



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MORGANA OLIVEIRA LIRA

**ANÁLISE HISTOMUTAGÊNICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À
IMOBILIZAÇÃO**

**CAMPINA GRANDE-PB
2016**

MORGANA OLIVEIRA LIRA

**ANÁLISE HISTOMUTAGÊNICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À
IMOBILIZAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do grau de Licencianda em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Morfologia/
Mutagênese

Orientador: Prof. Dr^a. Aline dos Santos de Maman.

Coorientador: Prof. Dr. Walelécio Moraes Lira.

**CAMPINA GRANDE
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

L768a Lira, Morgana Oliveira.

Análise histomutagênica em camundongos submetidos à imobilização [manuscrito] / Morgana Oliveira Lira. - 2016.
45 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Aline dos Santos de Maman, Departamento de Ciências Biológicas".

"Co-Orientação: Prof. Dr. Walclécio Morais Lira, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Imobilização. 2. Gastrocnêmio. 3. Genotoxicidade. 4. Micronúcleo. I. Título.

21. ed. CDD 576.5

MORGANA OLIVEIRA LIRA


ANÁLISE HISTOMUTAGÊNICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À
IMOBILIZAÇÃO

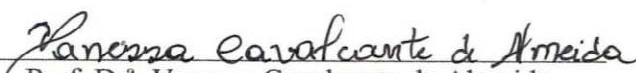
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do grau de Licencianda em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Morfologia/
Mutagênese.

Aprovada em: 01 /04/2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr^a. Aline dos Santos de Maman (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr^a. Vanessa Cavalcante de Almeida
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Danilo de Almeida Vasconcelos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Ao meu eterno professor Miguel, que deixou muitas
saudades, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À minha orientadora, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, pela motivação, aprendizado e incentivo dado durante toda a graduação.

Ao Núcleo de Mutagênese Ambiental (NUMA), especialmente a Andeilma e Rayane, pelas ajudas frente as dúvidas que tive no ambiente laboratorial.

Ao laboratório de Anatomia Patológica e ao LEAq que cederam seus espaços para continuar etapas importantes deste trabalho.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus amigos que me ajudaram com suas presenças, no desenvolver dessa cansativa pesquisa, especialmente Larissa, Petronio e Dara. Vocês foram revitalizantes pra mim!

À Maria, professora de Ciências que tive no ensino fundamental, que foi um espelho para mim, e hoje finalizo um sonho de seguir seus passos também na Biologia.

Aos colegas de classe e professores, pelos momentos de amizade e apoio.

RESUMO

O tecido muscular sofre adaptações em decorrência do uso ou do desuso excessivo. O desuso do tecido muscular pode ser decorrente de lesões neurológicas que causam paralisias ou da imobilização, comumente usada como recurso terapêutico no tratamento de lesões ortopédicas diversas. As adaptações sofridas pelo tecido muscular durante a imobilização podem ser influenciadas pelas variáveis: tempo e posição do membro imobilizado. O objetivo deste trabalho é avaliar o possível potencial mutagênico da imobilização, através do teste de micronúcleo *in vivo*, bem como as alterações morfológicas dos músculos gastrocnêmios do membro posterior esquerdo dos camundongos machos submetidos ao período de 21 dias de imobilização, em ambas as posições de flexão plantar e flexão dorsotibial. Os animais foram divididos em seis grupos: I- Imobilização da pata traseira esquerda por 21 dias em posição de flexão plantar (IMPE21dFP), II- Imobilização da pata traseira esquerda por 21 dias em posição de flexão dorsotibial (IMPE21dFD), III- Grupo controle negativo/flexão plantar (GC-FP), IV- Grupo controle negativo/ flexão dorsotibial (GC-FD), V- Grupo Controle Positivo (GC+), VI- Grupo controle (GC). Os pesos corpóreos dos animais foram registrados ao início e término do experimento. O sangue foi coletado no primeiro e último dias de imobilização, e ao término dos períodos de imobilização, os animais foram sacrificados e os músculos gastrocnêmios foram extraídos, pesados em balança digital, medidos com paquímetro digital e processados para inclusão em blocos de parafina para obtenção de cortes transversais e longitudinais para análise em microscopia de luz. Na análise morfológica foram analisados o epimísio, perimísio, endomísio, vasos sanguíneos e miócitos. A partir do sangue coletado, foi realizada a contagem de micronúcleos e estabelecida a relação de toxicidade da imobilização. Constatou-se que a imobilização por 21 dias em ambas as posições, desencadeou atrofia muscular bem evidente, mediada por aumento de tecido conjuntivo tanto no endomísio, quanto no perimísio. As fibras mostraram-se com morfologia alterada. Os animais imobilizados apresentaram menor aumento do peso corpóreo entre o primeiro e o último dias de imobilização, em comparação com o grupo controle. Os animais imobilizados em ambas as posições também apresentaram redução do peso, largura e espessura dos músculos gastrocnêmios, em comparação ao grupo controle. Além disso, nos grupos imobilizados observou-se um discreto aumento na frequência de micronúcleos, em comparação aos respectivos grupos controles negativos, indicando que a imobilização pode ser considerada como um fator de estresse com potencial mutagênico, embora neste tempo de imobilização utilizado no presente estudo, esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Portanto, a imobilização acarreta alterações histológicas evidentes e influencia na frequência de micronúcleos.

Palavras-Chave: Imobilização. Gastrocnêmio. Morfologia. Micronúcleo.

