de pontos (MATHIEU et al., 1981; DE LACERDA, 1994), sendo a quantificação realizada por meio de um retículo com quadrados de $2500 \mu\text{m}^2$ contendo 56 intersecções de reta. Foram contados os pontos coincidentes no endomísio e perímísio, em 5 áreas por corte, sendo 5 cortes por animal, perfazendo um total de 1400 pontos por animal.

Desse modo, a área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada dividindo-se a soma do número de pontos coincidentes nas intersecções de reta sobre o tecido conjuntivo (endomísio e perímísio) pelo número total de pontos.

4.6 ANÁLISE DA MOVIMENTAÇÃO EXPLORÁTORIA

Os animais deste grupo foram diariamente expostos ao “open field” sempre no início da noite, período de maior atividade da espécie, permanecendo no ambiente durante 3 minutos (PELLOW et al., 1985). O “open field” consiste em um quadrado com dimensão de 46x46x25cm, divididos em 9 quadrados com dimensão de 225cm² cada. A observação foi direcionada a movimentação exploratória e adaptação do animal ao ambiente. Como parâmetro avaliativo foi utilizado a contagem de deslocamento a partir do posicionamento de três membros do rato em um quadrado, sendo que o número total de quadrados percorridos foi utilizado como índice de deambulação espontânea conforme descrito por Royce (1977).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Para a variável massa muscular, que apresentou distribuição normal e homocedasticidade, foi utilizado a Anova e teste F sendo que, quando a diferença apresentada era significativa, aplicou-se o teste de Tukey HSD para as comparações múltiplas. Para os campos observados no open field, que contemplaram os pré-requisitos para a metodologia paramétrica, foi utilizado o teste “t” de student. Já para as variáveis área das fibras musculares e densidade

do tecido conjuntivo foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a fim de verificar a diferença entre os grupos. Quando esta diferença era apontada, deu-se continuidade à análise por meio do teste de comparações múltiplas de Tukey HSD. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

O software utilizado em todos os testes estatístico foi o Statistica[®] 6.1.

5. RESULTADOS

5.1 MASSA MUSCULAR

Com relação à massa muscular (mg) do grupo imobilizado durante 3 dias (I3) não houve diferença significativa quando comparado ao grupo controle (média±dpm, C: 124,6±5,07 e I3: 127,2±13,59). Por outro lado, quando se compara os grupos imobilizado 7 dias (I7) e imobilizado 15 dias (I15) com o grupo controle, houve significativa redução ($p<0,05$) da massa muscular (C: 124,6±5,07, I7: 81±5,09 e I15: 114,6±6,42).

Além disso, foi observado diferença significativa ($p<0,05$) do grupo imobilizado durante 3 dias quando comparado ao grupo imobilizado 7 dias (I3: 127,2±13,59, I7: 81±5,09) e ao grupo imobilizado durante 15 dias (I3: 127,2±13,59, I15: 114,6±6,42). O grupo imobilizado durante 7 dias também apresentou diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado ao grupo imobilizado durante 15 dias (I7: 81±5,09, I15: 114,6±6,42), como pode ser observado na Figura 7.

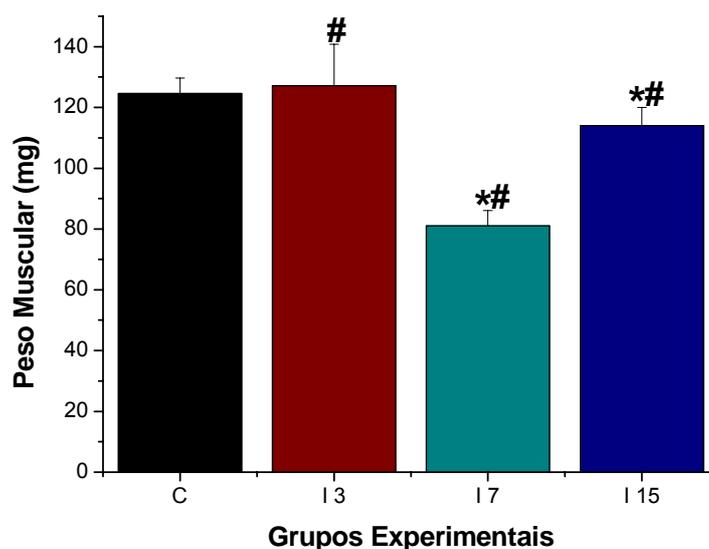


Figura 7 - Média \pm dpm da massa do músculo sóleo (mg) dos grupos controle (C), imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado por 7 dias (I7) e imobilizado por 15 dias (I15). n:5, $p < 0,05$, * comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos imobilizados.

A Figura 8 demonstra que nos grupos submetidos ao tratamento por estimulação elétrica neuromuscular, o tratado por 3 dias (I3: $127,2 \pm 13,59$ e IEE3: $120,4 \pm 8,63$), bem como o tratado por 7 dias (I7: $81 \pm 5,09$ e IEE7: $80,8 \pm 8,67$) não apresentaram modificações significativas em relação à massa muscular se comparados com os respectivos grupos imobilizados. Porém, no grupo estimulado por 15 dias ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$) da massa muscular em relação ao grupo imobilizado por 15 dias (I15: $114,6 \pm 6,42$ e IEE15: $138,6 \pm 6,42$).

Foi observado também, diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo tratado por 3 dias, quando comparado ao grupo tratado por 7 dias (IEE3: $120,4 \pm 8,63$, IEE7: $80,8 \pm 8,67$), bem como ao grupo tratado por 15 dias (IEE3: $120,4 \pm 8,63$, IEE15: $138,6 \pm 6,42$), sendo que o grupo tratado por 7 dias também difere

significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado por 15 dias (IEE7: $80,8 \pm 8,67$, IEE15: $138,6 \pm 6,42$), como pode ser observado na Figura 8.

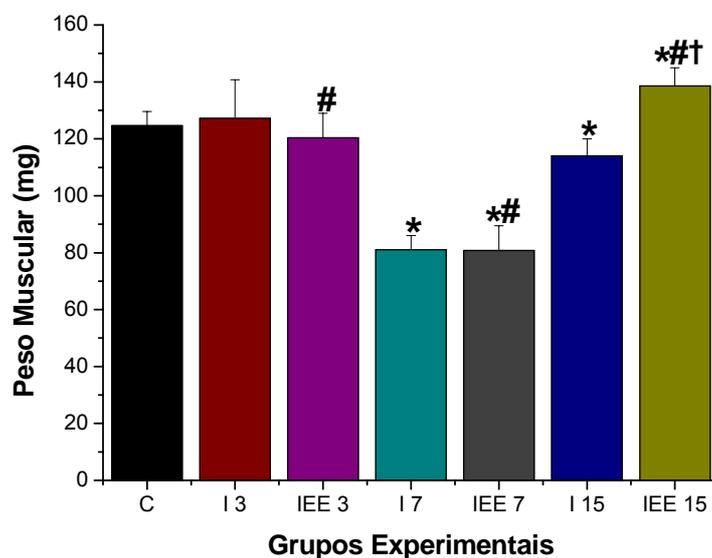


Figura 8 - Média \pm dpm da massa do músculo sóleo (mg) dos grupos imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 3 dias (IEE3), imobilizado por 7 dias (I7), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 7 dias (IEE7), imobilizado por 15 dias (I15) e imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 15 dias (IEE15). n:5, $p < 0,05$, * comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos imobilizados tratados com estimulação elétrica, † comparado aos respectivo grupo imobilizado.

Já em relação à massa muscular da pata contralateral dos grupos 3 dias e 7 dias, a figura 9 mostra que não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle (C: $124,6 \pm 5,07$, CC3: $128,8 \pm 4,96$ e CC7: $124,6 \pm 3,20$). Entretanto, a massa muscular da pata contralateral 15 dias sofreu aumento

significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (C: $124,6 \pm 5,07$ e CC15: $184,8 \pm 15,78$). Com relação ao grupo contralateral 3 dias, não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) da massa muscular quando comparado ao grupo contralateral 7 dias (CC3: $128,8 \pm 4,96$ e CC7: $124,6 \pm 3,20$). Por outro lado, o grupo contralateral 15 dias apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos grupos contralateral 3 dias, bem como o contralateral 7 dias (CC15: $184,8 \pm 15,78$, CC3: $128,8 \pm 4,96$ e CC7: $124,6 \pm 3,20$)

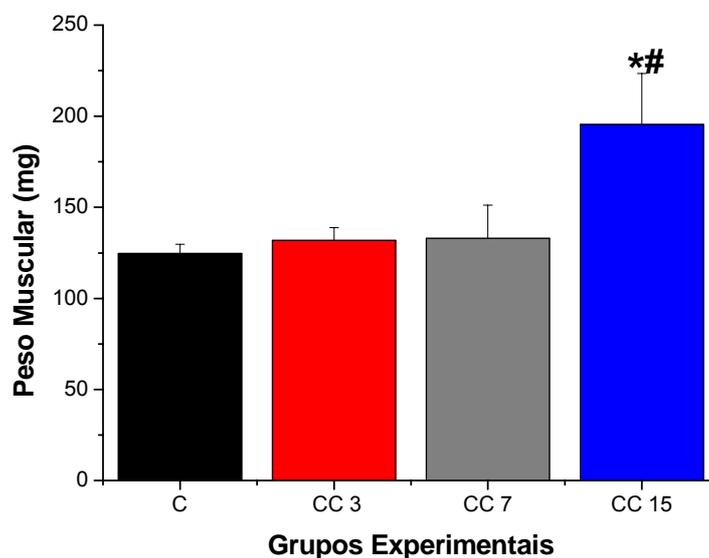


Figura 9 - Média \pm dpm da massa do músculo sóleo (mg) dos grupos controle (C), pata contralateral 3 dias (CC3), pata contralateral 7 dias (CC7), pata contralateral 15 dias (CC15). n:5, $p < 0,05$, *comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos contralaterais.

5.2 ÁREA DAS FIBRAS MUSCULARES

A imobilização também promoveu alterações em relação à análise morfométrica, caracterizadas pela redução significativa ($p < 0,05$) da área das fibras do músculo sóleo (μm^2) em todos os grupos estudados comparados ao grupo controle (C: $2574,88 \pm 560,22$, I3: $1778,51 \pm 504,19$, I7: $1438,1 \pm 352,20$ e I15: $1624,03 \pm 413,52$). Além disso, foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo imobilizado durante 3 dias quando comparado ao grupo imobilizado 7 dias (I3: $1778,51 \pm 504,19$, I7: $1438,1 \pm 352,20$) e ao grupo imobilizado durante 15 dias (I3: $1778,51 \pm 504,19$, I15: $1624,03 \pm 413,52$). O grupo imobilizado durante 7 dias também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo imobilizado durante 15 dias (I7: $1438,1 \pm 352,20$, I15: $1624,03 \pm 413,52$), como podem ser observadas na figura 10. As imagens obtidas destes grupos podem ser observadas nas figuras 16-17-19 e 21.

