

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Resposta fisiológica de músculos esqueléticos de ratos na fase aguda  
da imobilização do tornozelo na posição de 90°**

**Luciano Júlio Chingui**

**2008**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

### Ficha Catalográfica

Chingui, Luciano Júlio  
Resposta fisiológica de músculos esqueléticos de ratos na fase aguda da  
imobilização do tornozelo na posição de 90<sup>0</sup>.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Silva.  
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba.

84p

1. fisioterapia 2. imobilização 3. glicogênio 4. atrofia 5. TBARS  
I. Silva, Carlos Alberto. II. Universidade Metodista de Piracicaba,  
Programa de Pós- graduação em Fisioterapia. III Título.

## **Agradecimentos**

***A realização de um trabalho científico envolve inúmeras pessoas de diferentes locais, grupos e áreas, nesse sentido, os nossos agradecimentos formais sempre são de certa forma exclusivos, nunca conseguem contemplar e citar todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do trabalho, porém, mesmo sabendo dessa falha passível de ocorrer, vou direcionar meus agradecimentos à algumas personalidades que foram muito importantes.***

***Agradeço ao professor Carlos, grande orientador e amigo, por ter depositado em mim tamanha credibilidade, pelo constante e incansável incentivo, por ter combatido comigo todas as minhas batalhas sem pestanejar, por ser essa pessoa ímpar, abençoada e abençoadora que não apenas ensina a fazer ciência, mas, também tem o dom de ensinar seus alunos a serem melhores seres humanos.***

***À minha família, especialmente a minha irmã Sofia, meu filho Matheus e meu primo Goio, pelo apoio irrestrito, paciência e compreensão pelos momentos de ausência.***

***Aos amigos do grupo de pesquisa: Thereza, Karina, Rommel, Gabriel, João e Paula pela amizade, pelos momentos de alegria que vivemos juntos, pelo apoio, e pela colaboração na realização deste trabalho.***

***Às minhas amigas sempre presentes, dedicadas e preocupadas com a minha causa: Dulce Helena e Miriam Castro, pela amizade e apoio absoluto e incondicional.***

***Às técnicas do laboratório de Fisiologia: Patrícia e Melissa, pelos ensinamentos, pelo socorro nos momentos de apuro, por estarem sempre prontas a responder nossos questionamentos e nos ajudar nos experimentos.***

***Aos amigos e técnicos do laboratório de Fisioterapia: Celso e Marcos, pelo apoio e compreensão das minhas ausências quando bolsista.***

***Aos professores membros da banca, que prontamente aceitaram o convite para avaliar o trabalho e dar suas valiosas contribuições.***

***Por fim, ao poderoso Deus que nos deu o dom da vida, inteligência e possibilita a todos nós a apreciação da beleza científica, nos orienta e ajuda a realizar tantos feitos belos ao longo da vida. Sem Ele, nossas realizações seriam impossíveis.***

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar, na fase aguda da imobilização, a resposta quimio-metabólica da musculatura esquelética imobilizada. Para tanto, foram utilizados ratos *Wistar* com 3 meses de idade, mantidos em condições controladas de biotério e distribuídos em 4 grupos experimentais de n=6: grupo controle (C); imobilizado 1 dia (I1), 2 dias (I2) e 3 dias (I3). Para a imobilização foi utilizado um modelo de órtese de resina acrílica que permitiu a manutenção da articulação do tornozelo em 90° e as articulações do joelho e quadril livres. Após o período experimental os animais foram sacrificados e coletadas amostras de plasma, fígado (F) e dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM), os quais foram encaminhados para as seguintes análises: determinação do glicogênio muscular e hepático; mensuração da relação DNA/proteínas totais musculares; determinação do índice de hidratação e do peso muscular do músculo (S); análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) muscular e plasmático; análise da proteína carbonilada plasmática; avaliação da secreção de insulina; teste de tolerância à insulina; mensuração da captação de 2-deoxiglicose e determinação da concentração plasmática de corticosterona. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste (kolmogorov-Smirnov), análise de variância e teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Quanto aos resultados, observa-se que as alterações peculiares da fase aguda têm comportamento progressivo. Assim, a concentração do glicogênio muscular do (S) sofreu redução progressiva do primeiro ao terceiro dia, enquanto que nos músculos (GB) e (GM) houve no primeiro dia aumento nas reservas glicogênicas, seguido de redução no segundo e terceiro dia; quanto à relação DNA/proteína total houve aumento concomitante ao aumento do índice de hidratação e à redução do peso do (S); as concentrações plasmáticas de TBARS e proteína carbonilada aumentaram a partir do segundo dia, ao passo que as concentrações musculares de TBARS não sofreram alterações significativas; a secreção de insulina aumentou no segundo dia; a sensibilidade tecidual à insulina foi maior no segundo e terceiro dia, porém, não houve alterações na glicemia basal; a captação de 2-deoxiglicose foi maior no primeiro dia; a corticosterona plasmática teve grande aumento no primeiro dia, seguido de redução no segundo e terceiro dia, porém permaneceu além dos níveis normais; as reservas glicogênicas hepáticas não sofreram alterações significativas. Diante da análise dos resultados conclui-se que a musculatura esquelética submetida à imobilização sofre processos deletérios que desencadeiam alterações quimio-fisiológicas, reduzem a homeostasia energética e funcional e assim predis põem precocemente ao desenvolvimento da hipotrofia.

**Palavras chave:** Imobilização, Fisioterapia, atrofia, glicogênio, reabilitação, TBARS

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1	Fisiologia das fibras musculares.....	16
2.2	Imobilização .....	18
2.3	Espécies reativas de oxigênio .....	22
2.3.1	Geração de espécies reativas de oxigênio.....	23
2.3.2	Fontes biológicas de EROs.....	23
2.3.3	Sistemas de defesa contra a agressão oxidativa.....	25
2.4	Danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio.....	27
2.4.1	Oxidação de proteínas.....	27
2.4.2	Oxidação de lipídios ou liporeroxidação .....	27
2.4.3	Oxidação de carboidratos.....	28
2.4.4	Alterações no genoma.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Animais.....	32
4.2	Imobilização.....	32
4.3	Amostragem.....	33
4.4	Determinação do glicogênio muscular e hepático.....	33
4.5	Determinação das proteínas totais musculares.....	34
4.6	Determinação do DNA muscular.....	34
4.7	Determinação do índice de hidratação e peso seco do músculo sóleo.....	34
4.8	Análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	34
4.9	Análise da proteína carbonilada.....	35

7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
8	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

O desuso muscular impõe várias conseqüências não somente à musculatura esquelética, mas também à cartilagem, osso, ligamentos e tendões devido à redução de estímulos a essas estruturas. Dentre as diferentes alterações musculares, a mais abordada na literatura é a hipotrofia muscular, a qual merece especial atenção no que tange à reabilitação.

Peculiarmente, a imobilização de membros, tem como uma das conseqüências à hipotrofia muscular, que necessita de procedimentos de reabilitação durante um longo período, *lócus* de ação da fisioterapia. Contudo, muitas vezes, o tempo de imobilização é extenso, o que pode levar a hipotrofia severa.

A hipotrofia muscular esquelética tem-se constituído, nos últimos anos como objeto de estudo de inúmeros cientistas, uma vez que, se encontra associada a várias afecções, como por exemplo, à insuficiência cardíaca, à síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), quadros de infecção generalizada (sepse) ou por determinismo biológico. Neste sentido, destaca-se que os mecanismos subjacentes às alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais induzidas por esta vertente anatomopatológica permanecem ainda por ser esclarecidos. A hipotrofia é um processo onde se observam inúmeras alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais que repercutem na funcionalidade dos músculos afetados (Appell, 1990).

O processo de hipotrofia constitui uma resposta do tecido muscular em situações de tensão e/ou de carga mecânica reduzida, na tentativa de manter um funcionamento eficiente e ajustado às novas exigências funcionais (Edgerton, et al. 2002). Desta forma, este processo pode ser visto como uma expressão da

Com base nesses fatos, o conhecimento da fisiopatologia da hipotrofia muscular pode ter importante repercussão no desenvolvimento de melhores ações terapêuticas e possibilitar o aprimoramento de protocolos de prevenção e reabilitação (D'Antona et al. 2000).

Diante das considerações anteriormente mencionadas, a hipótese desse estudo é que no processo de hipotrofia muscular induzida pela imobilização, pode haver participação de espécies reativas de oxigênio associada a eventos precocemente ativados na fase aguda do desuso.



de receptores, atividade de sistemas específicos de captação e pelo metabolismo de substratos (Richarson et al. 1991).

Com relação ao metabolismo dos carboidratos, a homeostasia energética das fibras musculares se mantém pela insulina, cuja ação facilita a captação e o metabolismo da glicose, além de regular a cadeia dos processos metabólicos. Em especial no tecido muscular, a sensibilidade à insulina depende da integridade e responsividade dos receptores nicotínicos da placa motora (Garcia e Kanaan, 1997).

Sabe-se também que a musculatura esquelética é o tecido mais importante envolvido na homeostasia glicêmica, pela capacidade de captar grandes quantidades de glicose após infusão ou ingestão. Em condições basais, as fibras musculares esqueléticas apresentam pequenas concentrações citosólicas de glicose, porém, frente a hiperinsulinemia, hiperglicemia ou atividade física, ocorre uma maior captação da glicose, que pode ser oxidada e liberada na forma de lactato, alanina ou piruvato ou direcionada para formação de glicogênio (Exton, 1987).

O transporte de glicose pelas membranas das fibras musculares é realizado por um grupo de transportadores conhecidos como GLUT (Klip e Paquet, 1990). O GLUT-1 é responsável pela captação basal de glicose, ao passo que o GLUT-4, mais importante, participa efetivamente do controle glicêmico captando grandes quantidades de glicose, e pode ser translocado de reservatórios vesiculares citosólicos em direção à membrana plasmática (Burant et al. 1991).

Uma diversidade de fatores pode comprometer a homeostasia metabólica das fibras musculares, entre os quais destacam-se a imobilização, período

mecânica muscular, onde o músculo tenta ajustar seu aparato metabólico às novas exigências funcionais.

Tem-se caracterizado a hipotrofia como um processo específico para cada tipo de músculo, tanto em humanos, como em animais (Castro, 1999). Assim as fibras do tipo I têm menor adaptação em relação às fibras do tipo II (Talmadge, 2002).

Segundo Tanaka et al. (2004), o músculo sóleo detém maior número de fibras do tipo I ao passo que no extensor longo há um predomínio de fibras do tipo II, sendo assim, em casos de imobilização o músculo sóleo é mais comprometido.