ABSTRACT

The muscular tissue has undergone adaptations due to either the disuse or the excessive use. The disuse of the muscular tissue can result from either the neurological injuries that cause paralysis or the immobilization, frequently used as a therapeutic resource in the treatment of several orthopedic injuries. The adaptations underwent by the muscular tissue during the immobilization, can be influenced by the variables: time and the position of the immobilized limb. The focus of this research is to evaluate the possible mutagenic potential of immobilization, using the *in vivo* micronucleus test, as well the morphologic alterations of the gastrocnemius muscles of the left hind limbs of the male mice subjected to the period of 21 days of immobilization, in either plantar flexion and dorsotibial flexion positions. The animals were separated in 6 groups: I – Immobilization of the left hind leg during 21 days in plantar flexion position (IMPE21dFP), II – Immobilization of the left hind leg during 21 days in dorsotibial flexion position (IMPE21dFPD), III – Plantar negative/flexion control group (GC-FP), IV – Dorsotibial negative/flexion control group (GC-FD), V – Positive control group (GC+), VI – Control group (GC). The body weight of each animal was obtained and registered prior and after the procedure. The blood was collected in the first and in the last days of immobilization. Upon conclusion of experiment, the animals were sacrificed and the gastrocnemius muscles were extracted and weighed in digital precision weighing balances, measured with a digital caliper and processed for inclusion in paraffin blocks to obtain transversal and longitudinal cuts to be analysed in light microscopy. In the morphological analyses, the epimysium, perimysium, endomysium, blood vessels and myocytes were analyzed. The micronucleus count and the establishment of the relation of toxicity of immobilization were performed from the collected blood. It was found that the immobilization in both positions during 21 days unleashed strong muscular atrophy due to the increase of connective tissue either in the endomysium and perimysium. The fibers presented altered morphology. The corporal weight of the animals remained constant and presented mass gain at the end of the experiment. The immobilized animals in both positions showed that the gastrocnemius muscle had weight, width and thickness reduction in comparison to the control group. Beside that, in the immobilized groups was observed a discrete increase in the micronucleus frequency, in comparison to the respective negative control groups, indicating that the immobilization can be considered as a stress factor with mutagenic potential, although at this time of immobilization used in this study, this difference was not statistically significant. Therefore, the immobilization results in apparent histological alterations and influences in the micronucleus frequency.

Keywords: Immobilization. Gastrocnemius. Morphology. Micronucleus.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral.....	11
2.2	Objetivos específicos.....	11
3	REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1	Estrutura do músculo estriado esquelético.....	12
3.2	Tipos de fibras musculares	13
3.3	Estudos envolvendo imobilização	14
3.4	Micronúcleos como marcadores de genotoxicidade.....	16
4	METODOLOGIA	19
4.1	Animais e grupos.....	19
4.2	Imobilização articular.....	19
4.3	Peso corpóreo.....	21
4.4	Coleta do tecido muscular.....	21
4.5	Teste <i>in vivo</i> de micronúcleo em sangue periférico.....	21
4.6	Processamento histológico.....	22
4.7	Análise estatística.....	24
5	RESULTADOS	25
5.1	Análise de peso corpóreo e das medidas dos músculos gastrocnêmios.....	25
5.2	Análise de micronúcleos (MN).....	27
5.3	Análise morfológica.....	29
5.3.1	Cortes longitudinais (50x).....	29
5.3.2	Cortes transversais (50x).....	29
5.3.3	Cortes longitudinais (100x).....	30
5.3.4	Cortes transversais (100x).....	31
5.3.5	Cortes longitudinais (200x).....	32
5.3.6	Cortes transversais (200x).....	32
5.3.7	Cortes longitudinais (400x).....	33
5.3.8	Cortes transversais (400x).....	34
5.3.9	Cortes longitudinais (1000x).....	34
5.4.0	Cortes transversais (1000x).....	35
6	DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXO A –PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	45

1 INTRODUÇÃO

O tecido muscular possui uma admirável particularidade, sendo capaz de responder diferentemente a estímulos tanto externos quanto internos, a alterações hormonais, exercícios físicos, nutrição, eletroestimulação ou à ausência de estímulos, a exemplo da desnervação e da imobilização. A arquitetura e metabolismo do músculo esquelético são altamente suscetíveis e sensíveis a estímulos mecânicos. Modificações na magnitude, frequência, duração e intensidade do estresse mecânico podem causar mudanças nos padrões de expressão de genes no músculo, acarretando modificações na síntese proteica (TIDBALL, 2005).

Este tecido consiste em células alongadas com grandes quantidades de miofibrilas, filamentos citoplasmáticos responsáveis pela contratilidade celular. É um tecido altamente adaptável e, portanto, o uso excessivo ou o desuso podem desencadear alterações morfológicas, bioquímicas ou funcionais para o músculo esquelético (HAIMOVITCH, 2006). O uso excessivo desencadeia a hipertrofia, evidenciada pelo aumento na síntese de proteínas, visto que o trabalho muscular estimula a expressão de um fator de crescimento de proteínas, chamado *IGF-Insulin-like growth factor* (GLASS, 2003). Contrariamente, ao sofrerem lesões, suas funções bioquímicas, mecânicas e estruturais são alteradas, podendo desenvolver o processo de atrofia (FERREIRA et al., 2004; JUNQUEIRA et al., 2008).

Esse processo de atrofia é caracterizado pela diminuição de massa do músculo devido à redução de fibras por músculo e, principalmente, pela redução da quantidade de miofibrilas em paralelo (LARA, 2003). A estrutura e função dos músculos esqueléticos são condicionadas pela atividade proprioceptiva, inervação motora, carga mecânica imposta ao tecido e realização de ciclos de estiramento/encurtamento e pela mobilidade das articulações. O comprometimento de algum desses fatores certamente acarretará em um quadro de hipotrofia ou atrofia muscular (FERREIRA et al., 2004).