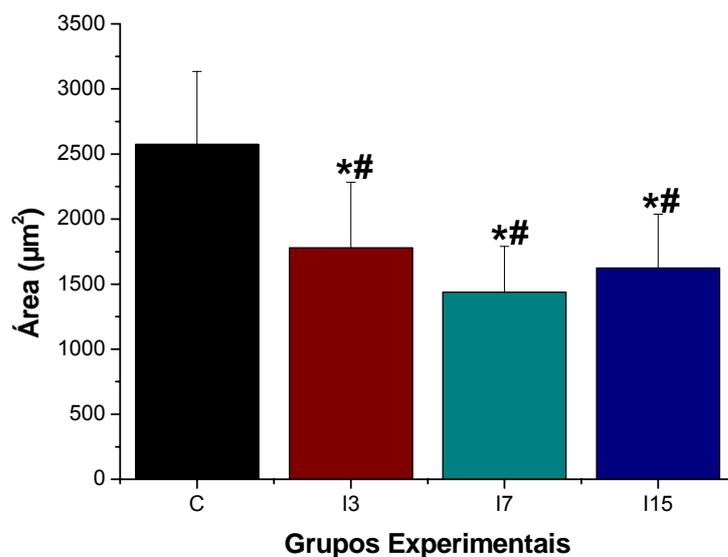


Figura 10 - Média±dpm da área do músculo sóleo (μm^2) dos grupos controle (C), imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado por 7 dias (I7) e imobilizado por 15 dias (I15). n:5, $p<0,05$, * comparado ao grupo controle, # comparado as outros grupos imobilizados.

A Figura 11 mostra que a utilização da estimulação elétrica neuromuscular promoveu aumento significativo ($p<0,05$) em todos os grupos na área das fibras se comparados com os respectivos grupos imobilizados (I3: $1778,51\pm504,19$ e IEE3: $1925,07\pm369,36$, I7: $1438,1\pm325,20$ e IEE7: $1522,79\pm313,96$, I15: $1624,03\pm413,52$ e IEE15: $2027,06\pm643,10$), como também podem ser observadas nas Figuras 18, 20 e 22. No entanto, os 3 grupos estimulados (IEE3, IEE7 e IEE15), foram significativamente ($p<0,05$) diferentes do grupo controle.

Foi observado também, diferença significativa ($p<0,05$) do grupo tratado por 3 dias em relação ao tratado por 7 dias (IEE3: $1925,07\pm369,36$, IEE7: $1522,79\pm313,96$), bem como ao tratado por 15 dias (IEE3: $1925,07\pm369,36$,

IEE15: $2027,06 \pm 643,10$). O grupo tratado por 7 dias também difere significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado por 15 dias (IEE7: $1522,79 \pm 313,96$, IEE15: $2027,06 \pm 643,10$).

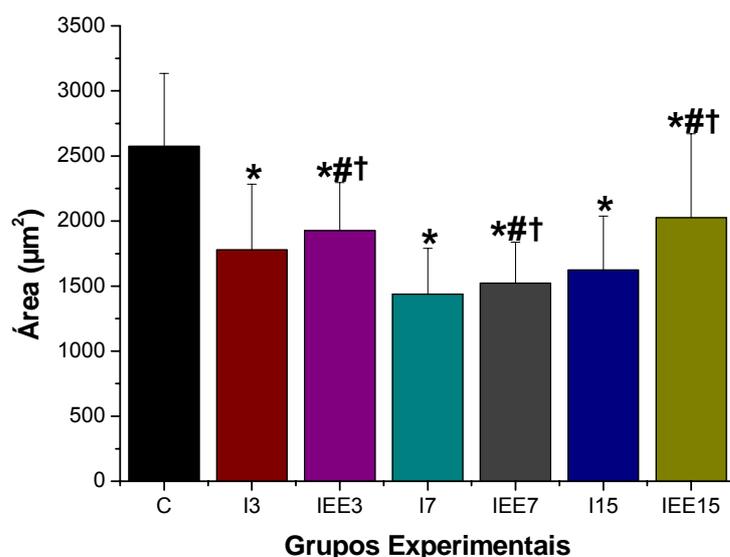


Figura 11 - Média \pm dpm da área do músculo sóleo (μm^2) dos grupos imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 3 dias (IEE 3), imobilizado por 7 dias (I7), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 7 dias (IEE 7), imobilizado por 15 dias (I15) e imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 15 dias (IEE 15). n:5. $p < 0,05$, * comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos imobilizados tratados com estimulação elétrica, † comparado aos respectivo grupo imobilizado.

Na pata contralateral, os grupos 3 e 7 dias, demonstraram redução significativa ($p < 0,05$) na área das fibras se comparados com o grupo controle (C:

2574,88±560,22, CC3:2280,49±606,33, CC7: 2257,61±428,00). Por outro lado, no grupo 15 dias, foi observado aumento significativo ($p<0,05$) da área das fibras quando comparado ao grupo controle (C: 2574,88±560,22, CC15: 2658,66±610,30), bem como quando comparado aos grupos 3 e 7 dias (CC15: 2658,66±610,30, CC3:2280,49±606,33, CC7: 2257,61±428,00), conforme demonstra a Figura 12. As imagens destes grupos podem ser observadas nas Figuras 23, 24 e 25.

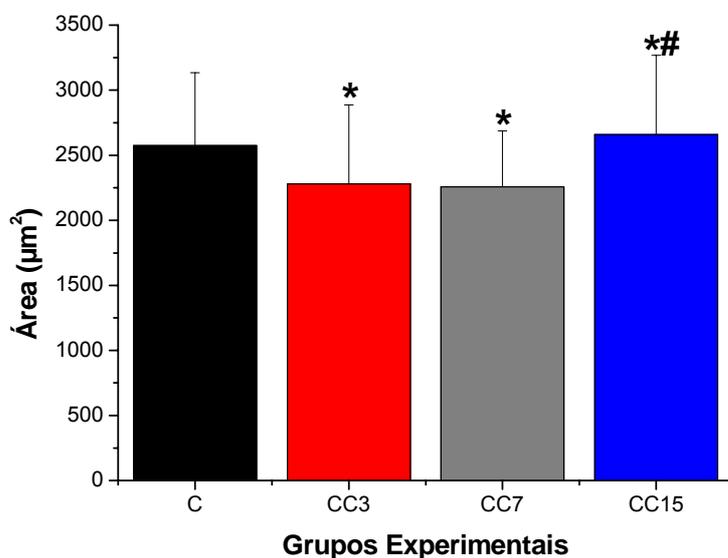


Figura 12 - Média ± dpm da área do músculo sóleo (μm^2) dos grupos controle (C), pata contralateral 3 dias (CC3), pata contralateral 7 dias (CC7), pata contralateral 15 dias (CC15). n:5, $p<0,05$,* comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos contralaterais.

5.3 DENSIDADE DO TECIDO CONJUNTIVO INTRAMUSCULAR

A densidade de área do tecido conjuntivo (%) aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos submetidos à imobilização se comparados ao grupo controle (C: $8,82 \pm 3,55$, I3: $34,92 \pm 10$, I7: $27,92 \pm 5,36$ e I15: $23,07 \pm 8,79$ - Figura 13).

O grupo imobilizado durante 3 dias apresenta diferença significativa ($p < 0,05$) do imobilizado 7 dias (I3: $34,92 \pm 10$, I7: $27,92 \pm 5,36$) e ao imobilizado durante 15 dias (I3: $34,92 \pm 10$, I15: $23,07 \pm 8,79$), sendo que o grupo imobilizado durante 7 dias também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo imobilizado durante 15 dias (I7: $27,92 \pm 5,36$, I15: $23,07 \pm 8,79$). As Figuras 17, 19 e 21 mostram as imagens destes grupos.

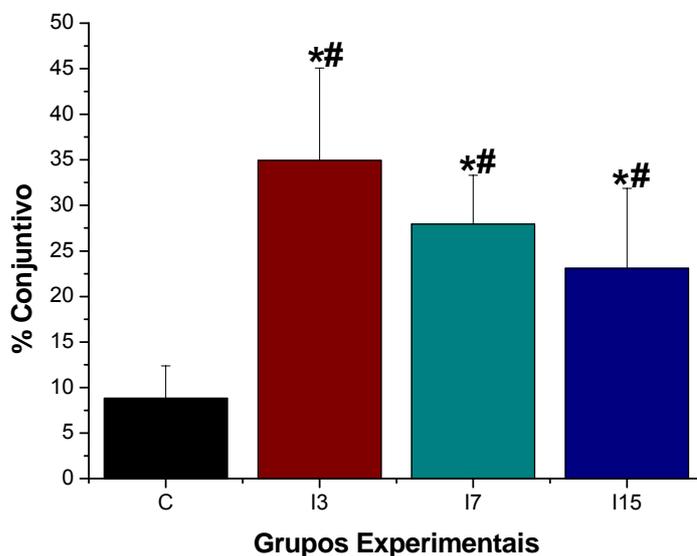


Figura 13 - Média \pm dpm da densidade de área (%) do tecido conjuntivo do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado por 7 dias (I7) e imobilizado por 15 dias (I15). n:5, $p < 0,05$, * comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos imobilizados.

A estimulação elétrica neuromuscular reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a densidade do tecido conjuntivo em todos os grupos quando comparados com os respectivos grupos imobilizados (I3: $34,92 \pm 10,17$ e IEE3: $18,48 \pm 5$, I7: $27,92 \pm 5,36$ e IEE7: $20,21 \pm 8,77$, I15: $23,07 \pm 8,79$ e IEE15: $18,35 \pm 5,96$ (Figura 14), porém continuam diferentes significativamente ($p < 0,05$) do grupo controle (C: $8,82 \pm 3,55$) e não diferem entre si. As imagens destes grupos podem ser observadas nas Figuras 18, 20 e 22.

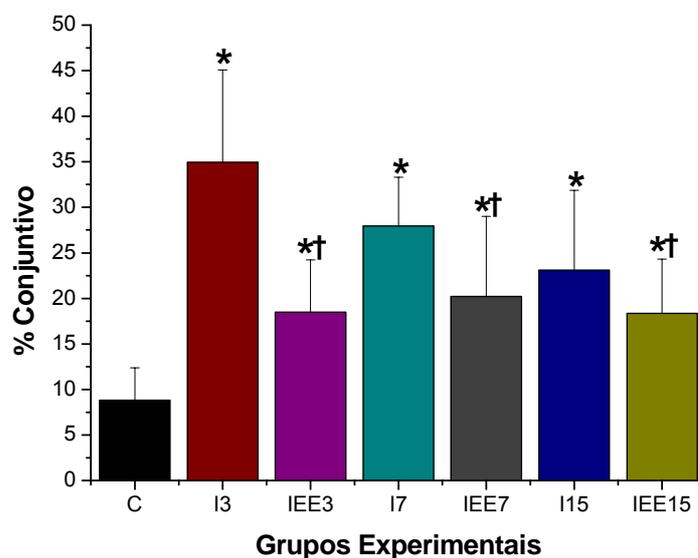


Figura 14 - Média \pm dpm da densidade de área (%) do tecido conjuntivo do músculo sóleo dos grupos imobilizado por 3 dias (I3), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 3 dias (IEE 3), imobilizado por 7 dias (I7), imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 7 dias (IEE 7), imobilizado por 15 dias (I15) e imobilizado e tratado com estimulação elétrica por 15 dias (IEE 15). n:5, $p < 0,05$, * comparado ao grupo controle, † comparado aos respectivo grupo imobilizado.

Já em relação ao comportamento da pata contralateral dos grupos 3 dias e 7 dias, a Figura 15 mostra que ocorreu aumento significativo do tecido conjuntivo em relação ao grupo controle (C: $8,82 \pm 3,55$, CC3: $17,90 \pm 6,52$ e CC7: $18,62 \pm 4,97$). Por outro lado, a densidade de área do tecido conjuntivo da pata contralateral imobilizada por 15 dias não mostrou aumento significativo ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle (C: $8,82 \pm 3,55$ e CC15: $9,65 \pm 3,08$).

No grupo contralateral 15 dias, foi observado redução significativa ($p < 0,05$) da densidade do tecido conjuntivo em relação aos grupos contralateral 3 dias, bem como o contralateral 7 dias (CC15: $9,65 \pm 3,08$, CC3: $17,90 \pm 6,52$ e CC7: $18,62 \pm 4,97$), sendo que esses dois últimos grupos não diferem entre si, como pode também ser acompanhado pelas Figuras 23, 24 e 25.