Músculos cuja ação é anti-gravitacionária como o sóleo, possuem maior processo hipotrófico em situações de ausência de atividade mecânica (Caiozzo, 1996). Nesse sentido um estudo realizado por Kasper (2002), revela que as fibras lentas são as que mais sofrem com a hipotrofia, apresentando fibrilas desintegradas, lesão mitocondrial, além de linhas Z estendidas. Outras alterações como condensação e fragmentação da cromatina nuclear (Smith, 2000); irregularidades no retículo sarcoplasmático (Lu, 1997); redução de sarcômeros em paralelo (Kasper, 2002) e redução progressiva da capilarização, também contribuem para a degeneração muscular que ocorre na hipotrofia.

Herrera et al. (2001), a partir de um estudo realizado com ratos, concluíram que o músculo sóleo sofre mais que o extensor longo dos dedos e atribuíram esse fato à composição do tipo de fibra.

Simultaneamente à hipotrofia muscular, ocorrem significativas modificações na homeostasia do músculo esquelético, de forma que há comprometimento da síntese de proteínas miofibrilares ou não, e conseqüentemente redução na

via PI3-K/Akt, sem qualquer evidência de comprometimento da expressão de GLUT-4, sugerindo que a ativação da via p38 MAPK pode ter uma participação nesse processo.

Appel (1990), descreveu que as principais e maiores alterações metabólicas, histológicas e bioquímicas ocorrem nos primeiros dias de imobilização.

Um estudo recente realizado por Fluckey et al. (2006), mostrou significativa hipotrofia em músculos de ratos submetidos a 4 dias de suspensão pela cauda.

Edgerton et al. (2002), em um estudo realizado com ratos, observaram que a hipotrofia é um processo que se implanta com certo grau de rapidez, pois em 4 e 7 dias de desuso, o músculo sóleo apresentou hipotrofia equivalente a 25% e 36%, respectivamente.

Diante das diversas evidências científicas relacionadas à imobilização e hipotrofia muscular, há concordância de que a perda de massa muscular causada pela ausência de descarga de peso, ou por modelos de desuso é produto da atrofia das fibras musculares esqueléticas e aumento da degradação protéica (Boonyarom e Inui, 2006). Contudo, segundo John, Wook e Scott, (2003), os mecanismos celulares e moleculares responsáveis por essa perda ainda não são bem entendidos. Nesse sentido, o estresse oxidativo tem sido apontado como um importante evento envolvido na hipotrofia induzida pelo desuso muscular (Ikemoto et al. 2002; Servais, et al. 2007).

O conhecimento sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs) tem despertado grande interesse nos últimos anos, pelo papel desempenhado por essas moléculas em várias situações clínicas.

### 2.3.1 Geração de espécies reativas de oxigênio

Segundo Ernster (1986), ao longo da fosforilação oxidativa a completa redução do oxigênio molecular à água requer o recebimento de 4 elétrons, esse fenômeno pode ocorrer por duas distintas vias da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Na primeira via, a reação tem como catalizador final a enzima citocromo oxidase, havendo redução tetravalente de certa de 95-98% de todo oxigênio que entra na cadeia mitocondrial, porém, na segunda via a porcentagem restante de oxigênio, que varia de 2-5 %, pode formar EROs pela redução univalente, como ilustrado a seguir: primeiro elétron:  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$  (radical superóxido); segundo elétron:  $O_2^{\bullet-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio); terceiro elétron:  $H_2O_2 + e^- \rightarrow \cdot OH + \cdot OH$  (Radical hidroxila); quarto elétron:  $\cdot OH + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$ ; assim, durante a fosforilação oxidativa o oxigênio passa pela seguinte reação:  $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ .

### 2.3.2 Fontes biológicas de EROs

De acordo com ponderações de Tyler (1975), a cadeia de transporte de elétrons nas membranas mitocondriais é a principal via biológica envolvida na formação de EROs, nesse sentido, acredita-se que o complexo ubiquinona-citocromo b, um sistema integrante da cadeia respiratória, é o mais provável sítio de formação do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Uma vez formado, a maior parte desse radical é convertida em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), podendo ser liberado no citosol. As situações de maior formação de EROs pela cadeia respiratória são as que envolvem aumento no consumo de  $O_2$ , microambientes de hipóxia seguidos de reoxigenação, ou de isquemia seguidos de reperfusão.

ação das EROs nos tecidos biológicos. A peroxidação de lipídios insaturados como o colesterol, dá origem a produtos estáveis chamados de hidroperóxidos. A detecção dos hidroperóxidos pode ser realizada pelo método TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) ou pelo método químico FOX (Oxidação ferrosa em laranja xileno).

O método TBARS se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico, sendo um dos mais utilizados nos estudos de peroxidação lipídica. É um método simples e sensível para mensuração da peroxidação lipídica, porém, não é muito específico (Kappus, 1985).

O método FOX se baseia na oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  (sulfato ferroso amoniacal) a  $\text{Fe}^{3+}$  por hidroperóxidos em meio ácido. Na presença de hidroperóxido forma-se um complexo químico entre o íon ferro e a substância laranja xileno, produzindo cor azul-púrpura (Nourooz-Zadeh, 1999). É um método caracterizado pela simplicidade, baixo custo, e várias vantagens técnicas (Kennedy et al. 1989).

### **2.3.3 Sistemas de defesa contra a agressão oxidativa**

Assim como no processo de evolução a maioria dos organismos vivos se especializou na utilização do oxigênio como componente imprescindível para a produção de energia, foi desenvolvido também um complexo sistema de combate às espécies reativas advindas do consumo de oxigênio. O sistema antioxidante pode ser dividido em dois grupos: sistema enzimático e não-enzimático.

Participam do sistema enzimático as enzimas glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px), ao passo que o não-enzimático é formado por substâncias sintetizadas pelo

peróxidos orgânicos são eliminados preferencialmente pela glutathione peroxidase, enquanto que em altas concentrações de  $H_2O_2$  predomina a ação da catalase, exercendo um importante papel no sistema antioxidante. Em um estudo com 24 pacientes portadores de câncer de pulmão, a atividade de catalase encontrava-se significativamente reduzida no tecido tumoral em comparação com o pulmão normal (Chung-Man et al. 2001).

## **2.4 Danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio**

### **2.4.1 Oxidação de proteínas**

Segundo Griffiths et al. (1998), a reação de EROs com proteínas, promove oxidação de aminoácidos, gerando alterações na sua constituição física, essas desordens se distinguem em três categorias: fragmentação, agregação e suscetibilidade à digestão proteolítica.

O fenômeno da fragmentação decorrente das EROs foi descrito por Marx e Chevion (1986) e Wolff e Dean (1986), que observaram fragmentação de albumina e o colágeno. Nesse sentido, Fulle et al. (2004), descreveram que a degradação proteolítica somada a outros danos causados pelas EROs, como deterioração do DNA e danificação de lipídeos, resulta em sérios prejuízos celulares e teciduais.

### **2.4.2 Oxidação de lipídios ou lipoperoxidação**

A lipoperoxidação tem sido definida como a cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de EROs sobre os lipídios constituintes da membrana celular, gerando outras espécies reativas como os radicais alcóxil e

observaram que em condições fisiológicas, monossacarídeos simples sofrem uma rápida auto-oxidação, formando os complexos dicarbonil e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A glicose oxidada pode reagir com as proteínas, em um processo denominado glicosilação ou glicação.

#### **2.4.4 Alterações no genoma**

Diversos trabalhos evidenciam sérias alterações genômicas induzidas pela ação de espécies reativas de oxigênio. Fraga et al. (1990), observaram aproximadamente 20 tipos de alterações oxidativas do DNA pela ação de EROs.

A lesão do DNA mitocondrial merece destaque, pelo fato da mitocôndria ser a principal fonte de EROs, e por essa razão o seu DNA está exposto a altos níveis de espécies reativas de oxigênio. Assim, o DNA mitocondrial parece ser o alvo preferencial para muitos xenobióticos químicos carcinogênicos (Backer e Weinstein, 1980; Niranjan et al. 1982).

Dessa maneira, um recente trabalho de revisão observou que as EROs têm participação direta nos mecanismos tumorais, uma vez que promovem ativação de oncogenes, mutação de DNA, danos em DNA mitocondrial e nuclear, ativação de apoptose, além da oxidação de lipídios e proteínas (Valko et al. 2006).

Diante das diversas evidências científicas inerentes aos danos causados pelas EROs, pesquisas recentes têm revelado que essas substâncias exercem participação na hipotrofia muscular decorrente de situações de desuso.

Nesse sentido, um estudo recente analisou o comportamento enzimático muscular, mostrando que o status antioxidante é seriamente comprometido, possibilitando o aumento do estresse oxidativo durante períodos longos de desuso. Os animais foram mantidos com os membros posteriores suspensos

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

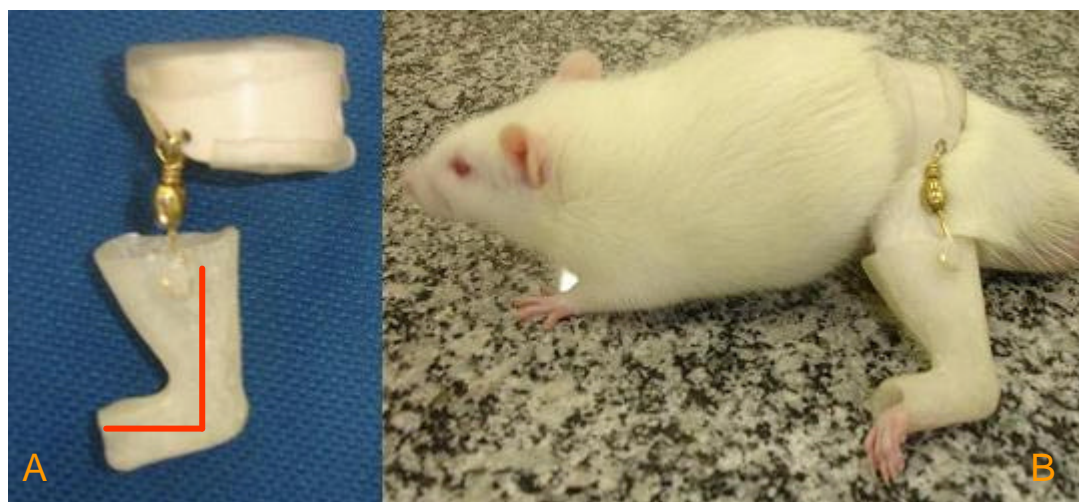
O trabalho teve como objetivo geral avaliar as respostas quimio-metabólicas de músculos esqueléticos de ratos na fase aguda da imobilização do tornozelo na posição de 90°, bem como determinar parâmetros bioquímicos indicativos das condições homeostáticas. As análises foram concentradas no 1º, 2º e 3º dias de desuso.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1 Avaliar o perfil das reservas glicogênicas musculares e hepáticas;
- 2 Avaliar o estresse oxidativo muscular por meio da análise de TBARS muscular e plasmático e pela análise da proteína carbonilada plasmática;
- 3 Avaliar as concentrações de DNA e proteínas totais;
- 4 Avaliar o peso do músculo sóleo;
- 5 Avaliar o índice de hidratação do músculo sóleo;
- 6 Avaliar o índice de estresse induzido pela órtese;
- 7 Avaliar a sensibilidade do tecido periférico à insulina.