Esta atrofia vem acompanhada de aumento do tecido conjuntivo no perimísio, endomísio e na membrana plasmática da fibra muscular (sarcolema), com dispersão dos receptores de acetilcolina. O acúmulo destes receptores deve-se às terminações nervosas envolvidas na organização da placa motora no músculo. Quando as fibras se encontram desnervadas, os receptores de acetilcolina das fibras não se acumulam e ficam dispersos na membrana muscular, comprometendo a relação neuromuscular (MCPHEE et al., 2011). O desuso muscular crônico potencializa o estado catabólico em músculos esqueléticos de humanos e ratos (CANCELLIERO et al., 2005), podendo influenciar também nas condições

metabólicas, cardiovasculares, respiratórias, gastrointestinais e até mesmo alterações psicológicas (MELO, 2005).

Diversos fatores desencadeiam a atrofia muscular, tais como a desnervação, lesões musculoesqueléticas, repouso prolongado, tratamento com glicocorticoides, septicemia, câncer, envelhecimento e a imobilização articular (BODINE et al., 2001). Dentre estes fatores que desencadeiam a atrofia muscular, a imobilização consiste em um procedimento comumente utilizado em tratamentos conservadores ou pós-cirúrgicos de lesões musculoesqueléticas como fraturas ósseas, rupturas ligamentares, lesões musculares ou doenças degenerativas articulares (KONNO et al., 2008).

No processo de imobilização, a taxa de degradação de proteínas aumenta e tem sido correlacionada com a ativação de proteases celulares, mais notavelmente a ubiquitina (GLASS, 2003). Esse processo de atrofia muscular causa prejuízos à atividade contrátil, com alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais (CANCELLIERO et al., 2005).

Portanto, o músculo sofre adaptações quando imobilizado e, estas adaptações são influenciadas pela posição em que o mesmo é imobilizado. Além da posição articular e do período de imobilização, as adaptações musculares dependem dos tipos de fibras que predominam no músculo envolvido, sendo as fibras oxidativas mais afetadas em comparação às glicolíticas (LIMA et al., 2007; CANCELLIERO et al., 2005).

As fibras do tipo I (fibras tônicas) possuem predominante metabolismo oxidativo, sendo as mais vulneráveis à atrofia induzida pelo desuso. Já as fibras tipo IIa e IIb são oxidativas-glicolíticas rápidas ou glicolíticas, respectivamente. O músculo sóleo, por exemplo, apresenta predominância de fibras do tipo I e, portanto, sofre maior comprometimento frente à restrição de mobilidade quando comparado ao músculo gastrocnêmio, cujas fibras são predominantemente glicolíticas (LIMA et al., 2007).

Desta forma apesar dos efeitos deletérios indesejáveis às células musculares, a imobilização é uma opção de tratamento frequentemente usada em lesões ortopédicas e também representa uma consequência de patologias neurológicas diversas (LIMA, 2007). A imobilização causa danos estruturais ao tecido muscular (KUNZ et al., 2013) e a intensidade destes danos depende do tempo de imobilização (BERTOLINI et al., 2010). Condições de estiramento muscular ou contusão grave requerem um tratamento conservador que varia de quatro a seis semanas e que costuma envolver a imobilização como recurso terapêutico (FERNANDES et al., 2011). São necessários mais esclarecimentos quanto às diferentes adaptações dos músculos gastrocnêmio e sóleo em resposta à imobilização (PAIXÃO et al., 2011; CARVALHO et al., 2013).

Visto que a imobilização configura-se como uma condição que interfere na homeostase e induz estresse, gerando danos consideráveis à arquitetura muscular, supõe-se a possibilidade de a imobilização gerar fragmentos cromossômicos ou do aparelho mitótico, detectados pela formação de micronúcleos.

Os micronúcleos são estruturas presentes no citoplasma de células em divisão, que possuem características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal quando avaliados ao microscópio óptico. São formados tanto por fragmentos acêntricos como por cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase do ciclo celular (CARVALHO et al., 2002). Sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais (RIEGER, 1968) ou, ainda, por falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (CARRARD et al., 2007).

A formação destes é verificada através do Teste de Micronúcleo (TM), que detecta agentes químicos ou físicos capazes de induzir mutações (RIBEIRO et al., 2003). O teste de micronúcleo *in vivo* é mais amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). Tem sido aplicado extensivamente em testes de genotoxicidade de produtos químicos, pois os micronúcleos são facilmente visualizados nos eritrócitos e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas (CAMPANA et al., 2003).

Nesse contexto, no presente estudo foi realizada uma análise morfológica do músculo gastrocnêmio de camundongos machos submetidos ao período de 21 dias de imobilização, nas posições de flexão plantar e flexão dorsotibial da pata traseira esquerda, bem como a avaliação do possível potencial mutagênico da imobilização através do teste de micronúcleo *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o possível potencial mutagênico da imobilização, através do teste de micronúcleo *in vivo*, bem como as alterações morfológicas dos músculos gastrocnêmios do membro posterior esquerdo dos camundongos machos submetidos ao período de 21 dias de imobilização, em ambas as posições de flexão plantar e flexão dorsotibial.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a variação do peso corpóreo dos camundongos ao longo dos 21 dias de imobilização.
- Avaliar as alterações de peso, largura e espessura dos músculos gastrocnêmios de camundongos imobilizados durante 21 dias em posições de flexão plantar e flexão dorsotibial.
- Avaliar a frequência de micronúcleos nos eritrócitos dos animais imobilizados durante 21 dias em posições de flexão plantar e flexão dorsotibial.
- Avaliar a toxicidade da imobilização.
- Avaliar as alterações morfológicas dos músculos gastrocnêmios de camundongos após 21 dias de imobilização em posições de flexão plantar e flexão dorsotibial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estrutura do músculo estriado esquelético

Os músculos esqueléticos são constituídos por inúmeras fibras musculares que variam de 10 a 80 micrômetros de diâmetro. São envolvidas por uma membrana chamada de sarcolema, composta por uma camada polissacarídica e contém numerosas fibrilas colágenas, cuja função é manter a integridade do meio intracelular. No citoplasma, responsável por preencher todos os espaços entre as miofibrilas, encontram-se substâncias dispersas, dentre elas, grânulos de glicogênio, compostos fosforados, enzimas e organelas, como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias (COOKE, 1961).