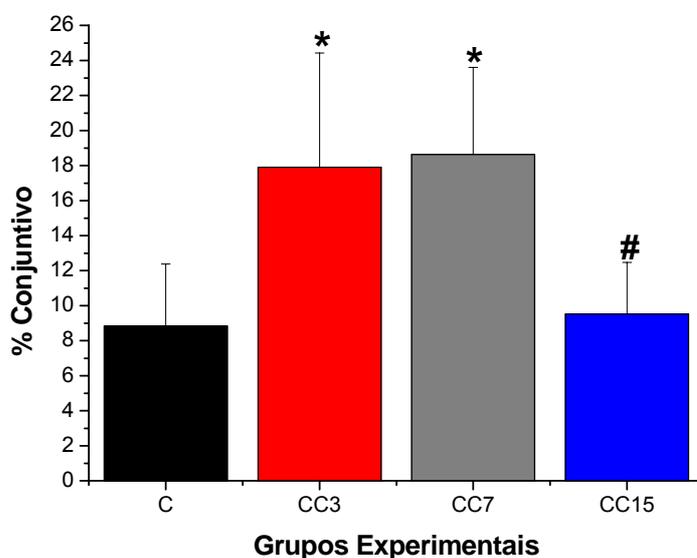


Figura 15 - Média \pm dpm da densidade de área (%) do tecido conjuntivo do músculo sóleo dos grupos controle (C), pata contralateral 3 dias (CC3), pata contralateral 7 dias (CC7), pata contralateral 15 dias (CC15) n: 5, * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, # comparado aos outros grupos contralaterais.

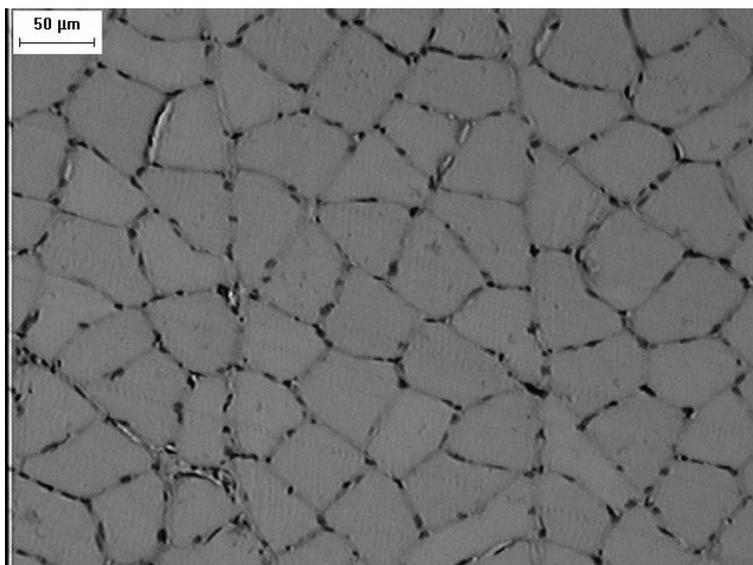


Figura 16 - Fibras do músculo sóleo do grupo controle.

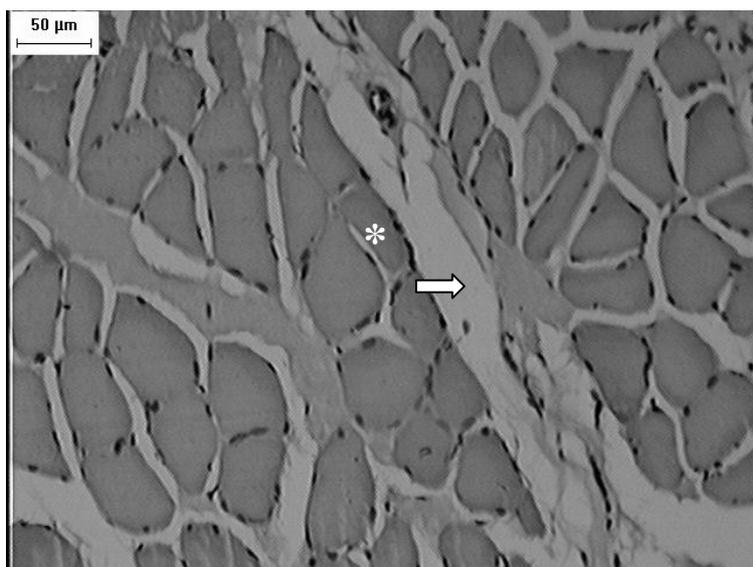


Figura 17 - Músculo sóleo imobilizado em posição neutra do tornozelo 3 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.

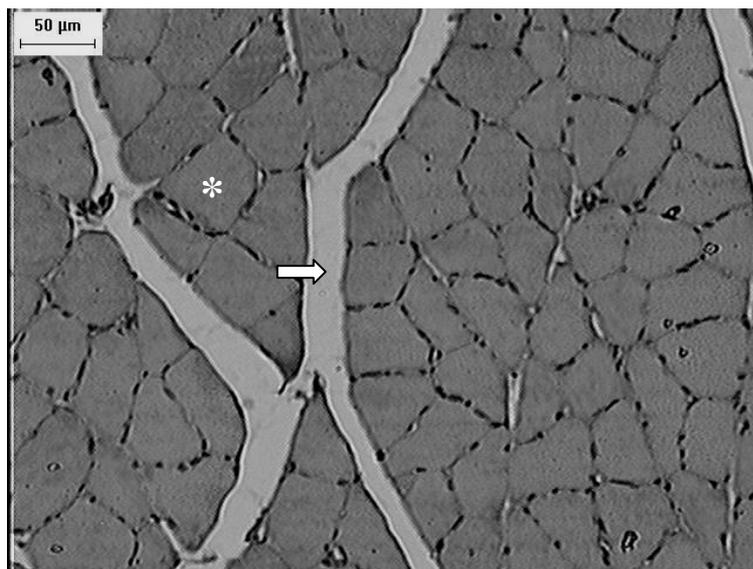


Figura 18 - Músculo sóleo imobilizado e tratado com EE por 3 dias. Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco) e redução do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo imobilizado durante 3 dias.

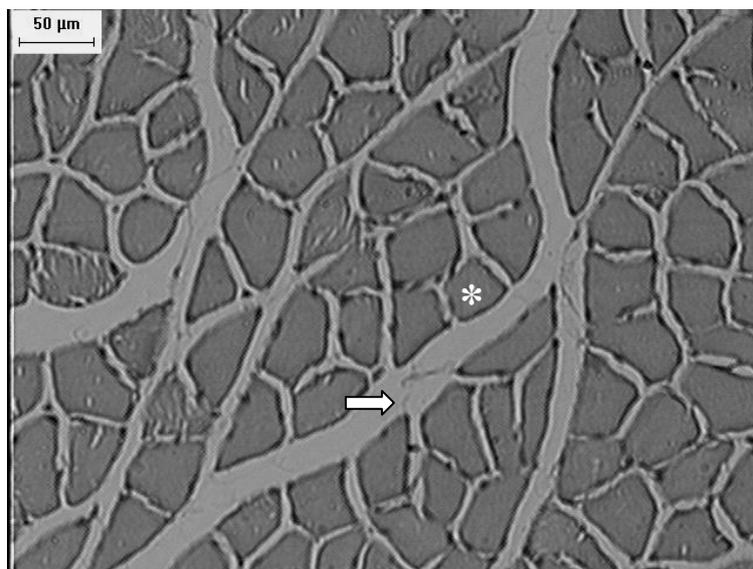


Figura 19 - Músculo sóleo imobilizado em posição neutra do tornozelo 7 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.

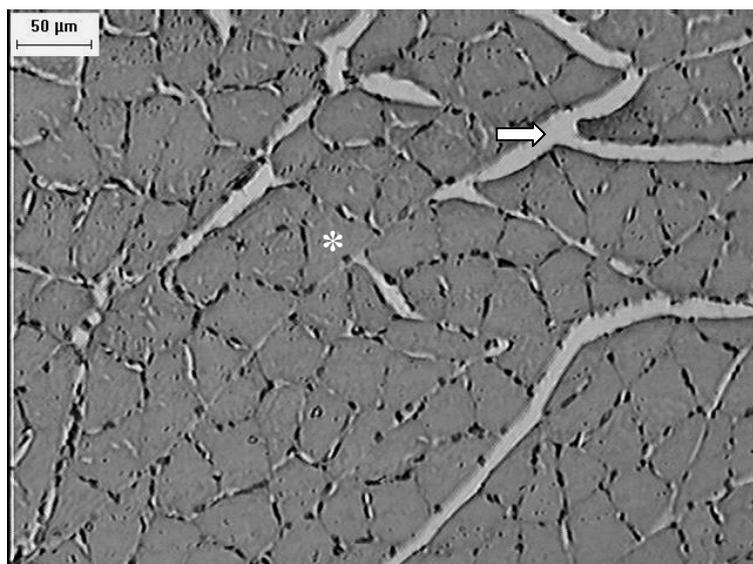


Figura 20 - Músculo sóleo imobilizado e tratado com EE por 7 dias. Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco) e redução do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo imobilizado durante 7 dias.

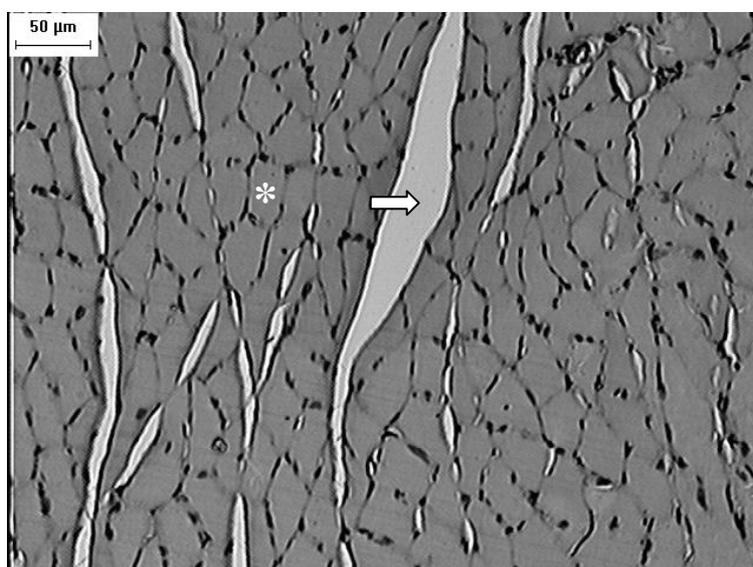


Figura 21 - Músculo sóleo imobilizado em posição neutra do tornozelo 15 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.

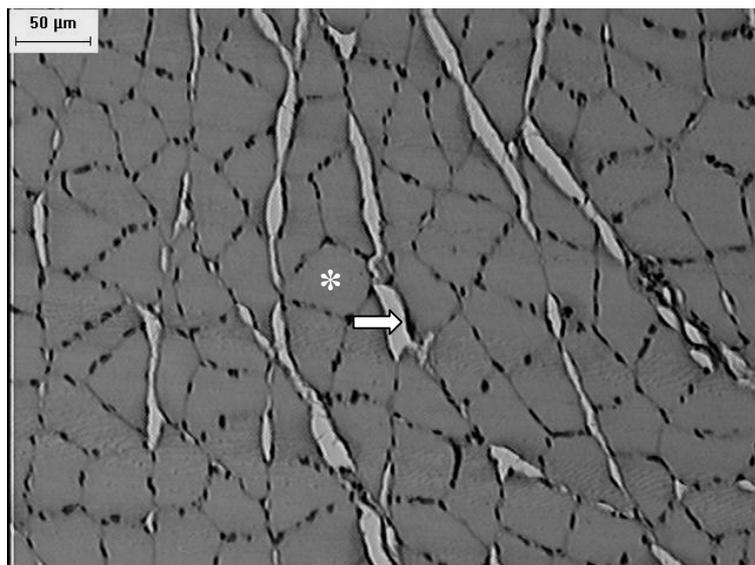


Figura 22 - Músculo sóleo imobilizado e tratado com EE por 15 dias. Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco) e redução do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo imobilizado durante 15 dias.