A órtese que consiste em um modelo de resina acrílica, associada à cinta de PVC por rotadores laterais, com um peso aproximado de 22 gramas, não restringiu a deambulação do animal. Vale elucidar que esse modelo de órtese permite a imobilização de  $(6,25 \pm 0,23\%)$  da massa magra do animal.



**Figura 1** A – Modelo de órtese utilizado evidenciando o ângulo de 90°; B – Adaptação da órtese no membro posterior do animal nota-se que o modelo permite descarga de peso no membro imobilizado.

#### 4.3 Amostragem

Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/Kg,i.p) foram coletadas amostras de sangue, fígado e dos músculos sóleo, gastrocnêmio branco e gastrocnêmio misto os quais foram encaminhados para a determinação das análises abaixo relacionadas.

#### 4.4 Determinação do Glicogênio Muscular e Hepático

As amostras dos músculos foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. O glicogênio precipitado, foi submetido a hidrólise ácida na presença de fenol,

lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular), que ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff.

Para tanto, as amostras de plasma ou músculo, foram diluídas em  $H_2SO_4$ , foi adicionado a esta diluição ácido fosfotungstíco, seguido de centrifugação a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em  $H_2SO_4$  centrifugado novamente a 3000 rpm, o sobrenadante foi novamente descartado, e o precipitado dissolvido em  $H_2O$  deionizada. A essa mistura foi adicionado solução composta de ácido tiobarbitúrico 0,67%, e ácido acético 50%; a amostra foi incubada em banho-Maria  $90^\circ C$  por 1 hora; após o resfriamento foi efetuada a extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico com 5 mL de butanol. A medida da emissão da fluorescência foi determinada pela espectrofotometria a 553 nm, os valores foram descritos em mmol/L.

#### **4.9 Análise da proteína carbonilada**

A análise dos derivados de proteína carbonilada foi realizada de acordo com a proposta de Faure e Lafond (1995).

O plasma foi diluído em  $H_2O$  deionizada, foi adicionado à amostra ácido tricloroacético para a precipitação das proteínas, seguida de centrifugação a 3000 rpm por 10 min, após a centrifugação foi desprezado o sobrenadante e o precipitado incubado durante 50 min a  $37^\circ C$  com 1 mL de DNPH dissolvido em HCL. Após a incubação, nova precipitação das proteínas foi realizada com TCA, lavando o precipitado 3 vezes com uma solução de etanol/acetato de etila (1:1). O sedimento final foi ressuspendido com guanidina dissolvida em tampão fosfato de potássio, corrigido com ácido trifluoroacético; a leitura espectrofotométrica foi realizada a 380 nm, os valores foram expressos em  $\mu mol/L$ .

foi substituída por 1,0 mL do mesmo tampão, contendo diferentes concentrações de glicose: 2,8; 5,6; 8,3; 16,7 mmol/L.

Procedeu-se uma nova incubação durante 90 min, nas condições acima referidas. Após este período, as placas foram colocadas no freezer (-20) por 10 min e, o sobrenadante, de cada poço transferido para tubos de polietileno e conservados a -20° C, até o momento da dosagem da insulina secretada.

A insulina secretada durante o período de incubação foi avaliada de acordo com o método descrito por Scott et al. (1981), os valores estão expressos em ng/ilhota/80min.

#### **4.11 Teste de tolerância à insulina (ITT)**

Para a realização do ITT os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso). Após a anestesia foi feito um corte na cauda de cada animal por onde foram coletadas amostras de sangue. Após a primeira coleta tempo zero (T0) foi injetado insulina regular Biobrás® 1U/Kg de peso (1U/ml) e outras amostras foram coletadas nos tempos 2,5, 5, 10 e 20 min e a glicemia avaliada pelo meio de glicosímetro (ACCU-CHEK) de acordo com Chan et al. (2001).

#### **4.12 Determinação da concentração plasmática de corticosterona**

Para análise da concentração plasmática de corticosterona foi utilizado o método ELISA (BIORAD - diagnósticos), os valores foram descritos em ng/mL.

#### **4.13 Captação de 2-Deoxiglicose**

Após anestesia, o músculo sóleo foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais com peso entre 25-35 mg foram primeiro incubadas

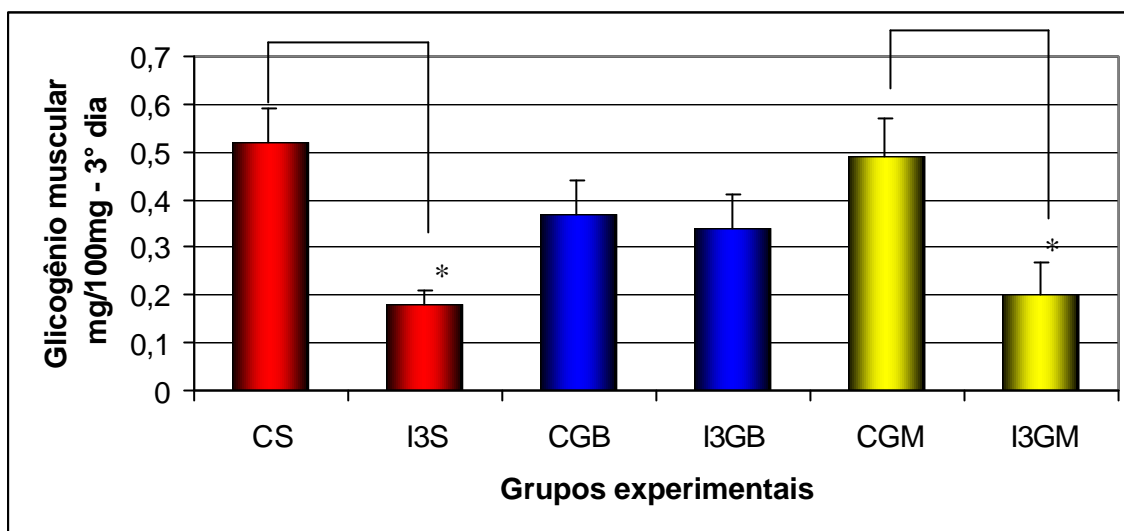
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da periodicidade da imobilização sobre o conteúdo muscular de glicogênio

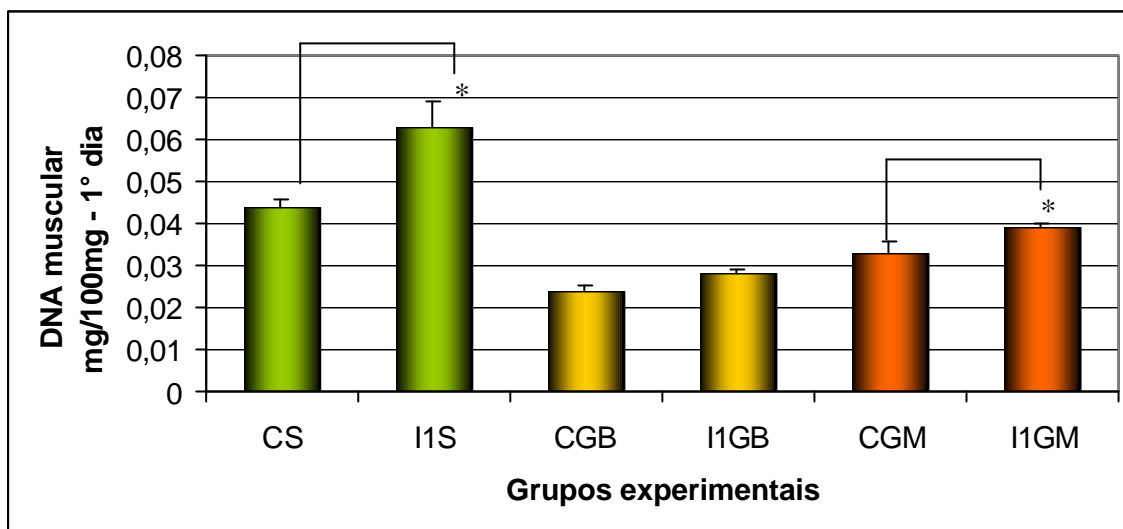
Na análise do músculo sóleo foi observado que nas primeiras 24 horas de desuso, não houve alteração significativa, observou-se as seguintes médias  $\pm$  erro padrão da média (controle C:  $0,52 \pm 0,07$  e I1:  $0,46 \pm 0,04$ ). Por outro lado, no segundo e terceiro dia houve redução progressiva nas reservas, equivalendo a 53% no grupo imobilizado 2 dias (C:  $0,52 \pm 0,07$  e I2:  $0,24 \pm 0,06$ ,  $p < 0,05$ ) e 65% no grupo imobilizado 3 dias (C:  $0,52 \pm 0,07$  e I3:  $0,18 \pm 0,03$ ,  $p < 0,05$ ).

No que tange ao gastrocnêmio branco observou-se que, a concentração do músculo comportou-se de forma diferente se comparado aos demais músculos, uma vez que, nas primeiras 24 horas houve aumento estatisticamente significativo de 89% (C:  $0,37 \pm 0,07$  e I1:  $0,70 \pm 0,19$ ,  $p < 0,05$ ), ao passo que no segundo e terceiro dia, as reservas foram reduzidas e estabilizadas em 8% (C:  $0,37 \pm 0,07$  e I2:  $0,34 \pm 0,07$ ,  $p > 0,05$ ).