Em cada extremidade da fibra muscular, o sarcolema funde-se com a fibra do tendão. A fibra do tendão por sua vez, se agrupa em feixes para formar os tendões dos músculos que se inserem nos ossos (GUYTON, 2011). Um tendão é composto de tecido conjuntivo denso e liga um músculo ao perióstio de um osso. Quando um músculo contrai, ele encurta e isto coloca tensão em seus tendões e nos ossos onde estes se fixam. A tensão muscular causa o movimento dos ossos em torno das articulações sinoviais, sendo que um dos ossos em que há fixação geralmente movimenta-se mais que o outro. A fixação óssea mais móvel do músculo, conhecida como *inserção*, é puxada em direção a sua fixação óssea menos móvel, a *origem*. A porção contrátil de um músculo é chamada *ventre*.

Quando os tendões são achatados, semelhantes a lâminas, são chamados de *aponeuroses* (GRAAFF, 2003). Na maioria dos músculos esqueléticos, cada fibra se prolonga por todo o comprimento do músculo. Exceto por 2% das fibras, cada uma em geral é inervada por apenas uma terminação nervosa, situada perto do meio da fibra (GUYTON, 2011). Cada fibra muscular é constituída de centenas a milhares de miofibrilas, que são longos cilindros no comprimento de cada célula, estes, por sua vez, possuem estruturas menores chamadas miofilamentos de proteínas polimerizadas responsáveis pelas reais contrações musculares. A composição de cada miofibrila são cerca de 1.500 filamentos de miosina adjacentes, os filamentos mais espessos e por 3.000 filamentos de actina, os filamentos mais finos (GUYTON, 2011).

As fibras musculares se contraem eficientemente, atuando no conjunto, e não como unidade isolada. Cada fibra é ligada as fibras adjacentes formando feixes, e os feixes são ligados a outros feixes. As fibras são unidas por tecido conjuntivo. Cada fibra é envolta por uma bainha de tecido conjuntivo chamada *endomísio*. O conjunto de fibras se reúne em feixes

formando fascículos, e estes fascículos são envolvidos por outro tecido conjuntivo, o *perimísio*. O conjunto de fascículos que forma o músculo inteiro é coberto pelo *epimísio*, que é continuado com o tendão (GRAAFF, 2003).

3.2 Tipos de fibras musculares

As fibras musculares podem ser divididas, basicamente, quanto às propriedades estruturais e metabólicas em dois tipos: I e II (GUNNING, 1991). As do tipo I, vermelhas, de contração lenta ou oxidativas lentas, são fibras menores, inervadas por fibras nervosas pequenas, possuem vasos sanguíneos mais extensos, para suprir quantidades extras de oxigênio. Apresentam contração baixa e são extremamente resistentes à fadiga (GUNNING, 1991). Possuem número de mitocôndrias muito elevado também para dar suporte aos altos níveis de metabolismo oxidativo (sua principal fonte energética é o sistema aeróbico). Contém grande quantidade de mioglobina, proteína que contém ferro, semelhante à hemoglobina nas hemácias. Esta proteína dá a esse tipo de músculo uma aparência avermelhada, e liga-se ao oxigênio, armazena-o até que ele seja necessário, fazendo com que o transporte de oxigênio para as mitocôndrias seja acelerado (GUYTON, 2011).

As fibras tipo II, brancas ou de contração rápida, são fibras grandes para grande força de contração. Possuem retículo sarcoplasmático muito extenso, para a liberação de íons cálcio responsáveis pela contração. Possuem grandes quantidades de enzimas glicolíticas, para a rápida liberação de energia pelo processo glicolítico. Seu suprimento sanguíneo é menos extenso devido ao metabolismo oxidativo ter importância secundária. O número de mitocôndrias é reduzido, já que o metabolismo que predomina é o glicolítico. Possuem déficit de mioglobina vermelha, e por esse motivo é denominado músculo branco (GUYTON, 2011).

As fibras do tipo II podem ser subdivididas em vários grupos, mas especialmente em tipos IIA e IIB. A fibra do tipo IIB, ou glicolítica rápida, possui o tempo de contração mais rápido, maior força de contração e menor resistência à fadiga. Seu sistema glicolítico é bem desenvolvido, ao contrário do oxidativo, portanto utiliza basicamente o sistema anaeróbico. A fibra do tipo IIA, ou oxidativa glicolítica rápida, é a intermediária entre os tipos I e IIB (GUNNING, 1991).

A maioria dos músculos humanos é composta por uma mistura de tipos de fibras. Músculos tônicos ou posturais, como o sóleo, possuem maior proporção de fibras tipo I. Músculos fásicos ou de contração rápida, como o gastrocnêmio, têm maior proporção de fibras tipo II (GARRET, 1994).

3.3 Estudos envolvendo imobilização

A maioria dos experimentos para se estudar os eventos que ocorrem no músculo durante e após a imobilização, foi realizada em animais, devido principalmente à questões éticas. Investigações em humanos, voluntários ou pacientes, poderiam fornecer somente medidas de trofismo muscular, força de um grupo de músculos, características de contração e, talvez, alguns parâmetros morfológicos e bioquímicos obtidos por meio de biópsia muscular (APPELL, 1990). Os modelos animais permitem maior compreensão das alterações provocadas no músculo pela imobilização. Estudos prévios demonstram que durante sete e quatorze dias de imobilização ocorrem perda na área das fibras e aumento de espaço entre os feixes musculares. Diferenças mais evidentes foram notadas na segunda semana de imobilização (BERTOLINI et al., 2010). Foi relatado redução do comprimento da fibra, atrofia muscular e diminuição das propriedades mecânicas musculares após duas ou três semanas da imobilização em posição de encurtamento (GOMES et al., 2004). Por outro lado, há estudos que mostram que algumas dessas adaptações já podem ser observadas entre 1 e 7 dias pós-imobilização (LIMA et al., 2007).