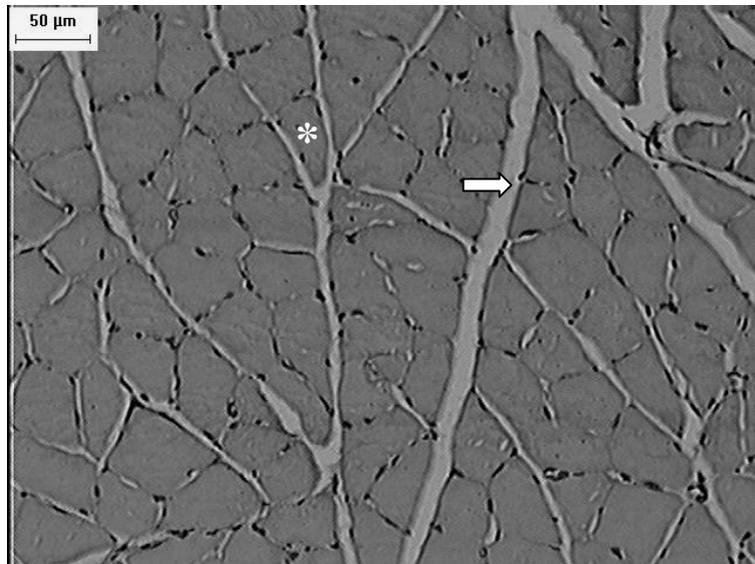


Figura 23 - Músculo sóleo da pata contralateral durante imobilização por 3 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.

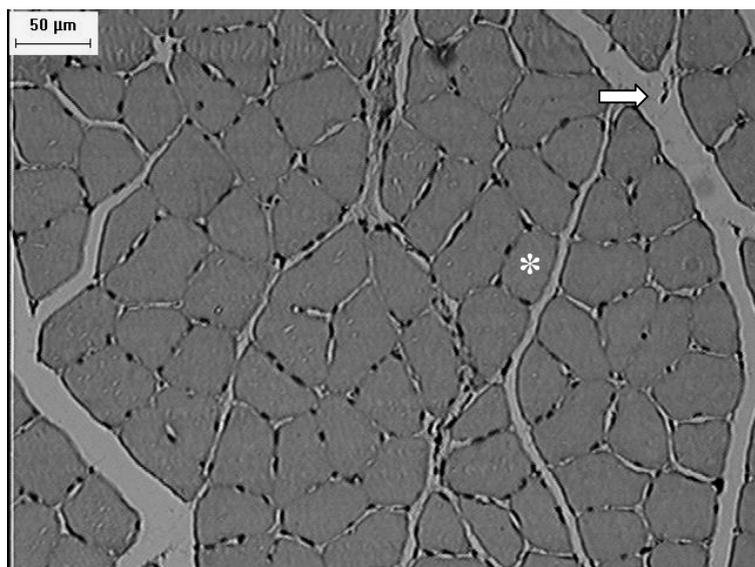


Figura 24 Músculo sóleo da pata contralateral durante imobilização por 7 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.

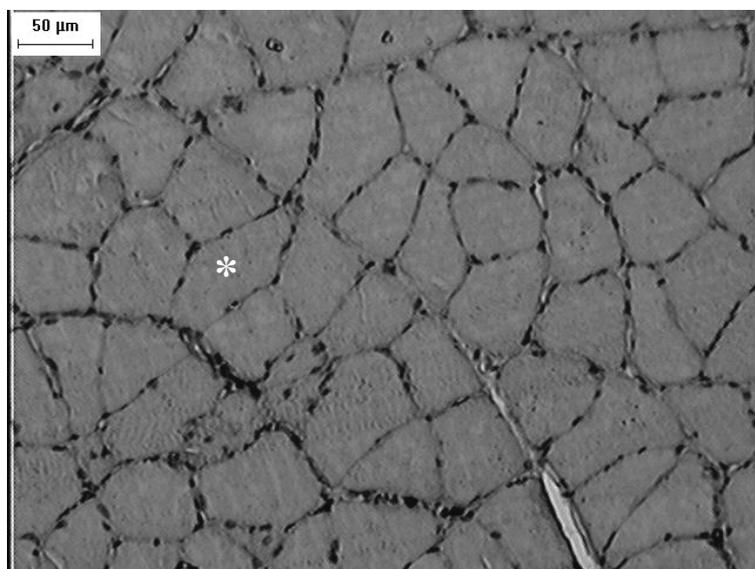


Figura 25 - Músculo sóleo da pata contralateral durante imobilização por 15 dias. Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco) em relação ao grupo controle.

5.4 ANÁLISE DA MOVIMENTAÇÃO EXPLORÁTORIA

A Figura 26 mostra que o deslocamento exploratório observado em “open field” do grupo controle, foi reduzido de forma gradativa até o 7º dia adaptando-se a condição, sendo que nesse período, os valores dos campos observados não se diferem significativamente ($p > 0,05$) em relação ao grupo imobilizado. Por outro lado, o grupo imobilizado não manifestou o mesmo comportamento demonstrando que a limitação funcional restringiu o desenvolvimento do caráter exploratório.

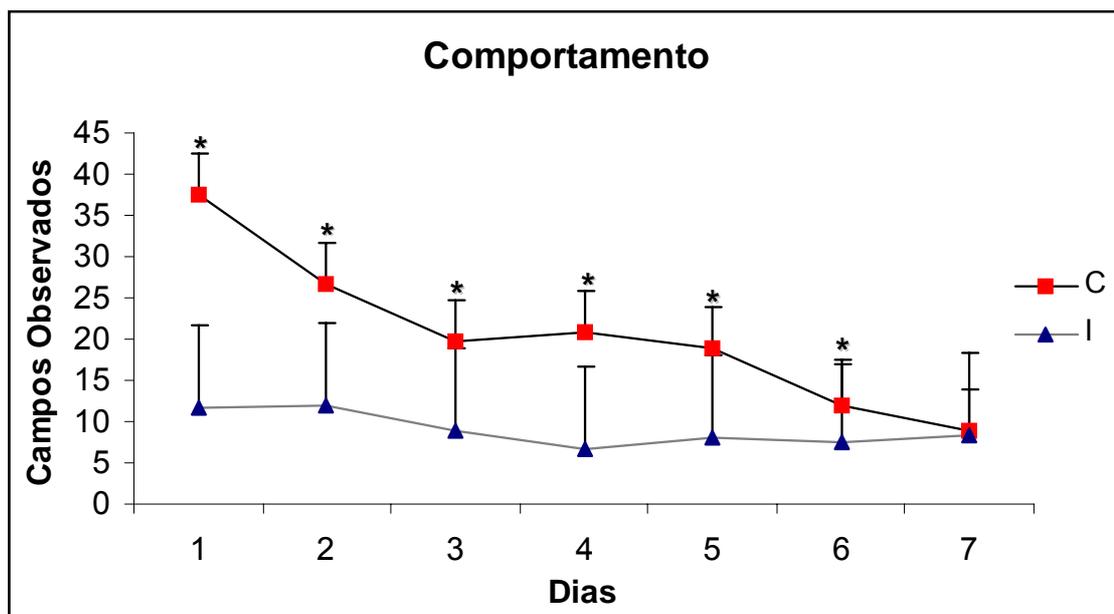


Figura 26 - Média \pm dpm de campos observados em *open field* dos grupos controle (C), submetidos à imobilização (I), $n=5$,* $p < 0,05$ comparado ao grupo imobilizado.

6. DISCUSSÃO

A imobilização articular, condição freqüente na prática clínica da fisioterapia pode promover efeitos deletérios no sistema músculo-esquelético como redução da elasticidade muscular, redução da amplitude de movimento e até mesmo a contratura muscular devido à proliferação do tecido conjuntivo (JÓZSA et al., 1990). Além dessas alterações, sabe-se também que o desuso pode levar à hipotrofia muscular, redução das reservas de glicogênio, creatina quinase, dos sarcômeros em série, da força e resistência à fadiga (REARDON et al., 2001).

Vários são os fatores que podem influenciar os resultados expostos nos estudos envolvendo a imobilização, com destaque para o tipo de fibra muscular. Nesse sentido, muitos estudos entre as décadas de 70 e 80 avaliaram respostas do músculo esquelético imobilizado, porém eram contraditórios quanto ao tipo de fibra mais susceptível à atrofia (BOOTH e KELSO, 1973; BOOTH, 1977; MACDOUGALL et al., 1977; HERBISON et al., 1978; JAFFE et al., 1978; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; MCDUGALL et al., 1980; BOOTH, 1987; LEIVSETH et al., 1987; SAVOLAINEN et al., 1988).

Atualmente, a literatura relata que os músculos considerados antigravitacionários, os uni-articulares e os que possuem maior proporção de fibras lentas são os mais vulneráveis à atrofia induzida pelo desuso (APPELL, 1990; HESLINGA et al., 1995; PLOUG et al., 1995; MERCIER et al., 1999; HERRERA et al., 2001; LIEBER, 2002; TANAKA et al., 2004). Sendo assim, o músculo sóleo, predominantemente composto por fibras do tipo I, foi o escolhido

para a análise morfométrica devido a sua maior susceptibilidade à atrofia, inerente ao desuso.

Além do tipo de fibra muscular, outro fator que pode interferir na resposta diante do desuso muscular é a posição articular. De maneira geral, a posição de encurtamento acarreta redução da massa muscular, da área das fibras, diminuição no número de sarcômeros em série e maior proliferação do tecido conjuntivo. Já a imobilização em posição alongada leva ao aumento da massa muscular, aumento da síntese protéica, adição de sarcômeros em série e menor proliferação do tecido conjuntivo (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; TARDIEU et al., 1982; FOURNIER et al., 1983; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984; APPELL, 1986; JÓZSA et al., 1988; WILLIAMS et al., 1988; SAVOLAINEM et al., 1988; JARVINEM et al., 1992; YANG et al., 1997).

Nesse contexto, a proposta deste trabalho foi estudar a posição neutra devido à maioria dos estudos induzirem imobilização em posições articulares encurtadas e alongadas, sejam por gesso, resinas, malha de aço, ou até mesmo por suspensão do membro. Vários trabalhos utilizaram a posição neutra de tornozelo (90°) evidenciando efeitos deletérios no sistema músculo-esquelético (HERBISON et al., 1978; FOURNIER et al., 1983; PLOUG et al., 1995; QIN et al., 1997; HIROSE et al., 2000). Nestes trabalhos, a imobilização do tornozelo em posição neutra foi associada com a imobilização das articulações do joelho e quadril a 90°. Porém, vale a pena destacar que o modelo de órtese de resina acrílica utilizado neste trabalho se diferencia, pelo fato de manter as articulações do joelho e quadril livres (CANCELLIERO, 2004).

Não somente a posição articular e o tipo de fibra muscular analisada interferem nos resultados, mas também o período de desuso. Alguns trabalhos

sugerem que a maioria das mudanças ocorrem nos primeiros sete dias frente ao desuso muscular (BOOTH, 1977; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984; THOMASON et al., 1987; JÓZSA et al., 1988; OKITA et al., 2004). Outros autores apontam evidências que existem alterações na massa e na área das fibras musculares anteriormente ao período de 4 dias de desuso (KONDO et al., 1993; SMITH et al., 2000; BODINE et al., 2001; AHTIKOSKI et al., 2001; AHTIKOSKI et al., 2003). Desse modo, optou-se pela escolha dos períodos de 3, 7 e 15 dias de imobilização, já que segundo a literatura, é na primeira semana de desuso que ocorre a maioria das modificações, porém em outros períodos, também foram observados efeitos deletérios no sistema músculo-esquelético.