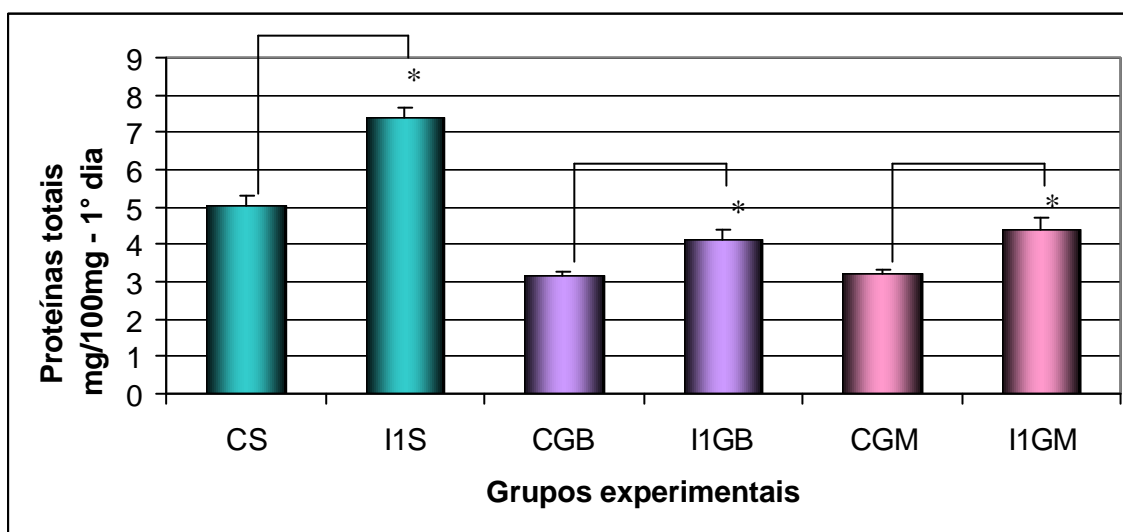
Dentro do mesmo parâmetro de análise foi avaliado o músculo gastrocnêmio misto, e foi verificado que este acompanha o comportamento do músculo gastrocnêmio branco, porém, em proporções diferenciadas, de forma que não houve diferença significativa nas primeiras 48 horas, assim representado no primeiro dia (C:  $0,49 \pm 0,08$  e I1:  $0,66 \pm 0,05$ ,  $p > 0,05$ ) e segundo dia (C:  $0,49 \pm 0,08$  e I2:  $0,39 \pm 0,10$ ,  $p > 0,05$ ). Por outro lado, no terceiro dia houve redução significativa de 59% (C:  $0,49 \pm 0,08$  e I3:  $0,20 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ) como se observa nas figuras 2, 3 e 4.



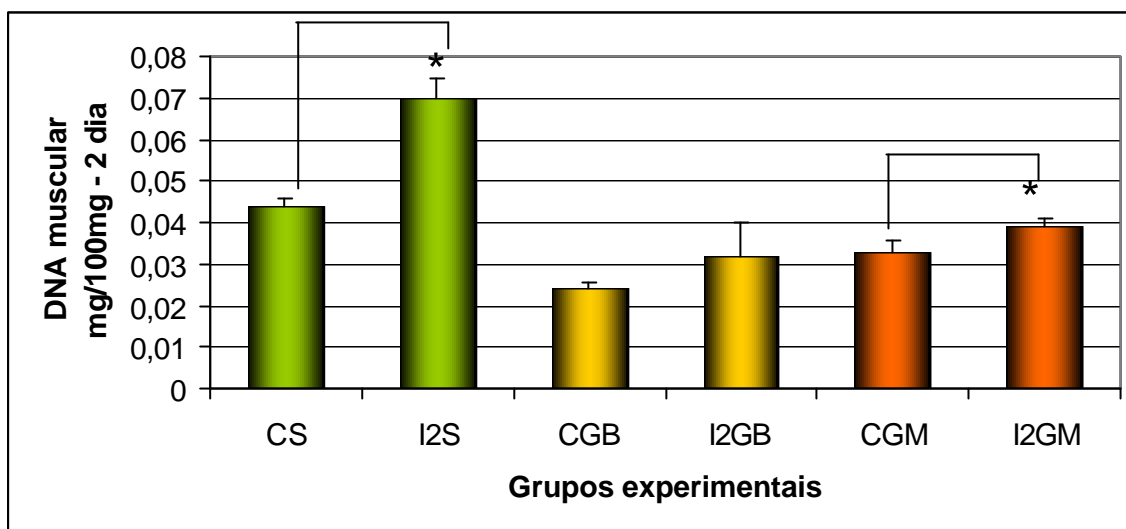
**Figura 4** - Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM) no terceiro dia de imobilização (I3). Os valores representam a média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle (C).



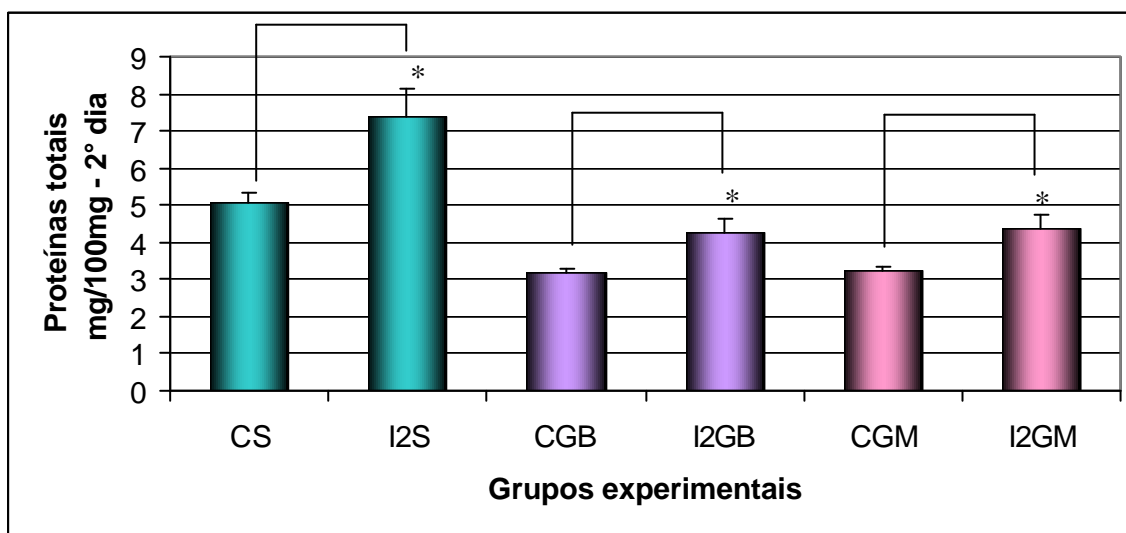
**Figura 5** - Conteúdo de DNA (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM) no primeiro dia de imobilização (I1). Os valores representam a média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle (C).



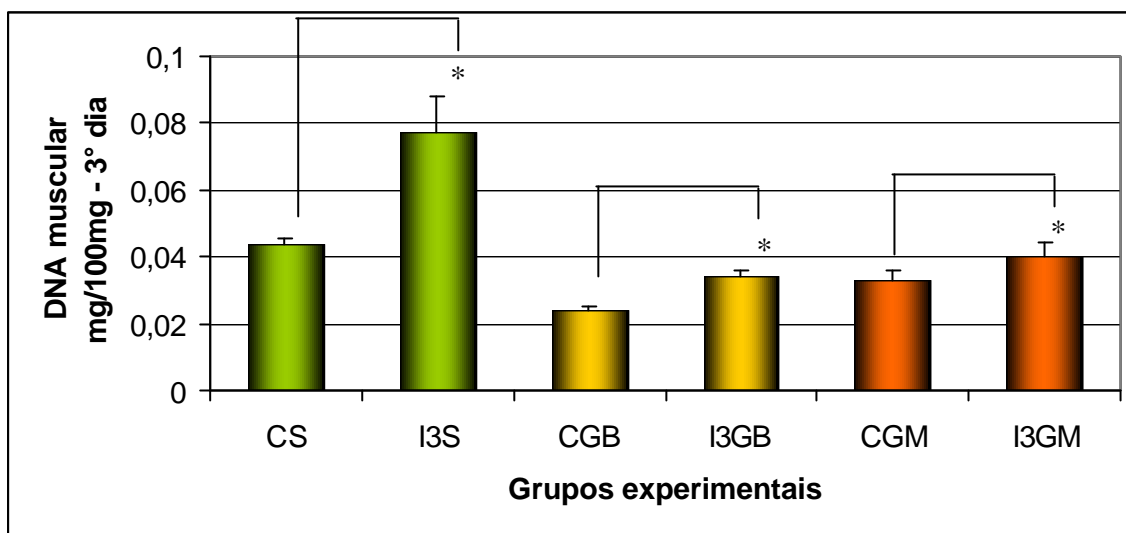
**Figura 6** - Conteúdo de proteínas totais (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM), no primeiro dia de imobilização (I1). Os valores representam a médias±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle (C).



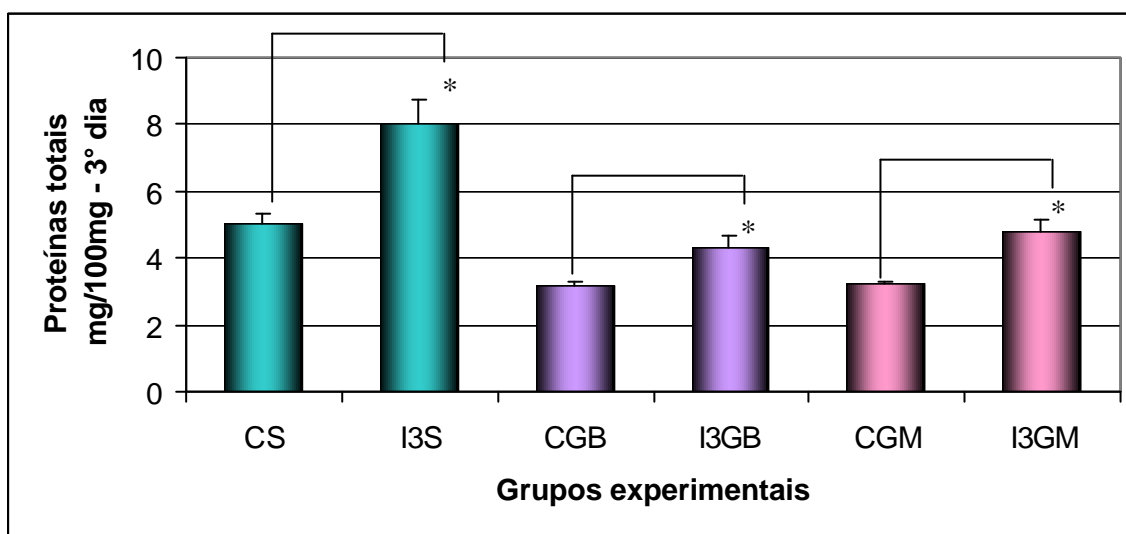
**Figura 7** - Conteúdo de DNA (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM), no segundo dia de imobilização (I2). Os valores representam a média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle (C).