Em diversos períodos, a imobilização pode causar diferentes graus de hipotrofia. Essa redução no diâmetro das fibras pode ser explicada pelas modificações na síntese e degradação proteica. Alguns estudos evidenciaram, já nas primeiras 24 horas, redução de 50% no músculo sóleo de ratos e da ativação nervosa (HÄKKINEM, 1985; TAILLANDIER et al., 2003). Outro estudo evidenciou diminuição de 43% da área da fibra do músculo sóleo imobilizado durante três semanas, bem como redução de 16% na área de secção transversa em apenas dois dias de imobilização, e a perda foi mais significativa no sexto dia (GOMES et al., 2004).

Paralelamente, Bodine et al. (2001) e Picquet e Falempin (2003) descrevem que a atrofia muscular no período de 14 dias mostra redução de 45% do peso muscular nos músculos imobilizados, indicando possível decréscimo na área da fibra muscular. Entretanto, Appell (1986) relata que a diminuição mais pronunciada do diâmetro das fibras acontece durante a primeira semana de imobilização. No entanto, as correlações entre os membros experimentais e autocontroles mostraram-se mais discretas, apesar de presentes. Estudo realizado por Bertolini, Oliveira e Cararo (2010) demonstrou perda de área de fibras e aumento dos espaços entre os músculos pós-imobilização do sóleo por 7 e 14 dias. Dados histológicos demonstram que com apenas um dia de imobilização, ocorre redução de cerca de

8% da massa muscular no músculo gastrocnêmio, podendo chegar a 30% após 5 dias de imobilização (BRITO et al., 2011).

O músculo gastrocnêmio imobilizado por 7 e 14 dias, respectivamente, e submetido a ensaio de tração, apresentou resistência reduzida em 21% ao 7º dia e em 27% ao 14º dia pós-imobilização, com conseqüente redução da força muscular e aumento da suscetibilidade a rupturas (MATHEUS et al., 2007). Os músculos sóleo e gastrocnêmio em posição encurtada diminuíram significativamente o peso, após 28 dias de imobilização, mas isto não aconteceu para o imobilizado em posição alongada (FOURNIER et al., 1983). A imobilização durante 15 dias induziu atrofia e, aos 45 dias esta atrofia se apresentou ainda mais pronunciada, sendo mais afetado o músculo gastrocnêmio em comparação ao músculo sóleo, quando consideradas as perdas de peso e área muscular. Em contraposição, o músculo sóleo apresentou aumento mais significativo de tecido conjuntivo em comparação ao músculo gastrocnêmio (PAIXÃO et al., 2011).

Em um estudo sobre atrofia muscular Thompson (1934), imobilizou durante seis semanas, com aparelho gessado, um membro posterior de um grupo de coelhos, em posição flexionada, naturalmente adquirida pelo animal, e, permitindo descarga de peso. Em outro grupo, manteve a imobilização com o membro em posição estendida, não permitindo o apoio. Ficou evidenciado que houve uma grande atrofia muscular nos músculos da panturrilha e nos isquiotibiais, porém ela foi menor nos animais onde houve descarga de peso.

Outros achados histológicos pós-imobilização são a diminuição de área de secção transversa do músculo, ocorrência de fendas citoplasmáticas, divisão fibrótica, diminuição de capilares, infiltrado de tecido conjuntivo e centralização dos núcleos (COUTINHO et al., 2004; PAIXÃO et al., 2011). O comprimento muscular funcional também é alterado pelo processo de atrofia, sendo importante para influenciar as propriedades contráteis musculares (ARTIFON et al., 2012). Quando um músculo é imobilizado na posição encurtada, ocorre uma redução no seu comprimento, em suas fibras e no número de sarcômeros em série dentro das miofibrilas, sendo que essa diminuição de comprimento e de sarcômero contribui para a atrofia e a fraqueza muscular (KISNER; COLBY, 2009).

Durante um processo de imobilização já se sabe que existe atrofia da musculatura esquelética do membro imobilizado (JÚNIOR et al., 2010). Ela caracteriza-se pela diminuição do tamanho da fibra muscular (BOOTH, 1982; MACHIDA et al., 2004; ZHANG et al., 2007), área de secção transversal e conteúdo proteico (FALEMPIN, et al., 1998; ZHANG et al., 2007), redução da potência muscular, maior fatigabilidade e aumento da resistência à insulina (ZHANG et al., 2007). Sabe-se que a diminuição da síntese e o aumento da degradação

proteica envolvidas neste processo contribuem para a perda total de proteína muscular devido ao desuso. Embora os acionadores que causam atrofia sejam diferentes, a perda de massa muscular, em cada caso, envolve uma via comum que estimula a proteólise muscular. Considera-se que o mesmo é um processo que envolve a interação entre duas ou mais vias de sinalização, ao invés da ideia de se trabalhar com uma via isolada como responsável (ZHANG et al., 2007).

No estudo feito por Jyoti et al. (2003), ratos foram imobilizados mantendo-os em frascos de plástico transparente com 5 furos em 1 dia por 4 horas. Foi observada supressão acentuada da espermatogênese, alterações anatômicas nos túbulos seminíferos, redução em tamanho e número das espermatogônias e processos degenerativos. Portanto o estresse da contenção suprimiu a biossíntese de testosterona (WEISSMAN et al., 2007) que culminou nessas alterações supra-citadas.