A imobilização durante 3 dias em posição neutra não promoveu alterações na massa do músculo sóleo, por outro lado ocorreu redução significativa de 31% da área das fibras musculares quando comparados ao grupo controle. Neste contexto, a variável área das fibras é mais precisa do que a massa do músculo, porque considerando que o músculo sóleo possui cerca de 3000 fibras, foram computadas a área de 375 fibras, portanto cerca de 12,5% das fibras deste músculo. Além disso, neste período houve aumento da densidade de área do tecido conjuntivo, o que pode ter alterado o valor da massa, já que para Nicks et al. (1989) a massa muscular pode ser alterada pelo aumento do tecido conjuntivo, bem como presença de edema.

Com relação à área da fibra, neste estudo foi encontrado o valor médio de $2574,88\mu\text{m}^2$ para o músculo sóleo do grupo controle, estando de acordo com os valores de referência apresentados pela literatura, que podem variar de 2084 a $3500\mu\text{m}^2$ (DELP e DUAN, 1996; COUTINHO et al., 2002; GOMES et al., 2004).

Alguns trabalhos foram direcionados para a avaliação dos efeitos da imobilização aguda no comprometimento do sistema músculo-esquelético. Smith et al. (2000) avaliaram o músculo sóleo de coelhos no segundo e sexto dia após imobilização em posição encurtada e observaram redução da massa muscular (15%), bem como da área de secção transversa (16%) em apenas dois dias de imobilização. Já no sexto dia foi observado redução de 26% da massa muscular e de 17% na área de secção transversa. Outros autores também relataram redução (19%) da massa muscular do sóleo de ratos após 4 dias de imobilização (KONDO et al., 1993).

Resultados semelhantes foram descritos por Ahtikoski et al. (2003), que estudaram a imobilização articular durante 3 dias em ratos e relataram redução de 20% da massa do músculo sóleo em posição encurtada e 17% em posição alongada.

Essa redução da área das fibras, bem como da massa do músculo sóleo ocorre pelas modificações no balanço da síntese e degradação protéica, já evidenciada nas fases precoces do desuso muscular. Nesse sentido, Booth e Sneider (1979), demonstram que ocorreu redução na síntese protéica de 37% já nas primeiras 6 horas de imobilização. Ainda foi observado nas primeiras 24 horas de suspensão, redução de 50% na síntese de proteínas do músculo sóleo de ratos (TAILLANDIER et al., 2003).

Com relação ao período de 7 dias, foi observado redução significativa de 35% na massa muscular, bem como de 44% na área das fibras musculares. Já no período de 15 dias de imobilização, também ocorreu redução significativa na ordem de 8% na massa muscular e de 37% na área das fibras, apontando para o

quadro de hipotrofia muscular, corroborando os resultados apresentados na literatura.

Segundo Qin et al. (1997) a imobilização por diferentes períodos resulta em atrofia variando de 15% a 70%, dependendo do animal utilizado e da fibra avaliada. Nesse contexto, Kannus et al. (1998) relataram redução de 69% da área das fibras do músculo sóleo imobilizado por meio de aparelho gessado durante 3 semanas. Para Gomes et al. (2004), a redução foi de 43% da área das fibras do músculo sóleo também imobilizado em posição encurtada durante 3 semanas. Picquet e Falempin (2003) observaram redução de força e da área das fibras, bem como transição de fibras lentas para rápidas no músculo sóleo em ratos submetidos ao modelo de suspensão durante 14 dias.

Bodine et al. (2001) compararam a massa do gastrocnêmio de ratos em três modelos de desuso, a imobilização, suspensão e denervação durante 14 dias. Foi observado que já nos primeiros 3 dias de desuso ocorreu redução de aproximadamente 10% da massa muscular nos três modelos estudados. Já na primeira semana, a redução foi de aproximadamente 30% da massa no modelo de imobilização e na denervação, e no modelo de suspensão a redução foi de 25%. Após 14 dias de desuso, ocorreu redução de aproximadamente 50% da massa muscular nos animais submetidos à denervação, 45% nos imobilizados e 30% nos submetidos à suspensão. Apesar do músculo estudado ter sido o gastrocnêmico, este estudo permite sugerir que nos primeiros 3 dias de desuso já existem alterações na massa muscular e que essas são mais importantes no décimo quarto dia de desuso. Porém, no presente trabalho foi observado uma maior redução na massa muscular, bem como na área das fibras no músculo sóleo no período de 7 dias.

Com relação à densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular, a literatura apresenta valores de 1 a 10% dependendo do músculo avaliado (FOIDART et al., 1981; LAWSON e PURSLOW, 2001; JARVINEN et al., 2002; TRAPPE et al., 2002). Neste estudo foi observado um valor de 8.82% de densidade de área do tecido conjuntivo no músculo sóleo do grupo controle, o que demonstra estar dentro dos valores de referência citados, e considerando que o material foi incluído em parafina.

A imobilização durante 3 dias promoveu aumento significativo de 296%, de 216% no sétimo dia, bem como de 161% no décimo quinto dia se comparados ao grupo controle, mostrando que a imobilização promoveu aumento da área ocupada pelo tecido conjuntivo. Esses resultados estão de acordo com a literatura, já que para Józsa et al (1988) e Józsa et al. (1990), independente do modelo de desuso muscular estudado (imobilização, tenotomia ou denervação), a quantidade de tecido conjuntivo no endomísio e perimísio aumenta significativamente, variando de 50% a 700%.

Nesse contexto, Williams e Goldspink (1984) observaram que em apenas 2 dias de imobilização em posição encurtada, o músculo sóleo apresentou aumento na quantidade de tecido conjuntivo no perímio. Ainda foi constatado por microscopia eletrônica de varredura, que as fibras de colágeno do perímio apresentavam um ângulo de fixação mais agudo do que o observado nos músculos normais, com conseqüente diminuição da elasticidade muscular e aumento da tensão passiva.

Além disso, alguns autores mostram alterações morfológicas provocadas pela imobilização, demonstrando que o aumento da densidade de área do tecido conjuntivo ocorre no endomísio e perímio (JÓZSA et al., 1988). Okita et al.

(2004) observaram que em 2 semanas de desuso ocorreu aumento do tecido conjuntivo, desarranjo das fibras de colágeno no endomísio, redução do comprimento dos sarcômeros, bem como da amplitude articular no músculo sóleo de ratos imobilizado em posição encurtada de tornozelo.

O tipo de fibra muscular parece influenciar as respostas do tecido conjuntivo frente ao desuso. Józsa et al. (1990), avaliaram o músculo sóleo e gastrocnêmio de ratos após 3 semanas e concluíram que ocorreu aumento do tecido conjuntivo tanto na tenotomia quanto na imobilização de forma mais expressiva no músculo sóleo do que no gastrocnêmio e na posição de encurtamento do que no alongamento.

Akeson et al. (1987) relataram que o processo de imobilização resulta em redução de componentes da matriz extracelular como de 40% no ácido hialurônico e de 30% na condroitina-4-sulfato e condroitina-6-sulfato, bem como redução da massa de colágeno na ordem de 10 % e aumento da renovação (“turnover”) do colágeno, com degradação e síntese aceleradas. Outros autores relatam que durante a imobilização também ocorre aumento do “turnover” do colágeno (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984). Para Salonen et al. (1985), há aumento de fibronectina e do colágeno tipo I e III no endomísio e perimísio em músculo imobilizado.

De maneira geral, Andrews et al. (2005) resumem os efeitos da imobilização sobre o tecido conjuntivo como: redução no conteúdo de água e de GAG (glicosaminoglicanas), diminuição da matriz extracelular, associada com diminuição na lubrificação entre as ligações cruzadas das fibras colágenas; redução da massa do colágeno, aumento do ritmo de renovação (degradação e de síntese do colágeno).

Nesse sentido, Amiel et al. (1982) observaram alterações no metabolismo de colágeno nos tecidos conjuntivos densos imobilizados, decorrentes da falta de forças fisiológicas atuando sobre eles, o que impede a formação de ligações cruzadas, dando origem a fibras imaturas, as quais são responsáveis pela fibrose. Além disso, com a imobilização articular, a falta de movimento perpetua uma orientação aleatória das fibrilas colágenas recém-sintetizadas, facilitando o surgimento de ligações cruzadas irregulares em regiões estratégicas do padrão trançado do colágeno (AKESON et al., 1987).

Este estudo sugere a necessidade de futuro trabalho, abordando a natureza desta matriz extracelular, com técnicas histoquímicas ou mesmo de biologia molecular.

Os resultados aqui apresentados mostram que a área das fibras musculares foi reduzida de forma significativa nos grupos imobilizados durante 3, 7 e 15 dias quando comparados ao grupo controle. Porém, foi observado aumento da área das fibras do grupo imobilizado durante 15 dias, em relação ao grupo 7 dias. Esses resultados podem ser justificados, pelo fato do modelo da órtese de resina acrílica utilizado, permitir que o animal realizasse descarga de peso no membro posterior, o que pode ter influenciado na recuperação da área das fibras, bem como da massa muscular em relação ao grupo imobilizado durante 7 dias, minimizando o quadro de hipotrofia muscular no décimo quinto dia de imobilização. Este fato sugere que este modelo não deva ser utilizado no período de 15 dias de imobilização, visto que o animal pode-se adaptar a ele.

A mesma explicação pode-se aplicar ao tecido conjuntivo, já que o maior valor de densidade foi observado no terceiro dia de imobilização e o mesmo foi reduzido de forma progressiva até o décimo quinto dia. Nesse sentido, como as

proteínas da matriz extracelular estão relacionadas com a atividade contrátil do músculo (WILLIAMS et al., 1988), quando o músculo sóleo foi solicitado à atividade devido à descarga de peso do membro posterior, possivelmente tenha ocorrido um melhor remodelamento dessas proteínas, com conseqüente diminuição da área ocupada pelo tecido conjuntivo durante os 15 dias de avaliação.

O resultado dos músculos dos membros contralaterais mostrou redução significativa da área das fibras nos grupos CC3 e CC7, bem como aumento da densidade do tecido conjuntivo nesses grupos. Diante da observação desses resultados, optou-se por avaliar o comportamento dos animais por meio do “open field”, já que não foi observado relato na literatura que contemplasse a redução da área das fibras musculares e o aumento da densidade do tecido conjuntivo desses grupos.

Desse modo, o deslocamento exploratório observado em “open field” do grupo controle, foi reduzido de forma gradativa até o 7º dia adaptando-se ao ambiente, sendo que nesse período, os valores dos campos observados foram similares ao grupo imobilizado. Por outro lado, o grupo imobilizado não manifestou o mesmo comportamento, demonstrando que a limitação funcional restringiu o desenvolvimento do caráter exploratório.

Assim, no teste de comportamento representado pela atividade locomotora espontânea em campo aberto, foi observado que a limitação funcional desencadeada pela imobilização promovida pela órtese de resina acrílica interferiu na atividade exploratória característica da espécie até o sexto dia de imobilização. Desse modo, sugere-se que o músculo sóleo adaptou-se a condição

de hipocinesia, repercutindo na redução da área das fibras e aumento da densidade de área do tecido conjuntivo nos grupos CC3 e CC7.