**Figura 8** - Conteúdo de proteínas totais (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM), no segundo dia de imobilização (I2). Os valores representam a média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle (C).



**Figura 9** - Conteúdo de DNA (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM), no terceiro dia de imobilização (I3). Os valores apresentam a média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle (C).

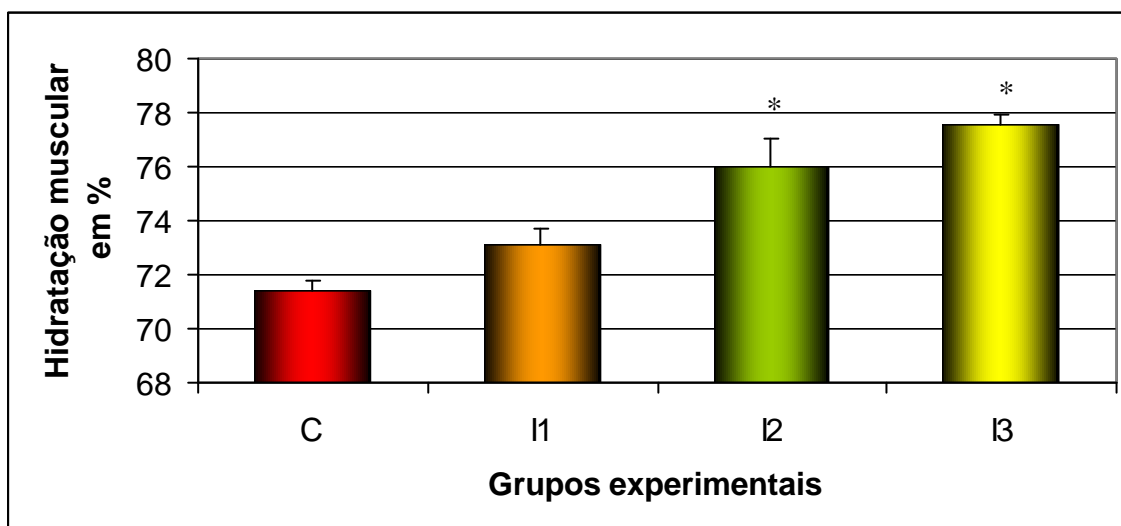


**Figura 10** - Conteúdo de proteínas totais (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM), no terceiro dia de imobilização (I3). Os valores representam a média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle (C).

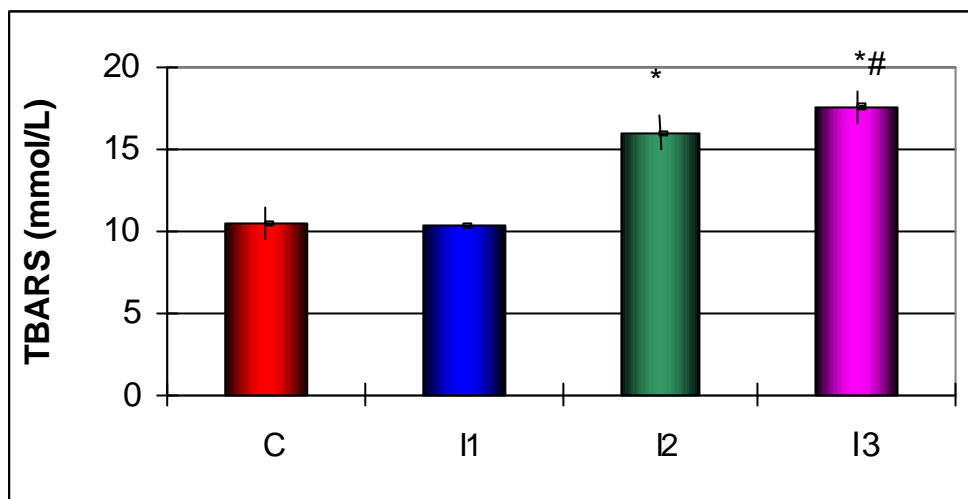


### 5.3.2 Efeito da imobilização sobre o índice de hidratação muscular

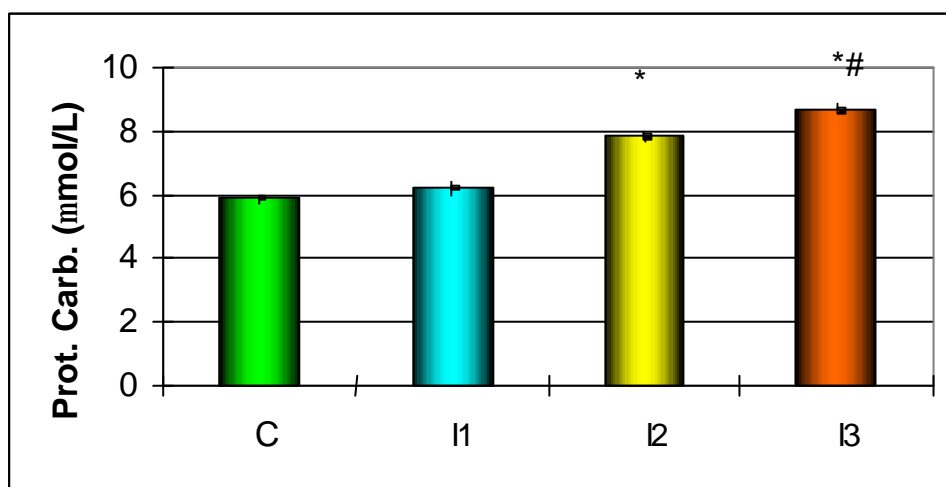
Essa análise revelou aumento progressivo ao longo do período de imobilização, com expressão a partir do 2º dia. Assim, o músculo sóleo não apresentou diferença no primeiro dia, representado percentualmente por (C:  $71,42 \pm 0,42\%$  e I1:  $73,13 \pm 0,6\%$ ). A partir do segundo dia, esse incremento tornou-se significativo atingindo 6,44% (C:  $71,42 \pm 0,42\%$  e I2:  $76,02 \pm 1\%$ ,  $p < 0,05$ ) e no terceiro dia a hidratação foi ainda maior representado por valores 8,58% maiores que o controle (C:  $71,42 \pm 0,35$  e I3:  $77,55 \pm 0,38\%$ ,  $p < 0,05$ ), (figura 12).



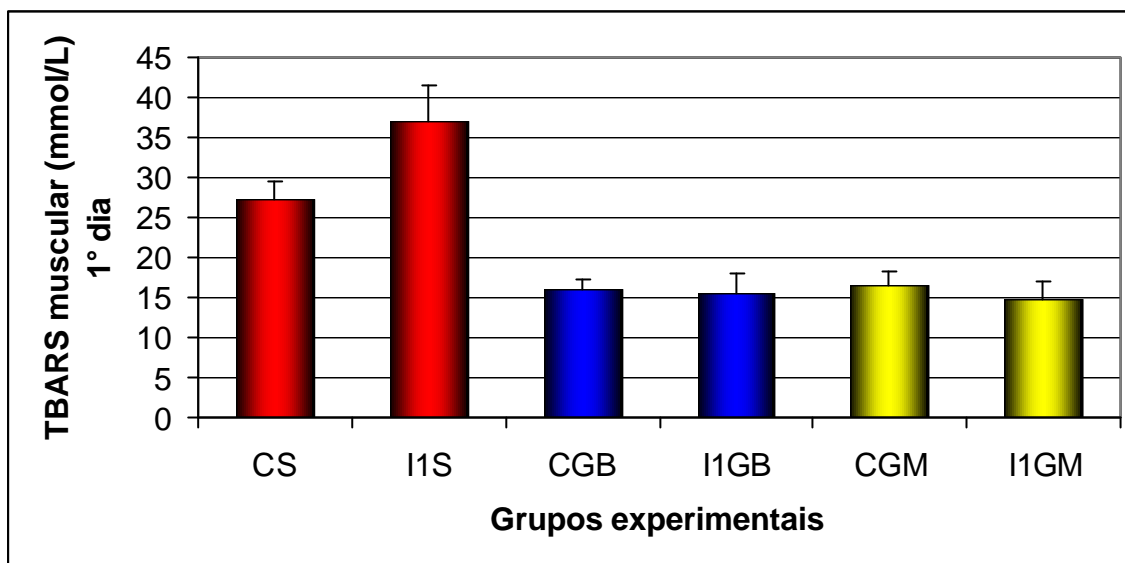
**Figura 12** - Hidratação do músculo sóleo (S) nos grupos controle (C) e imobilizados um (I1), dois (I2) e três dias (I3). Os valores estão expressos em porcentagem e representam à média ± epm, n=6. \* $p < 0,05$  comparado ao controle (C).



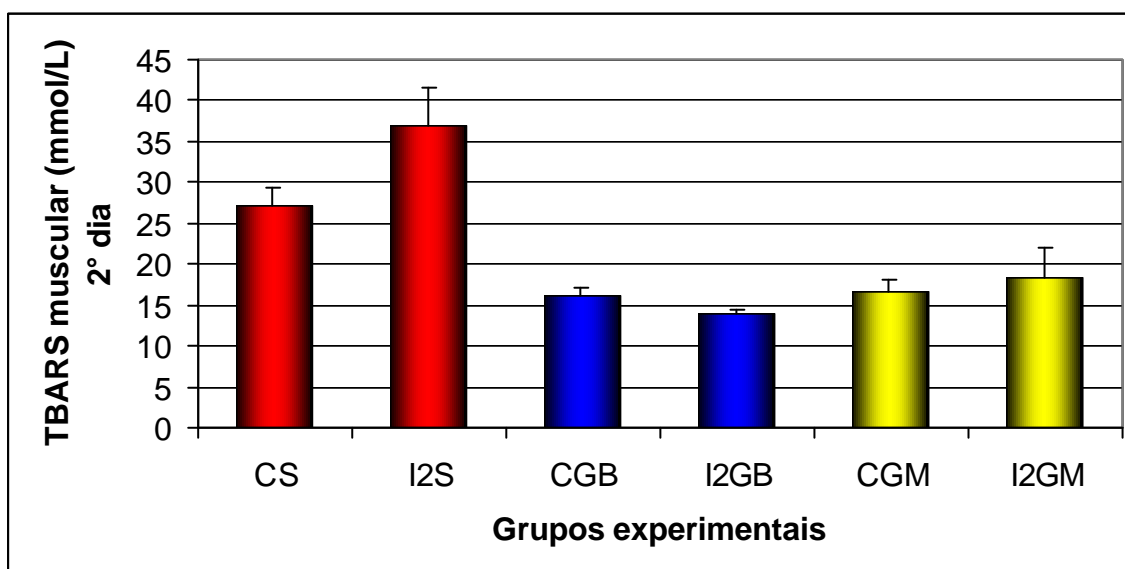
**Figura 13** - Concentração plasmática de TBARS (mmol/L) de animais dos grupos controle (C), imobilizado um dia (I1), dois (I2) e três dias (I3). Os valores correspondem à  $\text{media} \pm \text{epm}$ ,  $n=6$ . \* $p < 0,05$  comparado ao controle (C) e # $p < 0,05$  comparado ao imobilizado um dia (I1).