O estresse compreende um quadro de distúrbios físicos e emocionais provocado por diferentes tipos de fatores que alteram o equilíbrio interno do organismo. Não está somente ligado à respostas endócrinas e metabólicas, mas a alguns efeitos de longo prazo. Assim, estresse emocional (imobilização ou restrição, isoladamente ou em combinação com outros estímulos) podem induzir alterações genéticas e provocar outros danos maiores, além dos conhecidos. No estudo feito por Sánchez et al. (2002), ratos foram submetidos à diferentes tipos de estresse: Imobilização com uma fita adesiva, contenção em cilindros pequenos de fundo plano, com ou sem exposição ao frio por 1 hora/dia durante 4 dias. Através das atividades enzimáticas e concentrações de glicose e glicogênio, foram demonstrados que a imobilização se comportou como um estressor potente em ratinhos, em relação aos outros tipos de estresse. Portanto o estresse agudo, tanto emocional ou social, tem efeitos nocivos sobre a homeostase, e pode desencadear alterações sistêmicas diversas.

3.4 Micronúcleos como marcadores de genotoxicidade

O papel de anormalidades genéticas e cromossômicas em provocar o desenvolvimento do câncer têm sido estabelecidos (DUESBERG, 2007). O processo de geração de carcinomas envolve uma via multi-fatorial em que múltiplos fatores extra e intra-celulares, em última instância levam a formação de tumores (HAMILTON et al., 2006). As mudanças repentinas no ambiente podem resultar em ação desestabilizadora e alterar várias funções do organismo.

O estresse foi descrito como circunstância onde lidar com uma variedade de estímulos altera o estado de homeostase de um organismo, incluindo o comportamento, o sistema endócrino e imunológico. Respostas neurofisiológicas induzidas por diferentes estressores ativam o sistema nervoso simpático e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Os efeitos de vários tipos de estresse no sistema nervoso, dos níveis de hormônios do estresse no plasma, e respostas comportamentais têm sido estudados em muitas espécies animais (KOSTEN et al., 2007; MANTSCH et al., 2007; WEISSMAN et al., 2007).

Como qualquer outra situação de estresse, o estresse agudo de contenção estimula um aumento imediato nos níveis plasmáticos de glicocorticóides (BOWERS et al., 2008). Tais hormônios irão afetar as vias metabólicas de proteínas, carboidratos e lipídios, que regulam a homeostase. Devido aos efeitos mediados na atividade fisiológica e celular, é possível que o estresse possa aumentar a probabilidade de danos genômicos e alterar a regulação transcricional do ciclo celular em células em divisão (FLINT et al., 2005). Os efeitos do estresse sobre a função celular via glicocorticóides (DICKMEIS et al., 2007) e indução de mau funcionamento da proliferação e divisão celular podem levar a anormalidades genéticas nas células filhas descendentes. O estresse por restrição de movimento poderia causar alterações no padrão de expressão de genes, que são responsáveis pela regulação do ciclo celular e apoptose em células T de ratos (FLINT et al., 2005).

Malvandi et al. (2010) estudou os efeitos do estresse de contenção por 2 horas associado a vimblastina, um potente inibidor mitótico, na indução de danos cromossômicos. Neste estudo, o ensaio de micronúcleo (MN) foi realizado. Mostrou um notável aumento do número de eritrócitos policromáticos micronucleados na medula óssea, através da combinação de tratamento vimblastina com estresse agudo de contenção, em relação ao grupo tratado somente com vimblastina, indicando a potencialidade de um agente aneugênico por exposição a um estressor emocional.

Este ensaio tem sido amplamente utilizado para analisar anomalias cromossômicas. Neste ensaio, qualquer estrutura e/ou anormalidade cromossômica numérica, resultante da perda cromossômica, pode ser distinguida por encontrar um pequeno núcleo no citoplasma e são vistos facilmente nos eritrócitos.

Os eritroblastos, na medula óssea, sofrem uma duplicação final dos cromossomos, após se dividirem se diferenciam em eritrócitos policromáticos. Os micronúcleos (MNs) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas, após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do

fragmento, o qual será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula. Os MNs podem, também, ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo. Durante a diferenciação o núcleo principal é expelido do eritrócito nucleado, enquanto os micronúcleos ficam retidos (RIBEIRO, 2003).

O aspecto mais importante do Teste de Micronúcleo é que permite identificar o eventual aumento na frequência de mutação de células que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos, por isso é capaz de expressar os danos no cromossomo como MNs. Assim, o teste de MN é originalmente, entre os testes citogenéticos, o que fornece uma medida de confiança da perda e da ruptura do cromossomo (FENECH, 1998). Além da confiabilidade, consiste em um teste rápido, de baixo custo, de técnica acessível em relação a outros ensaios (FLORES et al., 2008).

4 METODOLOGIA

4.1 Animais e grupos

O presente trabalho seguiu os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA/CESED-PB. Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/C (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA, 2000) espécie *Mus musculus*, com 9 a 11 semanas de vida e peso corpóreo entre 30 e 35 gramas, provenientes do Laboratório de Biogenética (NUMA) - Prédio das Três Marias, da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande. Os animais permaneceram em caixas de polipropileno com tampa de aço inoxidável e assoalho recoberto por maravalha, à temperatura ambiente. Os camundongos receberam dieta *ad libitum* e água servida em bebedouro suspenso. Os animais foram divididos em seis grupos, cada grupo contendo 6 animais, sendo um grupo controle, dois grupos submetidos à imobilização, em flexão plantar e flexão dorsotibial, respectivamente, além de dois grupos controles negativos e um grupo controle positivo, usados para a análise de micronúcleo.