Já no grupo CC15, os valores da densidade do tecido conjuntivo não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, pois a partir do sétimo dia de imobilização, a condição de hipocinesia gerada pela órtese não foi observada, possibilitando que o músculo sóleo se adaptasse frente à nova condição, repercutindo na redução da proliferação do tecido conjuntivo até o décimo quinto dia. Além disso, ocorreu aumento significativo dos valores da massa muscular, bem como da área das fibras no grupo CC15 em relação ao grupo controle, possivelmente devido a uma sobrecarga gerada na pata contralateral devido aos 15 dias de imobilização.

Com relação à utilização da estimulação elétrica neuromuscular, o recurso promoveu aumento da área das fibras submetidas à imobilização nos 3 períodos estudados. No entanto, não reverteu o quadro de atrofia, visto que os valores foram menores do que o grupo controle. Resultado semelhante pode ser observado com a densidade de área do tecido conjuntivo. Esses resultados corroboram a afirmação de Avramidis et al. (2003) que descreveram a importância da estimulação elétrica com objetivos de recuperar a força muscular, reduzir o tempo de reabilitação e reduzir a atrofia muscular decorrente da imobilização.

A escolha dos parâmetros físicos para a estimulação elétrica utilizados nesse estudo se justifica pelo fato de trabalhos previamente realizados pelo grupo de pesquisa em modelos de desuso muscular demonstrarem que foram eficazes em reduzir os efeitos deletérios no sistema músculo-esquelético (SILVA et al., 1999; POLACOW et al., 2003; CANCELIERRO, 2004; FORTI et al., 2004; GUIRRO et al., 2004; DIAS et al., 2005).

Outros trabalhos demonstraram resultados semelhantes ao apresentado em relação à utilização da estimulação elétrica neuromuscular como intervenção em modelos de desuso muscular. Qin et al. (1997) utilizaram estimulação elétrica com frequência de 50Hz aplicada diariamente por 30 minutos, 5 vezes na semana durante 3 semanas no músculo tibial anterior de coelhos mantidos em posição neutra de imobilização, e relataram redução da atrofia muscular minimizando a redução da área de secção transversal, fibrose intersticial e deficiência de suprimento sanguíneo.

Estudo sobre os efeitos da estimulação elétrica, (f:10Hz, T:3ms, pulsos quadráticos bifásicos, On/Off de 2:2 segundos, 20 minutos) diariamente em músculo sóleo denervado por 15 dias mostrou redução da densidade de área do tecido conjuntivo, e aumento na quantidade de grânulos de glicogênio (POLACOW et al., 2003).

Williams et al. (1988) utilizaram estimulação elétrica neuromuscular com frequência de 5 Hz continuamente durante 7 dias associada com a imobilização articular em posição encurtada. No músculo sóleo que foi somente imobilizado, ocorreu redução no número de sarcômeros em série e aumento na quantidade de tecido conjuntivo por unidade de área do músculo. Por outro lado, quando a imobilização foi combinada com a estimulação elétrica, também ocorreu redução no número de sarcômeros em série, mas a quantidade de tecido conjuntivo permaneceu inalterada, mostrando que o recurso foi eficaz em prevenir a proliferação do tecido conjuntivo.

A estimulação elétrica neuromuscular (f:10Hz, 8h/dia) também mostrou-se eficaz em reduzir a atrofia no músculo sóleo de ratos em suspensão durante 21 dias. Os músculos submetidos ao desuso reduziram a sua massa em 56%, já

os submetidos ao recurso, a redução foi de 29%. Paralelamente, também ocorreu redução da área de secção transversal e da fração de proteínas miofibrilares (CANTON et al., 1995).

Mercier et al. (1999) demonstraram que a estimulação elétrica é eficaz na recuperação da atrofia muscular induzida por suspensão em ratos durante 21 dias nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos. Para tanto, utilizaram freqüências de 50 Hz, com largura de fase de 0,2 ms, 40 minutos diariamente, 6 dias por semana durante 14 dias após a imobilização. Observaram recuperação total da massa muscular em todos os músculos avaliados após a intervenção.

O interesse de se verificar os efeitos da estimulação elétrica neuromuscular tem levado a realização de vários estudos, utilizando-se de diferentes técnicas e parâmetros de aplicação da eletroestimulação. Nesse contexto, alguns resultados apresentados pela literatura no que se refere à estimulação elétrica “in vivo” são bastante contraditórios. Diferentes técnicas podem produzir resultados completamente diferentes, portanto, quando se discute técnicas terapêuticas, deve-se observar os seguintes parâmetros: a forma do pulso utilizado; a duração do pulso; o tipo de contração utilizada para estimular o músculo; a força de contração induzida; o número de contrações produzidas por período de tratamento; a duração de cada contração; o tempo de repouso entre as contrações; o número de sessões por dia e o número de sessões de tratamento por semana.

Nesse sentido, Lieber (2002), aponta três principais diferenças nos protocolos de estimulação elétrica neuromuscular aplicados nos estudos em seres humanos e animais, que certamente podem influenciar na disparidade dos resultados apresentados na literatura. Primeiramente os estudos em animais

geralmente são realizados com eletrodos implantados e nos seres humanos são realizados com eletrodos transcutâneos. Outro fator importante são as doses utilizadas, já que em animais são até mil vezes maiores do que as utilizadas em humanos, bem como o tipo de contração, pois nos estudos em humanos, geralmente são utilizadas as contrações isométricas e em animais, isotônicas.

Além disso, muitas pesquisas têm demonstrado falhas na descrição dos parâmetros metodológicos utilizados na estimulação elétrica. Para Robison e Snyder (2001), existem falhas nas descrições dos métodos, de forma precisa; muitos estudos não registram completamente detalhes experimentais importantes, tais como parâmetros de treinamento e características físicas da corrente. Porém, nos últimos anos tem ocorrido um maior controle de variáveis e uma maior uniformidade dos métodos de pesquisa (GUIRRO e GUIRRO, 2002). Dessa forma, torna-se extremamente importante a padronização dos estudos que envolvem a estimulação elétrica neuromuscular para possibilitar a reprodutividade, bem como comparações entre os diversos trabalhos.

Considerações devem ser feitas em relação à escassez de trabalhos que utilizam a estimulação elétrica neuromuscular em períodos agudos de imobilização. Nesse sentido, há necessidade de um maior número de estudos, com análises diversificadas que contemplem esse período de imobilização.

Outro ponto merecedor de destaque foi a eficácia do recurso em minimizar os efeitos deletérios do desuso muscular principalmente no período agudo da imobilização, sugerindo que a intervenção seja iniciada o mais precocemente possível, principalmente em pacientes imobilizados por aparelho gessado. Este recurso, aplicado precocemente pode minimizar os efeitos deletérios a longo prazo, bem como reduzir o tempo de reabilitação.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imobilização do membro posterior em posição neutra do tornozelo promovida pela órtese de resina acrílica:

Não promoveu redução da massa do músculo sóleo durante 3 dias. Por outro lado, foi observado redução da massa nos períodos de 7 e 15 dias de imobilização.

Promoveu redução da área das fibras do músculo sóleo, além de aumento da densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular durante 3, 7 e 15 dias.

Não promoveu, durante 3 e 7 dias, alterações da massa muscular no sóleo da pata contralateral. Porém, foi observado aumento da massa, bem como da área das fibras do músculo sóleo na pata contralateral no período de 15 dias de imobilização.

Promoveu aumento da densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular, bem como redução da área das fibras do músculo sóleo na pata contralateral nos períodos de 3 e 7 dias de imobilização.

A imobilização induzida pela órtese de resina acrílica promoveu alterações morfométricas nos 3 períodos de avaliação. Porém, devido a descarga

de peso no membro posterior gerada pelo modelo, os períodos de 3 e 7 dias de imobilização apresentaram alterações mais significativas, sugerindo que em futuros, esses períodos sejam abordados.

O tratamento com a estimulação elétrica neuromuscular minimizou a redução da área das fibras musculares, bem como o aumento da densidade do tecido conjuntivo em todos os grupos submetidos à imobilização, sendo um recurso importante na tentativa de manter a integridade das fibras musculares durante o processo de desuso, com destaque para o período de 3 dias de imobilização.

Como a imobilização articular é uma condição freqüente para o Fisioterapeuta, os resultados apresentados nesse trabalho podem ter importância para a prática clínica, tendo em vista que, embora este estudo tenha sido realizado em condições experimentais com animais, sugere a utilização da estimulação elétrica neuromuscular como intervenção em pacientes imobilizados no sentido minimizar alguns efeitos deletérios inerentes a essa condição.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, R.A.; TSAI, A.M.; WATSON, B.; JAMALI, A.; LIEBER, R.L. Skeletal muscle recovery after tenotomy and 7-day delayed muscle length restoration.

Muscle Nerve, v.23, n.5, p.707-14, 2000.

AHTIKOSKI, A.M.; KOSKINEN, S.O.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V.; TAKALA, T.E. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**,

v.172,p.131-140, 2001.

AHTIKOSKI, A.M.; KOSKINEN, S.O.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V.; RISTELI, J.; TAKALA, T.E. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**,

v.177,p.473-81, 2003.

AKESON, W.H.; AMIEL, D.; ABEL, M.F.; GARFIN, S.R.; WOO, S.L. Effects of immobilization on joints. **Clin Orthop Relat Res**, v.219, p.28-37, 1987.

AMIEL, D.; WOO, S.L.; HARWOOD, F.L.; AKESON, W.H. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. **Acta orthop scan**, v.53, p.325-332, 1982.

ANDERSEN, J.L.; GRUSCHY-KNUDSEN, T.; SANDRI, C.; LARSSON, L.; SCHIAFFINO, S. Bed rest increases the amount of mismatched fibres in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v.86, p.455-460, 1999.

ANDREWS, J.R.; HARRELSON, G.L.; WILK, K.E. **Reabilitação física do Atleta**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

APPELL, H.J. Skeletal muscle atrophy during immobilization. **Int J Sports Med**, v.7, p.1-5, 1986.

APPELL, H.J. Muscular atrophy following immobilization. **Sports Med**, v.7, p.42-58, 1990.

ARVIDSSON, I.; ARVIDSSON, H.; ERIKSSON, E.; JANSSON, E. Prevention of quadriceps wasting after immobilization: an evaluation of the effect of electrical stimulation. **Orthopedics**, v.9, p.1519-28, 1986.

AVRAMIDIS, K.; STRIKE, P.W.; TAYLOR, P.N.; SWAIN, I.D. Effectiveness of electric stimulation of the vastus medialis muscle in the rehabilitation of patients after total knee arthroplasty. **Arch Phys Med Rehabil**, v.84, p.1850-53, 2003.

BODINE, S.C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V.K.; GLASS, D.J. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. **Science**, v.1704, p. 1704-1708, 2001.

BOOTH, F.W.; KELSO, J.R. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. **Plurgers Arch**, v.342, p.231-338, 1973.

BOOTH, F.W.; SEIDER, M.J. Early change in skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. **J Appl Physiol**, v.47, p.974-7, 1979.

BOOTH, F.W. Time course of muscular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. **J Appl Physiol**, v.43, p.656-61, 1977.

BOOTH, F.W. Physiologic and biomechemical effects of immobilization on muscle. **Clin Orthop**, v.219, p.15-20, 1987.

BUCK, C.; HOROWITZ, A. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. **Ann. Rev. Cell Biol**, v.3, p.179-205, 1987.

BURKIN, D.; KAUFMAN, S.; The $\alpha7\beta1$ integrin in muscle development and disease. **Cell Tissue Res**, v.296, p.183-190, 1999.

CABRIC, M.; APPELL, H.J. Effect of electrical stimulation of high and low frequency on maximum isometric force and some morphological characteristics in men. **Int Journal Sport Med**, v.8, p.256-60, 1987.