**Figura 14** - Concentração plasmática de derivados de proteínas carboniladas ( $\mu\text{mol/L}$ ) de animais dos grupos controle (C) e imobilizados um (I1), dois (I2) e três dias (I3). Os valores correspondem à  $\text{media} \pm \text{epm}$ ,  $n=6$ . \* $p < 0,05$  comparado ao controle (C) e # $p < 0,05$  comparado ao imobilizado um dia (I1).



**Figura 15** – Concentração de TBARS (mmol/L) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM) no primeiro dia de imobilização (I1). Os valores representam as médias±epm, n=6.  $p>0,05$  comparado ao controle (C).

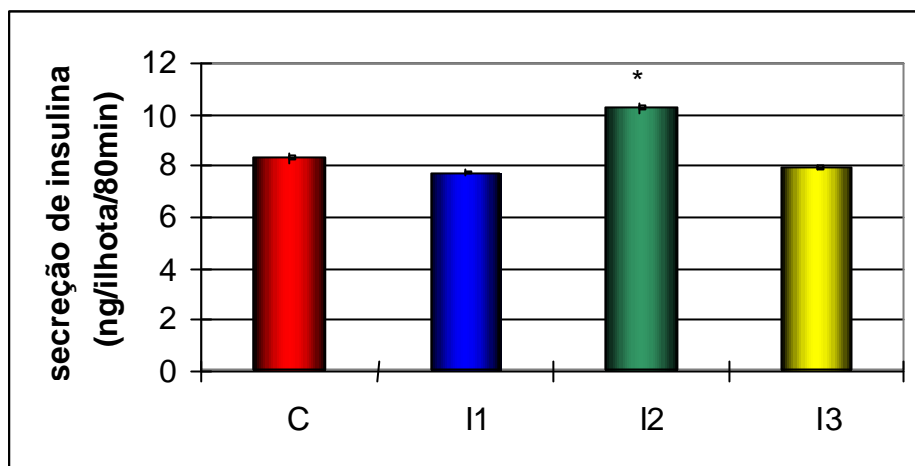


**Figura 16** – Concentração de TBARS (mmol/L) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e misto (GM) no segundo dia de imobilização (I2). Os valores representam as médias±epm, n=6.  $p>0,05$  comparado ao controle (C).

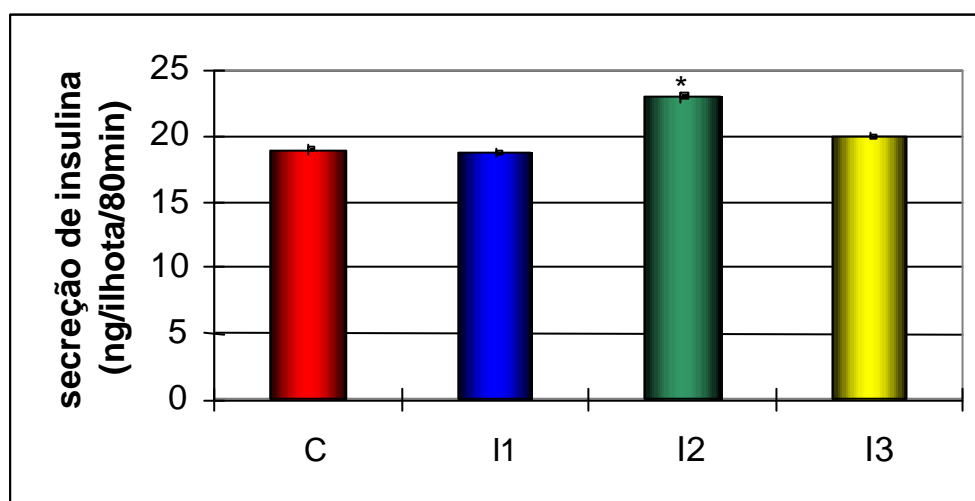
## **5.5 RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS DESENCADEADAS PELA IMOBILIZAÇÃO**

### **5.5.1 Avaliação da secreção de insulina**

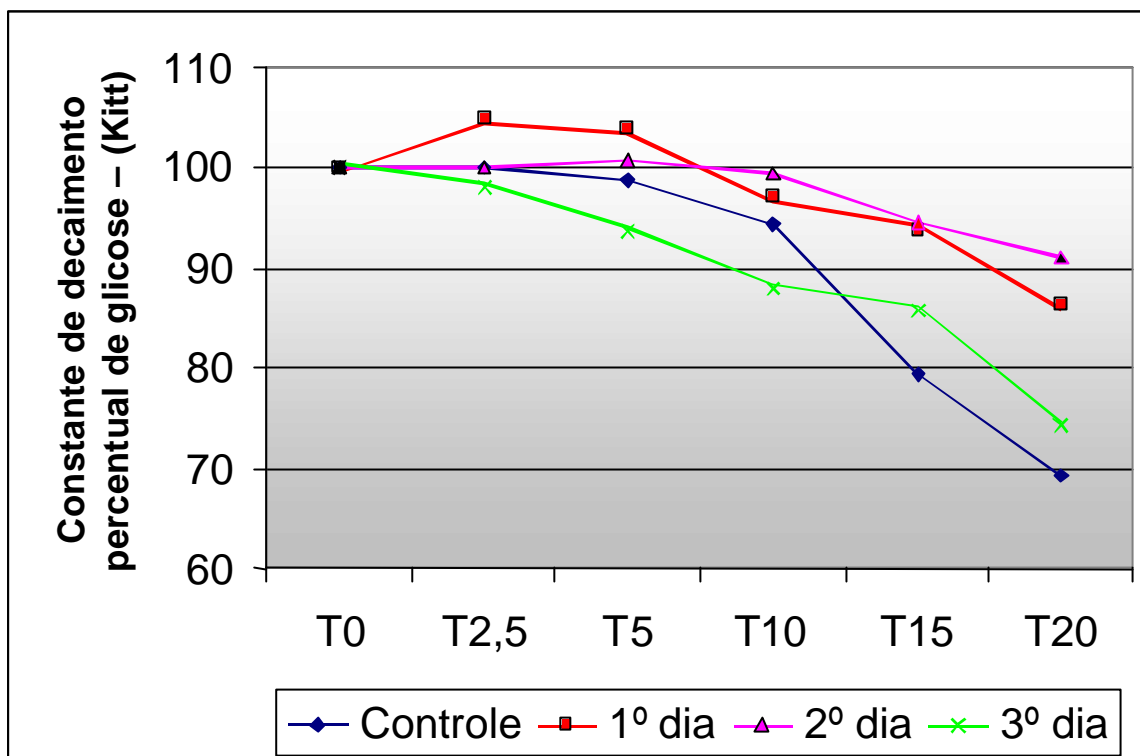
Os resultados mostram que não houve mudança na sensibilidade das ilhotas quando expostas às diferentes concentrações de glicose 2,8; 5,6; 8,3 e 16,7 mmol/L nas primeiras 24 h de imobilização como mostra a figura 18. Ao passo que ao avaliar o 2º dia de imobilização observou-se elevação na secreção de insulina atingindo valores 12% maiores na presença de 5,6 mmmol/L (C:5,61±0,1 ng/ilhota/80min e I2: 6,30±0,1 ng/ilhota/80min,  $p<0,05$ ), figura 16; 32% na presença de 8,3 mmmol/L (C:8,35±0,2 ng/ilhota/80min e I2: 10,3±0,2, ng/ilhota/80min  $p<0,05$ ), como pode ser observado na figura 20 e 22% na presença de 16,7 mmmol/L (C:19,01±0,4 ng/ilhota/80min e I2: 22,9±0,3,  $p<0,05$ ), observar figura 21. Nas mesmas figuras pode-se observar ainda que, no 3º dia de imobilização o comportamento das ilhotas não difere do controle.



**Figura 20** - Secreção de insulina por ilhota pancreática isolada de ratos do grupo controle (C) e de ratos imobilizados durante um (I1), dois (I2) e três dias (I3) e incubadas em presença de glicose (**8,3 mmol/L**). Os valores representam a média  $\pm$  epm, n=6. \* $p < 0,05$  comparado ao controle (C).



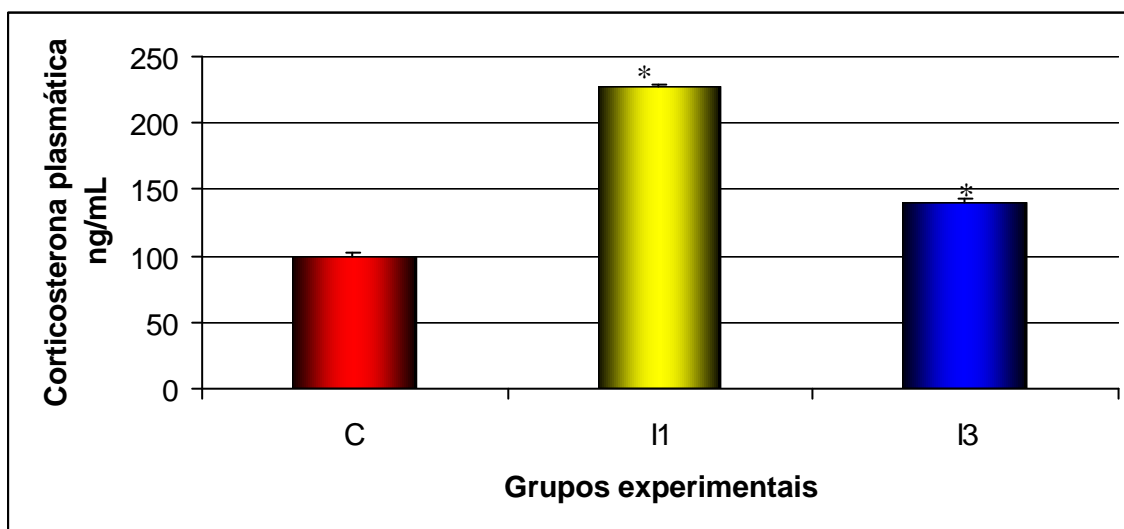
**Figura 21** - Secreção de insulina por ilhota pancreática isolada de ratos do grupo controle (C) e de ratos imobilizados durante um (I1), dois (I2) e três dias (I3) e incubadas em presença de glicose (**16,7 mmol/L**). Os valores representam a média  $\pm$  epm, n=6. \* $p < 0,05$  comparado ao controle (C).