4.2 Imobilização articular

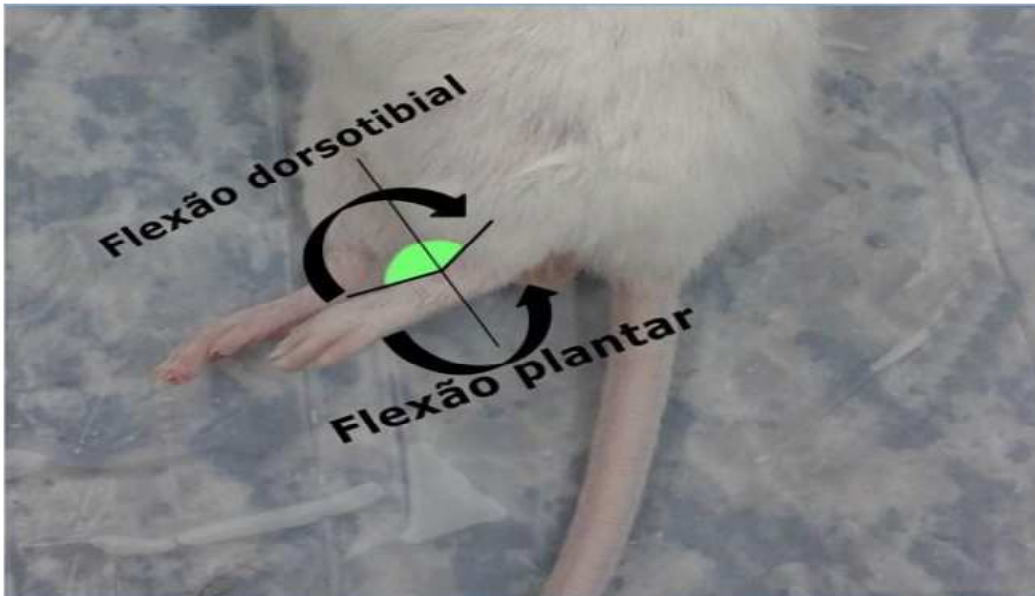
Os camundongos foram anestesiados via intramuscular com dosagens mínimas de cloridrato de Cetamin e Dopaser, na proporção de 1:1, em dose de 4 µl, para proceder-se a imobilização. Os membros traseiros esquerdos tiveram seus músculos gastrocnêmios imobilizados em posição encurtada (flexão plantar) e alongada (flexão dorsotibial) com os camundongos anestesiados em decúbito lateral direito.

Foi utilizado *esparadrapo* envolvendo o membro nas posições de flexão dorsotibial e flexão plantar do tornozelo, respectivamente, esta última com o apoio de um palito de picolé. O uso de esparadrapo no estudo feito por Júnior et al. (2010) apresentou grandes vantagens por se mostrar seguro e de fácil manutenção. Os grupos foram formados por distribuição aleatória e os animais foram vistoriados diariamente, mais de uma vez por dia, a fim de manter eficiente a imobilização. Nos casos em que houve danificação da imobilização pelo próprio animal, novo procedimento de imobilização sem sedação foi imediatamente conduzido.

O sangue foi coletado no primeiro e último dias de imobilização e, posteriormente ao sacrifício, seus músculos foram dissecados. As posições de imobilização do tornozelo do camundongo estão representadas nas figuras 1 e 2, respectivamente.

Os animais que não foram imobilizados permaneceram livres, sem serem submetidos a qualquer condição de estresse. Seus músculos foram dissecados para análise morfológica.

Figura 1- Posições de flexão dorsotibial e flexão plantar da pata traseira esquerda.



Fonte: dados da pesquisa, 2016.

Figura 2- Imobilizações em posições de flexão plantar e flexão dorsotibial



Fonte: dados da pesquisa, 2016.

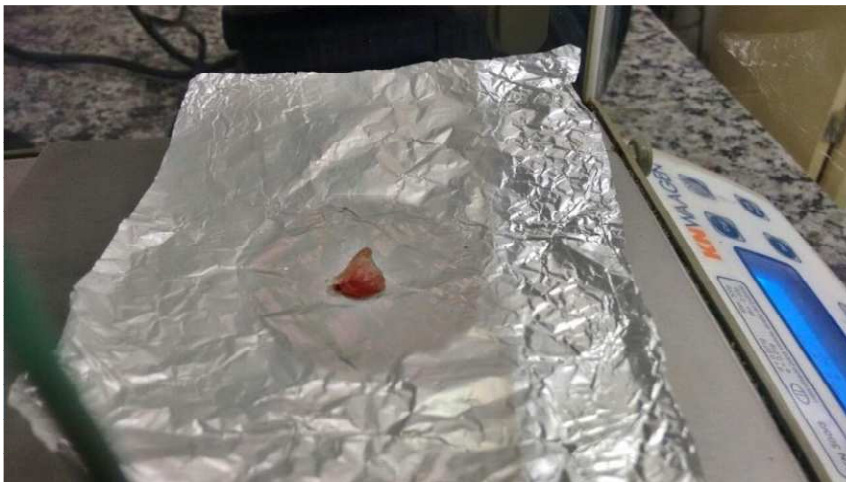
4.3 Peso corpóreo

Os pesos corpóreos dos camundongos foram registrados ao início e ao término do período de imobilização.

4.4 Coleta do tecido muscular

Os animais foram sacrificados através de tração cervical. Em seguida, foram extraídos os músculos gastrocnêmios dos membros traseiros esquerdos imobilizados. Os músculos foram pesados em balança de precisão digital (*KNWAAGEN KN300/3*) (Figura 3) e suas dimensões de largura e espessura foram medidas com um paquímetro digital (*Lee tools digital 150 mm*).

Figura 3- Pesagem do músculo gastrocnêmio.



Fonte: dados da pesquisa, 2016.