CABRIC, M.; APPELL, H.J.; RESIC, A. Effects of electrical stimulation of different frequencies on the myonuclei and fiber size in human muscle. **Int Journal Sport Med**, v.8, p.323-6, 1987.

CANCELLIERO, K.M. **Estimulação elétrica neuromuscular associada ao clenbuterol melhora o perfil metabólico muscular de membro imobilizado de ratos**. Piracicaba. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Universidade Metodista de Piracicaba, 2004.

CANCELLIERO, K.M.; DIAS, C.K.N.; SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J. Imobilização altera o conteúdo de glicogênio e peso muscular de acordo com o período e a posição articular. **Rev Bras Fisioter**, v.9, 2005,

CANCELLIERO, K.M.; FORTI, F.; ; SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J. Calcitonina inibe os efeitos benéficos da estimulação elétrica no músculo esquelético. In: FeSBE - XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. **Anais.**, p.115-115, 2003.

CANTON, F.; BIGARD, A.X.; MERINO, D.; LIENHARD, F.; GUEZENNEC, C.Y. Effects of chronic low frequency stimulation on structural and metabolic properties of hindlimb suspended rat soleus muscle. **Eur J Physiol Occup Physiol**, v.70, p.528-35, 1995.

CARMELI, E.; HOCHBERG, Z.; LIVNE, E.; LICHTENSTEIN, I.; KESTELBOIM, C.;

SILBERMANN, M.; REZNICK, A.Z. Effect of growth hormone on gastrocnemius muscle of aged rats after immobilization: biochemistry and morphology. **J Appl Physiol**, v.230, n.4, p.1529-35, 1993.

CLEMENTE, F.R.; MATULIONIS, D.H.; BARRON, K.W.; CURRIER, D.P. Effect of motor neuromuscular electrical stimulation on microvascular perfusion of stimulated rat skeletal muscle. **Phys Ther**, v.71, p.397-404, 1991.

COUTINHO, E.L.; GOMES, A.R.; FRANCA, C.N.; SALVINI, T.F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1329-32, 2002.

CURRIER, D.P.; PETRILLI, C.R.; THRELKELD, A.J. Effect of graded electrical stimulation on blood flow to healthy muscle. **Phys Ther**, v.66, p.937-43, 1986.

DE LARCERDA, C.A.M. **Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria, esterilogia**, 2.ed. Rio de Janeiro:CEBIO, 1994.

DELFINO, G.B.; CANCELLIERO, K.M.; SILVA, C.A. Comportamento metabólico de músculo esquelético imobilizado de ratos: efeito do sulfato de vanadil. In: IV Semana de Reunião da Biologia. **Anais.**, 2005. CD-ROM.

DELP, M.D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity in rat muscle. **J Appl Physiol**, v.26, p.261-270, 1996.

DIAS, C.K.N.; SILVA, C.A.; CHINGUI, L.; CANCELLIERO, K.M. Proposta de imobilização de membro posterior de ratos em encurtamento muscular com órtese de resina acrílica. In: XIX Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. **Anais.**, 2004. CD-ROM.

DIAS, C.N.K.; SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; CANCELLIERO, K.M.; DURIGAN, J.L.Q.; CHINGUI, L. Estimulação elétrica de baixa frequência previne alterações

metabólicas decorrentes da imobilização durante 7 dias e minimiza período de recuperação. In: XX Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.

Anais., 2005. CD-ROM.

DIAS, C.N.K.; SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; CANCELLIERO, K.M.; DURIGAN, J.L.Q. Exercício anaeróbico melhora o perfil metabólico muscular do membro posterior imobilizado de ratos. In: XX Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. **Anais.**, 2005. CD-ROM.

DURIGAN, J.L.D.; CANCELLIERO, K.M.; POLACOW, M.L.O.; SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J. Modelos de desuso muscular e estimulação elétrica neuromuscular: aspectos pertinentes à reabilitação. **Fisio Mov**, 2005.

ELDER, G.C.B.; McCOMAS, A.J. Development of rat muscle during short and long term hindlimb suspension. **J Appl Physiol**, v.53, p.1401-1408, 1987.

ETGEN, G.J.; FARRAR, R.P.; IVY, J.L. Effect of chronic electrical stimulation on GLUT 4 protein content in fast-twitch muscle. **Am J Physiol**, v.264, p.816-19, 1993.

FITTS, R.H.; METZGER, J.M.; RILEY, D.A.; UNSWORTH, B.R. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. **J Appl Physiol**, v.60, p.1946-53, 1986.

FERRANDO, A.A.; LANE, H.W.; STUART, C.A.; DAVIS-STREET, J.; WOLFE, R.R. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. **Am J Physiol**, v.270, p.627-33, 1996.

FOIDART, M.; FOIDART, J.M.; ENGEL, W.K. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. **Arch Neurol**, v.38, p.152-157, 1981.

FORTI, F.; CANCELLIERO, K.M.; GUIRRO, R.R.J.; SILVA, C.A. . Efeitos da

glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. **Rev Bras Educ Fís Esp**, v.18, p.273-281, 2004.

FOSTER, R.F.; THOMPSON, J.M.; KAUFMAN, S.J. A laminin substrate promotes myogenesis in rat skeletal- muscle cultures- analysis of replication and development using antidesmin and anti- brdurd monoclonal antibodies. **Dev Biol**, v.122, p.11-20, 1987.

FOURNIER, M.; ROY, R.R.; PERHAM, H.; SIMARD, C.P.; EDGERTON, V.R. Is limb immobilization a model of muscle disuse. **Exp Neurol**, v.80, p.147-156, 1983.

GOMES, A.R.S.; COUTINHO, E.L.; FRANÇA, C.N.; POLONIO, J.; SALVINI, T.F. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Braz J Med Biol Res**, v.37, p.1473-1480, 2004.

GUIRRO, R.; NUNES, C.V.; DAVINI, R. Comparação dos efeitos de dois protocolos de estimulação elétrica neuromuscular sobre a força muscular isométrica do quadríceps. **Rev Fisioter Univ São Paulo**, v.7, p.10-5, 2000.

GUIRRO, E.C.O.; GUIRRO, R.R.J. **Fisioterapia dermatofuncional fundamentos, recursos, patologias**. 3.ed. São Paulo: MANOLE, 2002.

GUIRRO, R.R.J.; SILVA, C.A.; FORTI, F.; CANCELLIERO, K.M.. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. **Rev Bras Fisioter**, v.8, p.21-27, 2004.

HAMADA, T.; SASAKI, H.; HAYASHI, T.; MORITANI, T.; NAKAO, K. Enhancement of whole body glucose uptake during and after human skeletal muscle low-frequency electrical stimulation. **J Appl Physiol**, v.94, p.2107-2112, 2003.

HENRIKSEN, E.J.; RODNICK, K.J.; MONDON, C.E.; JAMES, D.E.; HOLLOSZY, J.O. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle.

J Appl Physiol, v.70,p.2322-2327, 1991.

HERBISON, G.J.; JAWEED, M.M.; DITUNNO, J.F. Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. **Arch Phys Med Rehabil**, v.59, p.301-5, 1978.

HERRERA, N.M.J.R.; ZIMMERMAN, A.N.; DYKSTRA, D.D.; THOMPSON, L.V. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. **Arch Phys Med Rehabil**, v.82, p.930-934, 2001.

HERRING, S.W.; GRIMM, A.F.; GRIMM, B.R. Regulation of sarcomere number in skeletal muscle: A comparison of hypotheses. **Muscle Nerve**, v.7, p.161-173, 1984.

HESLINGA, H.J.; KRONNIE, G.; HUIJING, P.A. Growth and immobilization effects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscles of the adult rat. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v.70, p.49-57, 1995.

HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H.; YASUHARA, S.; MARTYN, J.A. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.279, n.1235-1241, 2000.

HUDLICKA, O.; DODD, L.; RENKIN, E.M.; GRAY, S.D. Early changes in fiber profile and capillary density in long-term stimulated muscles. **Am J Physiol**, v.243, p.528-35, 1982.

HUXLEY, H.E. The mechanism of muscular contraction **Clin Orthop Relat Res**, v.403, p.6-17, 2002.

JAFFE, D.M.; TERRY, R.D.; SPIRO, A.J. Disuse atrophy of skeletal muscle: a morphometric study using image analysis. **Journal Neurol Sci**, v.35, p-189-200, 1978.

JAKUBIEC-PUKA, A.; CATANI, C.; CARRARO, U. Myosin heavy-chain

composition in striated muscle after tenotomy. **Biochem J**, v.15, n.282, p.237-42, 1992.

JARVINEM, M.; EINOLA, S.A.; VIRTANEN, E.O. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. **Arch Phisys Med Rehabil**, v.73, p.253,257, 1992.

JARVINEN, T.A.; JÓZSA, L.; KANNUS, P.; JARVINEN, T.L.; JARVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. **J Muscle Res Cell Moti**, v. 23, p.345-254, 2002.

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. **Exp Mol Pathol**, v.49, p.267-278, 1988.

JÓZSA, L.; KANNUS, P.; THORING, J.; REFFY, A.; JARVINEN, M.; KVIST, M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. **J Bone Joint Surg**, v.72, p.293-7, 1990.

LAWLER, J.M.; SONG, W.; DEMAREE, S.R. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. **Free Radic Biol Med**, v.35, p.9-16, 2003.

LAWSON, M.A.; PURSLOW, P.P. Development of components of the extracellular matrix, basal lamina and sarcomere in chick quadriceps and pectorallis muscle. **Br Poultry Sci**, v.42, p.315-320, 2001.

LEIVSETH, G.; TINDALL, A.; MYKLEBUST, R. Changes in guinea pig muscle histology in response to reduced mobility. **Muscle Nerve**, v.10, p.410-14, 1987.

LIEBER, R.L.; FRIDEN, J.O.; HARGENS, A.R.; DANZIG, L.A.; GERSHUNI, D.H.

Differential response of the dog quadriceps muscle to external skeletal fixation of the knee. **Muscle Nerve**, v.11, p. 193-201, 1988.

LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure, function, and plasticity, the physiological basis of rehabilitation**. 2.ed. Philadelphia: LIPPINCOTT, 2002.

KANAYA, F.; TAJIMA, T. Effect of electrostimulation on denervated muscle. **Clin Orthop Relat Res** , v.283, p.296-301, 1992.

KANNUS, P.; JÓZSA, L.; JARVINEN, T.L.; KVIST, M.; VIENO, T.; JARVINEN, T.A. Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. **J Appl Physiol**, v.84, p.1418-24, 1998.

KITCHEN, S; BAZIN, S. **Eletroterapia: Prática baseada em evidências**. 11º ed. São Paulo: MANOLE, 2003.

KONDO, H.; NAKAGAKI, I.; SASAKI, S.; HORI, S.; ITOKAWA Y. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. **Am J Physiol**, v.265, p.839-844, 1993.

KOURTIDOU-PAPADELI, C.; KYPAROS, A.; ALBANI, M.; FROSSINIS, A.; PAPADELIS, C.L.; BAMIDIS, P.; VIVAS, A.; GUIBA-TZIAMPURI, O. Electrophysiological, histochemical, and hormonal adaptation of rat muscle after prolonged hindlimb suspension. **Acta Astronautica**, v.54, p.737-747, 2004.

KROLL, T.G.; PETERS, B.P.; HUSTAD, C.M.; JONES, P.A.; KILLEN, P.D.; RUDDON, R.W. Expression of laminin chains during myogenic differentiation. **J Biol. Chem.**, v.269, p.9270- 9277, 1994.

MACDOUGALL, J.D.; WARD, G.R.; SALE, D.G.; SUTTON, J.R. Biochemical adaptation of human skeletal muscle to heavy resistance training and immobilization. **J Appl Physiol**, v.43, p.700-3, 1977.