**Figura 23** – Avaliação da taxa de remoção da glicose durante o teste de tolerância à insulina de ratos do grupo controle (azul escuro), imobilizados 1 dia (vermelho), 2 dias (rosa) e 3 dias (verde claro).

### 5.5.3 Avaliação da concentração plasmática de corticosterona

A partir da observação das alterações comportamentais induzidas pela limitação funcional imposta pela órtese, foi avaliada a concentração plasmática de corticosterona, que é um dos hormônios mais importantes para determinação do índice de estresse, e como pode ser observado na figura 25, o grupo imobilizado apresentou no primeiro dia elevação de 127% na concentração plasmática se comparado ao controle, no terceiro dia a concentração apresenta redução de 40% quando comparado ao primeiro de imobilização, porém, ainda permanece 35% maior do que o controle.



**Figura 25** - Concentração plasmática de corticosterona (ng/mL) de ratos controle (C) e submetidos à imobilização durante um (I1) e três dias (I3). Os dados correspondem à média±epm, n=4. \*p<0,05 comparado ao controle (C).

## 6 DISCUSSÃO

Diversos cientistas têm buscado constantemente aprimorar suas metodologias de estudo a fim contribuir para o entendimento dos eventos deflagrados pela imobilização muscular, no entanto, mesmo frente ao grande progresso nas análises experimentais, muitos aspectos merecem maior atenção e pesquisa. Este fato instigou a avaliação de diferentes aspectos de cunho quimio-fisiológico na fase aguda da imobilização que é delimitada pelos primeiros dias de desuso.

É importante destacar que o tecido alvo norteador desse estudo é o músculo esquelético imobilizado. Desde a década de 70 do século passado, não se obtém consenso frente às alterações histo-quimiofisiológicas induzidas pelo desuso muscular, foram observados resultados contraditórios que descrevem graus diferenciados de susceptibilidade à atrofia e relações funcionais diferenciadas de acordo com o tipo da fibra muscular e o local em que esta encontra-se (Edgerton et al. 1975; Williams e Goldspink, 1978; Jaffe et al. 1978; McConell e Kingwell, 2006).

Um importante estudo realizado em 1986 sugeriu que as alterações mais severas da hipotrofia ocorrem nos dias iniciais do desuso, essa sugestão indica a possibilidade de haver certa temporização nas alterações da homeostasia das fibras musculares quando submetidas à imobilização (Appell, 1986).

Com base nessas observações, iniciou-se o presente estudo, com a avaliação do conteúdo de glicogênico muscular, uma vez que esta reserva é marcadora tanto das condições energéticas quanto da condição de performance do músculo esquelético (Sesti, 2006). No músculo gastrocnêmio branco, formado



principalmente no que refere-se às vias citosólicas ligadas à síntese de glicogênio, predispondo ao quadro de resistência à insulina e concomitante redução nas reservas glicogênicas (Nicholson et al.1984; Hirose et al. 2000).

Nesta fase experimental, optou-se por avaliar a captação da 2-deoxiglicose, para tanto, foi escolhido o músculo sóleo devido a fácil localização, delimitação anatômica e propriedades quimio-fisiológicas. Assim, demonstrou-se que o músculo sóleo apresentou elevação na captação da 2-deoxiglicose nas primeiras 24h de imobilização, evento que também já foi demonstrado no músculo desnervado por Nunes (2005). Frente aos resultados obtidos, sugere-se que a resposta inicial à imobilização pode ter diferentes vertentes que podem estar ligadas ao desenvolvimento de estresse oxidativo, redução na eficiência da ação insulínica, ou ainda, redução na eficiência da multiplicidade de sistemas ligados à cascatas sinalizadoras, tais como: a proteína quinase dependente da calmodulina (CaMK), proteína quinase C (PKC), proteína quinase dependente do mitógeno (MAPK), bradicinina, adenosina, proteína quinase ativada pelo AMPc (AMPK) ou geração de óxido nítrico (NO) que participa efetivamente do controle metabólico.

Na literatura há estudos indicando que longos períodos de imobilização promovem redução nas fibras musculares, e merece destaque o estudo de Veldhuizen et al. (1993), que verificaram, por meio de biópsia muscular, que após 4 semanas de imobilização há uma redução de 16% no diâmetro da fibra do músculo vasto lateral. Neste sentido, Chakravarthy et al. (2000), demonstraram significativa diminuição na massa do músculo sóleo e no potencial de proliferação das células satélites residentes após 3 semanas de imobilização.

Em um estudo realizado com ratos e em diferentes tempos de imobilização, foi demonstrado que as fibras tipo I são as que apresentam sinais mais evidentes

Apesar da literatura tecer considerações importantes a respeito dos métodos de avaliação da concentração plasmática de espécies reativas de oxigênio e indicar limitações na interpretação dos dados, deve-se considerar a importância da informação neste estudo, uma vez que, no estresse oxidativo ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidantes e antioxidantes gerando danos à proteínas e ao DNA, esse distúrbio provoca diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual (Schneider e Oliveira, 2004). Foi fundamentado neste aspecto que passou-se a avaliar a concentração de DNA, onde observou-se que os músculos apresentaram elevação progressiva do primeiro ao terceiro dia de desuso, comportamento que também foi observado na análise das proteínas totais musculares.

Alguns pontos a este respeito merecem destaque, como por exemplo, o fato de que as medidas de proteína e DNA têm sido muito utilizadas em diferentes estudos para indicar tamanho e número de células em um tecido, de forma que a concentração de DNA indica número de células enquanto que razões proteína/DNA ou peso/DNA são índices de tamanho celular (Albanes et al. 1990). Nesse sentido, o desenvolvimento de hipotrofia no músculo esquelético depende do balanço entre a taxa de síntese e degradação das proteínas e pode ser analisado por meio da quantificação do DNA e proteínas totais (Kimball, Vary e Jefferson, 1994).

Nesta fase, passou-se a gerar algumas hipóteses, pois de acordo com observações prévias de Durigan (2005), o modelo de órtese utilizado gera redução na deambulação logo no primeiro dia do desuso, assim, associado aos dados demonstrados, sincronicamente à imobilização também ocorre edema leve, fato que contribui ainda mais para a redução na movimentação exploratória.

estruturas celulares importantes como a membrana, proteínas ou o ácido desoxirribonucleico (Halliwell e Gutteridge, 1996; Oliveira et al. 2004).

Na mesma linha de análise ao avaliar a geração de TBARS no músculo esquelético foi verificado que o sóleo apresentou uma certa elevação no segundo e terceiro dia, porém, sem significância estatística. Quanto aos demais músculos as variações foram pequenas e não significativas. O TBARS muscular assim como outros marcadores de estresse oxidativo têm sido documentados em trabalhos recentes, é relevante destacar o estudo de Servais et al. (2007), que observou 49% de hipotrofia no músculo sóleo simultâneo ao aumento de TBARS, redução das enzimas GSH/GSSG, e aumento da ZnCu-SOD. Contudo, vale salientar que esse estudo observou tais efeitos depois de 14 dias de suspensão pela cauda.

Estes dados sugerem que a geração de espécies reativas de oxigênio participa significativamente dos eventos deflagrados no início do desuso e faz parte das múltiplas condições geradoras da hipotrofia. Assim, durante a imobilização e concomitante geração de espécies reativas de oxigênio, as fibras musculares são submetidas a condições deletérias que elevam a peroxidação lipídica, a carbonilação protéica e geram danos ao DNA e assim, prejudicam o metabolismo celular, instalam o processo de fadiga e hipotrofia ou até induzem apoptose (Alessio, 1993; Radak et al. 1999; Barclay e Hansel, 1990; Brotto e Nosek, 1996).

Estudos mais recentes ratificam esses achados, uma vez que observaram redução na expressão gênica de proteínas musculares, atribuindo o fenômeno ao aumento do estresse oxidativo, porém, vale ressaltar que poucos estudos avaliaram tais alterações nas fases iniciais do desuso. St-Amand et al. (2001)

concentração plasmática é proporcional a intensidade do estímulo estressor (Armario, 2006). Sendo assim, é sugestiva a proposta de que elevadas concentrações da corticosterona identificadas nos três primeiros dias da imobilização podem contribuir significativamente para o desenvolvimento do processo hipotrófico que precocemente consolida-se.

Um segundo ponto de análise está relacionado à sensibilidade tecidual a insulina, indicado pela avaliação da taxa percentual de captação determinada por meio do ITT, é relevante destacar que o estudo foi realizado respeitando os períodos fisiológicos de maior sensibilidade à insulina (Bem-Dyke, 1971; Gibson 1972). Foi verificado que no segundo e terceiro dia de imobilização ocorre aumento na velocidade de captação da hexose, fato que sugere possível ação integrada entre alterações no processo secretório de insulina acompanhado do ajuste na população de receptores nos tecidos periféricos. Assim, a velocidade de decaimento da glicose é uma resultante dos ajustes tipo “up-regulation/down-regulation”.

Em uma análise mais primorosa dos resultados sugeriu-se o redimensionamento da proposta e foi aventada a necessidade de avaliar a sensibilidade do processo secretório da insulina em ilhotas isoladas, onde observou-se que em baixas concentrações de glicose (2.8mmol/L) não há mudança no processo secretório da insulina em nenhum período experimental. Por outro lado, nas ilhotas isoladas de ratos submetidos à imobilização durante 2 dias, observou-se elevação na capacidade secretória de insulina quando incubadas na presença de glicose 5.6, 8.3 e 16.7 mmol/L. Esta mudança na capacidade secretória não foi observada nas ilhotas isoladas de ratos submetidos a imobilização durante 3 dias.

como médicos, fisioterapeutas ou cientistas podem interpretar os dados do mesmo estudo sob diferentes visões.

Assim, os resultados desse trabalho são de extrema importância para o profissional fisioterapeuta, uma vez que o conhecimento da fisiologia da hipotrofia muscular repercute relevantemente sobre as implicações clínicas da hipotrofia muscular, principalmente no que tange às limitações na capacidade funcional, bem como na qualidade de vida da população. Nesse sentido, indubitavelmente esse trabalho contribui de forma significativa para a ciência Fisioterapia, principalmente pelo fato de ponderar a necessidade da intervenção precoce nos casos de desuso muscular.

Dessa maneira, o conhecimento sobre os mecanismos aqui discutidos instiga o profissional fisioterapeuta a reavaliar seus protocolos terapêuticos, bem como estimar a necessidade de busca e elaboração de novos protocolos de prevenção e/ou reabilitação que possam se contrapor aos eventos deflagrados nas fases iniciais do desuso, e assim minimizem os eventos hipotróficos.

## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Como perspectivas futuras entende-se que futuros projetos poderão ser desenvolvidos no sentido de utilizar recursos terapêuticos peculiares à fisioterapia, com o objetivo de avaliar os efeitos da intervenção fisioterápica sobre os fenômenos hipotróficos na fase aguda do desuso.

## REFERÊNCIAS\*

1. Albanes D, Salbe AD, Levander AO, Taylor PR, Nixon DW, Winick M. The effect of early caloric restriction on colonic cellular growth in rats. *Nutr Cancer* 1990; 3(1-2): 73-80.
2. Alessio HM. Exercise-induce oxidative stress. *Medicine e Science in Sports e Medicine*. 1993; 25: 218-224.
3. Al-Turk WA, Sohs SJ, El-Rashidy FH, Othoman S, Shaheen O. Changes in glutathione, glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology*. 1987; 34:1-8.
4. Andrade Júnior DR. Estudo de hepatócitos de rato em cultura primária submetidos à hipóxia e reoxigenação: ação dos citoprotetores prostaglandina E1, superóxido dismutase, verapamil, alopurinol, clorpromazina e efeito citotóxico da actinomicina D [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1996.
5. Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization. A review. *Sports Med*. 1990; 10(1): 42-58.
6. Appell HJ. Skeletal muscle atrophy during immobilization *Int. J Sports Med*. 1986; 7: 1-5.
7. Armario A .The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: What can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006; 5(5): 485-501.
8. Arrington ED, Mark D, Miller MD. Skeletal muscle injuries. *Orthop. Clin North Am*. 1995; 26 (3): 411-23.
9. Backer JM, Weinstein IB. Mitochondrial DNA is a major cellular target for dihydrodiol-epoxide derivative of benzo(a)pyrene. *Science*. 1980; 209: 297-9.
10. Barclay JK e Hnsel M. Free radicals may contribute to oxidative muscle fatigue. *Can.J.Physiol.Pharmacol*. 1990; 69: 279-84.
11. Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*. 1990; 13: 198-208.
12. Bem-Dyke R. Diurnal variation of oral glucose tolerance in volunteers and laboratory animals. *Diabetologia*. 1971; 7: 156-59.
13. Benzie, IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr*. 1996; 47(3): 233-61.

---

\* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

26. Chung-Man HJ, Zheng S, Comhair SA, Farver C, Erzurum SC. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 8578-85.
27. Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(11): 1329-32.
28. Cros N, Muller J, Bouju S, Piétu G, Jacquet C, Jean J. et al. Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. *Am J Physiol.* 1999; 276(2 Pt 2): 308-16.
29. Cros N, Tkatchenko AV, Pisani DF, Leclerc L, Leger JJ, Marini JF e Dechesne CA. Analysis of altered gene expression in rat soleus muscle atrophied by disuse. *J Cell Biochem.* 2001; 83: 508–19.
30. D'Antona G, Pellegrino MA, Rossi R, Carlizzi CN, Reggiani C, Bottinelli R. Disuse induced-atrophy and contractile impairment of human skeletal muscle. 2000; 10: 27-32.
31. Dallman MF, Susanne E, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF. Minireview: Glucocorticoids-Food intake, Abdominal, Obesity and wealthy nations in 2004. 2004; 145(6): 2633-38.
32. Deby C, Deby-Dupont G. Mechanism of intervention of uric acid metabolism in PG biosynthesis. *Agents Actions.* 1981; 11: 651-2.
33. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol.* 1989; 257(4 Pt 1): L163-73
34. Durigan JLQ. Estudo morfológico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização associado à estimulação elétrica neuromuscular. Tese mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia – UNIMEP, novembro, 2005.
35. Edgerton VR, Barnard RJ, Peter JB, Maier A, Simpson DR. Properties of immobilized hind-limb muscle of the galago senegalensis. *Exp. Neurol.* 1975; 46: 115-31.
36. Edgerton VR, Roy RR, Allem DL, Monti RJ. et al. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002; 81(11): 127-47.
37. Eric JS, Paul GG, Alan K, Susan CK. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 2003; 551: 33-48.
38. Ernster L. Oxygen as an environmental poison. *Chem Scripta.* 1986; 26: 525-34.

54. Griffiths HR, Unsworth J, Blake DR, Lunec J. Free radicals in chemistry, pathology and medicine. London: Richelieu. 1988; 439-54.
55. Gutteridge MC, Halliwell B. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984; 219: 1-14.
56. Halliwell B e Gutteridge JMC. Free radical in Biology and Medicine, 2<sup>nd</sup> ed. New York, Oxford 1996.
57. Handberg A, Han XX, Bonen A. Reciprocal GLUT-1 and GLUT-4 expression and glucose transport in denervated muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1996; 271: 50–57.
58. Herrera NM Jr, Zimmerman AN, Dykstra DD, Thompson LV. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001; 82: 930-34.
59. Hilder TL, Tou JC, Grindeland RE, Wade CE, Graves LM. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *FEBS Lett.* 2003; 553: 63–67.
60. Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA, Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279(6): E1235-41.
61. Hoffman EP, Nader GA. Balancing muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Med.* 2004; 10: 584–85.
62. Hornberger TA, Esser KA. Mechanotransduction and the regulation of protein synthesis in skeletal muscle. *Proc Nutr Society.* 2004; 63: 331–35.
63. Ikemoto, M, Okamura Y, Kano M, Hirasaka K, Tanaka R, Yamamoto T, et al. A relative high dose of vitamin E does not attenuate unweighting-induced oxidative stress and ubiquitination in rat skeletal muscle. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci.* 2002; 21(5): 257-63.
64. Jackman RW e Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am j Physiol Cell Physiol.* 2004; 287: C834-C43.
65. Jaffe DM, Terry RD, Spiro AJ. Disuse atrophy of skeletal muscle. A morphometric study using image analysis. *J. Neurol. Sci.* 1978; 35: 189-200.
66. Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001; 4: 183–90.
67. John ML, Wook S, Scott RD. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35(1): 9-16.



83. Michael K. Relationship of skeletal muscle atrophy to functional status: a systematic research review. *Biol. Res. Nurs.* 2000; 2(2): 117-31.
84. Meydani M, Evans WJ. Free radicals, exercise, and aging. In: Yu, BP, Ed. *Free Radical in Aging*. Boca Raton. 1993; 183-204.
85. Morehouse LA, Aust SD. Microsomal oxygen radical generation-relationship to the initiation of lipid peroxidation. In: Chow CK, editor. *Cellular antioxidant defense mechanisms*. Boca Raton: 1988; CRC: 1-9.
86. Moskalewski S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1965; 44: 342-53.
87. Nicholson WF, Watson PA. Glucose uptake and glycogen synthesis in muscles from immobilized limbs. *J Appl Physiol.* 1984; 56: 431-35.
88. Niranjana BG, Bhat NK, Avadhani NG. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis. *Science.* 1982; 215:73-5.
89. Nourooz-Zadeh, J. Ferrous oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. *Methods Enzymol.* 1999; 300: 58-62.
90. Nunes WMS, Mello, MAR. Glucose Metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 48(4): 541-48.
91. O'keefe MP, et al. Development of whole-body and skeletal muscle insulin resistance after one day of hindlimb suspension. *Metabolism.* 2004; 53(9): 1215-22.
92. Oliveira EM, Ramires PR, Lancha Junior A . *Nutrição e Bioquímica do exercício*. Rev. Paulist. Educ. Fis. 2004; 18: 7-19.
93. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsock J, Sasvari M, et al. The effects of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcome. *Free Radical Biology and Medicine.* 1999; 27(1/2): 69-74.
94. Rafacho A, Boschero AC, Bosqueiro JR. Dexametasona aumenta a resposta secretória de insulina à glicose a despeito da diminuição da expressão de conexinas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2004; 48(2): S148-S58.
95. Rafacho A, Giozzet CAG, Gomes L, Boschero AC, Bosqueiro JR. Dexametasona altera a sensibilidade à glicose e a insulina e os níveis de lipídeos circulantes de maneira dose-dependente em ratos. In: VII Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo, vol 50, 2006c, Guarujá-SP.
96. Reardon KA, Fracp BS, Davis J, Kapsa RMI, Choong P, Fracs MD, et al. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are

- model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006; 39: 979-85.
110. Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ. Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res* 2000; 302(2): 235-41.
  111. Stein T, Schluter M, Galante A, Soteropoulos P, Toliás P, Grindeland R, et al. Energy metabolism pathways in rat muscle under conditions of simulated microgravity. *J Nutr Biochem*. 2002; 13: 471.
  112. Sutton R, Peters M, Mcshane P, Gray DW, Morris PJ. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. *Transplantation*. 1986; 42(6): 689-91.
  113. Talmadge RJ. Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection. *J Appl Physiol*. 2002; 93(4): 1487-97.
  114. 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*. 2004; 9: 76-85.
  115. Turinsk J. Dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. *Am J Physiol*. 1987; 252(3Pt2): 531-537.
  116. Tyler DD. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J*. 1975; 147: 493-504.
  117. Uhlig e Wendel A. The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sci*. 1992; 51: 1083-94.
  118. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; 160: 1–40.
  119. Veldhuizen JW, Yerstappen FT, Yroemen JP, Kuipers H, Greep JM. Functional and morphological adaptations following four weeks of knee immobilization. *Int J Sports Med* 1993; 14(5): 291-2.
  120. Williams PE. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. *Ann Rheu Dis*. 1988; 47: 1014-16.
  121. Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties of immobilized muscle. *J Anat*. 1978; 127: 459-68.
  122. Wittwer M, Fluck M, Hoppeler H, Müller S, Desplanches D e Billeter R. Prolonged unloading of rat soleus muscle causes distinct adaptations of the gene profile. *FASEB J*. 2002; 16: 884–86.