MACDOUGALL, J.D.; ELDER, G.C.; SALE, D.G.; MOROZ, J.R.; SUTTON, J.R. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibers. **Eur J Appl Physiol**, v.43, p.25-34, 1980.

MATHIEU, O.; CRUZ-ORIVE, L.M.; HOPPELER, H.; WEIBEL, E.R. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. **J Microsc**, v.121, p.75-88, 1981.

MCNULTY, A.L.; OTTO, A.J.; KASPER, C.E.; THOMAS, D.P. Effect of recovery mode following hind-limb suspension on soleus muscle composition in the rat. **Int J Sports Med**, v.13, p.6-14, 1992.

MERCIER, C.; JOBIN, J.; LEPINE, C.; SIMARD, C. Effects of hindlimb suspension on contractile properties of young and old rat muscles and the impact of electrical stimulation on the recovery process. **Mech Ageing Dev**, v.106, p.305-320, 1999.

MITCHELL, P.O., PAVLATH, G.K. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. **Cell Physiol**, v.281, p.1706-1715, 2001.

MISAWA, A.; SHIMADA, Y.; MATSUNAGA, T.; SATO, K. The effects of therapeutic electric stimulation on acute muscle atrophy in rats after spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v.82, p.1596-603, 2001.

MONDON, C.E.; RODNICK, K.J.; DOLKAS, C.B.; AZHAR, S.; REAVEN, G.M. Alterations in glucose and protein metabolism in animals subjected to stimulated microgravity, **Adv Space Res**, v.12, p.169-177, 1992.

MOREY, E.R.; SABELMAN, E.E.; TURNER, R.T.; BAYLINK, D.J. A new rat model simulation some aspects of space flight. **Physiologist**, v.22, p.523-524, 1979.

MUSACCHIA, X.J.; STEFEN, J.M.; FELL, R.D. Disuse atrophy of skeletal muscle:

animal models. **Exerc Sport Sci Rev**, v.16, p.61-87, 1988.

MYRHAGE, R.; HUDLICKA, O. Capillary growth in chronically stimulated adult skeletal muscle as studied by intravital microscopy and histological methods in rabbits and rats. **Microvasc Res**, v.16, p.73-90, 1978.

NEMETH, P.M. Electrical stimulation of denervated muscle prevents decreases in oxidative enzymes. **Muscle Nerve**. v.5, p.73-90, 1982.

NICKS, D.K.; BENEKE, W.M.; KEY, R.M.; TIMSON, B.F. Muscle fibre and number following immobilization atrophy. **J Anat**, v.163, p.1-5, 1989.

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

OTEY, C.A.; PAVALKO, F.M.; BURRIDGE, K. Na interaction between α -actinin and the β 1 integrin subunit in vitro. **J Cell Biol**, v.111, p.721-729, 1990.

PACHTER, B.R.; EBERSTEIN, A.; GOODGOLD, J. Electrical stimulation effect on denervated skeletal myofibers in rats: a light and electron microscopic study. **Arch Phys Med Rehabil**, v.63, p.427-30, 1982.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v.14, p.149-167, 1985.

PETERMANN, C.E.D.; CANCELLIERO, K.M.; SILVA, C.A. Nifedipina melhora o perfil energético do músculo esquelético de rato imobilizado em posição neutra. In: 2º Congresso Brasileiro de Traumatologia do Esporte. **Anais.**, 2004. CD-ROM.

PICQUET, F.; FALEMPIN, M. Compared effects of hindlimb unloading versus

terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus. **Exp Neurol**, v.182, p.186-164, 2003.

PLOUG, T.; OHKUWA, T.; HANDBERG, A.; VISSING, J.; GALBO, H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.268, p.980-986, 1995.

PODLESKI, T.R.; GREENBERG, I.; SCHLESSINGER, J.; YAMADA, K.M. Fibronectin delays the fusion of L6 myoblasts. **Exp. Cell Res**, v.122, p.317- 326, 1979.

POLACOW, M.L.O.; SILVA, A.C.; GUIRRO, R.R.J.; CAMPOS, M.R.; BORGES, J.P. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. **Rev bras fisioter**, v.7, p77-84, 2003.

QIN, L.; APPELL, H.J.; CHAN, K.M.; MAFFULLI, N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. **Arch Phys Med Rehabil**, v.78, p.512-7, 1997.

REARDON, K.A.; DAVIS, J.; KAPSA, R.M.; CHOONG, P.; BYRNE, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. **Muscle Nerve**, v.24, p.893-9, 2001.

ROBINSON, J.A.; SNYDER, M.L. **Eletrofisiologia clínica – Eletroterapia e teste eletrofisiológico**. 2. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2001.

ROYCE, J.T. On the construct validity of open field measures. **Psychol Bull**, v.84, p.1098-1106, 1977.

SALONEN, V.; LEHTO, M.; KALIMO, M.; PENTTINEN, R.; ARO, H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. **Muscle Nerve**, v.8,

p.125-135, 1985.

SALVINI, T.F. Plasticidade e adaptação dos músculos esqueléticos. In: MARQUES, A.P. **Cadeias musculares. Um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global.** São Paulo: MANOLE, 2000.

SANES, J.R., ENGEL A.G., FRANZINI-ARMSTRONG, C. The extracellular matrix. In: **Myology - Basic and Clinical**, 2. ed. New York: MCGRAW-HILL, 1994.

SAVOLAINEN, J.; VAANANEN, K.; PURANEN, J.; TAKALA, T.E.; KOMULAINEN, J.; VIHKO, V. Collagen synthesis and proteolytic activities in rat skeletal muscle: effect of cast-immobilization in the lengthened and shortened positions. **Arch Phys Med Rehabil**, v.69, p.964-969, 1988.

SCHWARZENBECK, A.; DIAS, C.K.N.; SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J. Avaliação mecânica do músculo esquelético imobilizado. In. Anais do XI Congresso Nacional de Biomecânica, **Anais.**, 2005. CD-ROM

SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; POLACOW, M.L.O.; SILVA, H.C.; TANNO, A.P.; RODRIGUES, D. Efeito da meformina e estimulação elétrica sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo normal e denervado. **Rev Bras Fisiot**, v.3, p.55-60, 1999.

SMITH, H.K.; MAXWELL, L.; MARTYN, J.A.; BASS, J.J. Nuclear DNA fragmentation and morphological alteration in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. **Cell Tissue Res**, v.302, p.235-241, 2000.

TAILLANDIER, D.; AUROUSSEAU, E.; COMBARET, L.; GUEZENNEC, C.Y.; ATTAIX, D. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. **Int J Biochem Cell Biol**, v.35, p.665-75, 2003.

TANAKA, T.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Histochemical study on the changes in

muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. **J Orthop Sci**, v.9, p.76-85, 2004.

TARDIEU, C.; TABARY, J.C.; TABARY, C.; TARDIEU, G. Adaptation of connective tissue length to immobilization in the lengthened and shortened position in cat soleus muscle. **J Physiol**, v.78, p.214-20, 1982.

THOMASON, D.B.; HERRICK, R.E.; SURDYKA, D.; BALDWIN, K.M. Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. **J Appl Physiol**, v.63, p.130-37, 1987.

THOMASON, D.B.; BOOTH, F.W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. **J Appl Physiol**, v.68, p.1-12, 1990.

THOMPSON, L.V.; JOHNSON, S.A.; SHOEMAN, J.A. Single soleus muscle fiber function after hindlimb unweighting in adult and aged rats. **J Appl Physiol**, v.84, n.6, p.1937-1942, 1998.

TRAPPE, T.A.; CARRITHERS, J.A.; WHITE, F.; LAMBERT, C.P.; EVANS, W.J.; DENNIS, R.A. Titin and nebulin content in human skeletal muscle following eccentric resistance exercise. **Muscle Nerve**, v.25, p.289-292, 2002.

TRERIAULT, R.; TRERIAULT, G.; SIMONEAU, J.A. Human skeletal muscle adaptation in response to chronic low frequency stimulation. **J Appl Physiol**, v.77, p.1885-1889, 1994.

WAGATSUMA, A.; FIJIMOTO, K.; YAMADA, S. Effect of treatment with nifedipine, an L-type calcium channel blocker, on muscular atrophy induced by hindlimb immobilization. **Scand J Med Sci Sports**, v.12, p.26-30, 2002.

WILLIAMS, P.E.; GOLDSPINK, G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. **J Anat**, v.116, p.45-55, 1973.

WILLIAMS, P.E.; GOLDSPINK, G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. **J Anat**, v.127, p.459-68, 1978.

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

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. **J Anat**, v.158, p.109-114, 1988.

YANG, H.; ALNAQEEB, M.; SIMPSON, H.; GOLDSPINK, G. Changes in muscle fiber type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. **J Anat**, v.190, p.613-22, 1997.

ZIERATH, J.R., HAWLEY, J.A. Skeletal muscle fiber type: Influence on contractile and metabolic properties. **Plos Biology**, v.10, p.337-348, 2004.

9. APÊNDICE

Tabela 3. Valores de probabilidades (p) nível crítico para o teste de Tukey HSD (Statistica® 6.1) para a variável massa muscular.

Grupos	P valor
CxI3	0.9595
CxI7	0.0001
CxI15	0.0036
I3xI7	0.0001
I3xI15	0.0030
I7xI15	0.0002
CxIEE3	0.9945
CxIEE7	0.0001
CxIEE15	0.0028
I3xIEE3	0.9387
I7xIEE7	0.9999
I15xIEE15	0.0008
IEE3xIEE7	0.0001
IEE3xIEE15	0.0020
IEE7xIEE15	0.0001
CxCC3	0.8735
CxCC7	1
CxCC15	0.0001
CC3xCC7	0.8735
CC3xCC15	0.0001
CC7xCC15	0.0001

Tabela 4. Valores de probabilidades (p) nível crítico para o teste de Tukey HSD

(Statistica® 6.1) para a área das fibras do músculo sóleo.

Grupos	P valor
CxI3	0.000007
CxI7	0.000007
CxI15	0.000007
I3xI7	0.000007
I3xI15	0.000007
I7xI15	0.000007
CxIEE3	0.000025
CxIEE7	0.000025
CxIEE15	0.000025
I3xIEE3	0.000025
I7xIEE7	0.000025
I15xIEE15	0.000025
IEE3xIEE7	0.000025
IEE3xIEE15	0.000025
IEE7xIEE15	0.000025
CxCC3	0.000007
CxCC7	0.000007
CxCC15	0.000007
CC3xCC7	0.826274
CC3xCC15	0.000007
CC7xCC15	0.000007

Tabela 5. Valores de probabilidades (p) nível crítico para o teste de Tukey HSD

(Statistica® 6.1.) para a variável densidade de área do tecido conjuntivo.

Grupos	P valor
CxI3	0.000007
CxI7	0.000007
CxI15	0.000007
I3xI7	0.000007
I3xI15	0.000007
I7xI15	0.000009
CxIEE3	0.000025
CxIEE7	0.000025
CxIEE15	0.000025
I3xIEE3	0.000025
I7xIEE7	0.000025
I15xIEE15	0.000025
IEE3xIEE7	0.535772
IEE3xIEE15	0.435107
IEE7xIEE15	0.435107
CxCC3	0.000007
CxCC7	0.000007
CxCC15	0.508639
CC3xCC7	0.615361
CC3xCC15	0.000007
CC7xCC15	0.000007

Tabela 6. Valores de probabilidades (p) nível crítico para o teste “t” de student (Statistica® 6.1) para a variável movimentação exploratória.

Grupos	P valor
Cxl 1º dia	0.0067
Cxl 2º dia	0.0334
Cxl 3º dia	0.0215
Cxl 4º dia	0.0125
Cxl 5º dia	0.0300
Cxl 6º dia	0.0250
Cxl 7º dia	0.8651