4.5 Teste *in vivo* de micronúcleo em sangue periférico

Os mesmos animais que compuseram os grupos de imobilização em flexão plantar e flexão dorsotibial, também compuseram os grupos controles negativos para a análise de micronúcleo em camundongos imobilizados em ambas as posições de flexão plantar e flexão dorsotibial. Para os grupos controles negativos a coleta sanguínea ocorreu antes do processo de imobilização. Ao término do período de 21 dias de imobilização, o sangue destes mesmos animais foi novamente coletado para comparação da frequência de micronúcleos pré e pós-imobilização, em ambas as posições de flexão plantar e flexão dorsotibial.

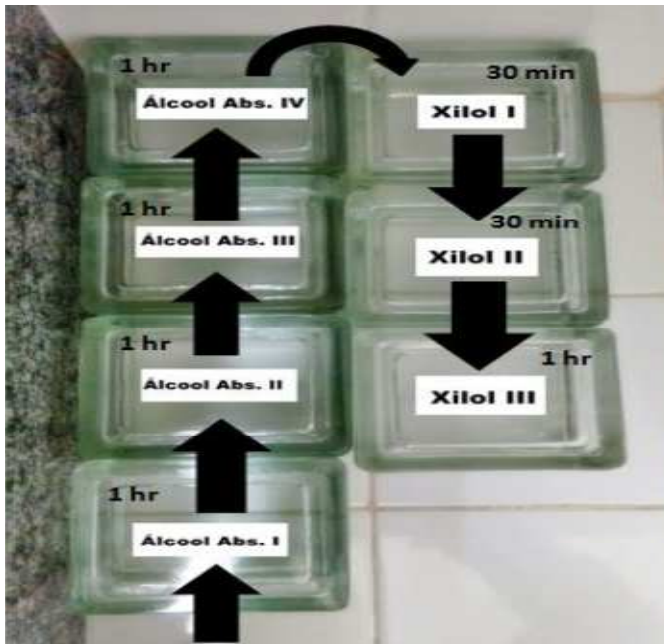
Já os animais do grupo controle positivo, não foram submetidos a qualquer imobilização, pois foram apenas tratados com Ciclofosfamida 50 mg/kg p.c. por via intraperitoneal, substância que pertence ao grupo dos fármacos citotóxicos ou citostáticos e, seu mecanismo de ação consiste em provocar danos em alvos celulares por “ataque nucleofílico”, ou seja, contra o DNA das células, inviabilizando a sua multiplicação (TAVARES, 2013). A coleta de sangue destes animais foi feita após 30 horas da aplicação da substância. Como sua mutagenicidade e clastogenicidade é amplamente conhecida, utiliza-se esta substância para a formação do grupo controle positivo (PEREIRA et al., 2004).

Para a coleta de sangue, os camundongos passaram por um procedimento de secção mínima da extremidade da cauda. O sangue foi gotejado em pequenas quantidades (~ 5µL) sobre as lâminas secas, onde foi feito o esfregaço do material em duplicatas de lâminas previamente marcadas. Após secagem do material por 24h à temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em metanol por dez minutos e secas, também a temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a coloração com Giemsa diluído, em solução tampão fosfato, pH 6.8, na proporção de 1:10, por quinze minutos. O excesso do corante foi retirado cuidadosamente com água destilada. A análise foi realizada em microscopia de luz e a frequência de micronúcleos em células sanguíneas foi obtida através da contagem de 2000 eritrócitos policromáticos em teste cego. O protocolo adotado para a realização dos ensaios foi o descrito por Hayashi et al. (1994). Foi realizada também a correlação Policromático/normocromático, um parâmetro que mostra se houve citotoxicidade ou depressão celular, obtida através da contagem de 500 células (OECD, 1997).

4.6 Processamento histológico

Os músculos foram fixados em formol a 10%, lavados com água destilada por 5 minutos, desidratados por meio de imersão em soluções alcoólicas crescentes, diafanizados em xilol e, posteriormente, embebidos em parafina quente a 60° C (Figura 4). Os blocos montados de parafina contendo os espécimes foram mantidos na geladeira e, em seguida, aparados e levados ao micrótomo para a obtenção de cortes histológicos transversais e longitudinais das fibras do músculo gastrocnêmio. Em seguida, os cortes foram distendidos em *banho Maria* a uma temperatura de 40°C, colocados em lâminas histológicas e mantidos em estufa por 30 minutos a uma temperatura de 60° C para derretimento da parafina.

Figura 4 - Etapa de desidratação e diafanização das amostras.



Fonte: dados da pesquisa, 2016.

As lâminas foram submetidas à diafanização com xilol, hidratação por meio de imersão em soluções alcoólicas decrescentes, lavadas em água corrente e submetidas à coloração com hematoxilina-Eosina. Após a coloração, foi realizada a desidratação em soluções alcoólicas crescentes e diafanização das amostras (Figura 5). Em seguida, foi feita a montagem dos cortes entre lâmina e lamínula com Entellan e foi deixada na estufa para secagem. Finalizado o processo de preparação das lâminas, a análise morfológica foi realizada com o auxílio do microscópio óptico (*Zeiss axio*) acoplado a uma câmera fotográfica (*Axiocam MRC*) e a um sistema de análise de imagem (*Zen lite 2012*).

Figura 5- Diafanização, hidratação, coloração, desidratação, e rediafanização das amostras.



Fonte: dados da pesquisa, 2016.

4.7 Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Para as análises dos pesos corpóreos, da frequência de micronúcleos e das medidas de peso, espessura e largura dos músculos gastrocnêmios foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para fator único. O post-hoc utilizado foi o teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Em todas as avaliações o nível de significância considerado foi $p < 0,05$ (GraphPad Prism 5.01 software).

5 RESULTADOS

5.1 Análise do peso corpóreo e das medidas dos músculos gastrocnêmios

Foi avaliada a variação do peso corpóreo dos animais ao longo dos 21 dias de imobilização (gráfico 1). Os animais imobilizados apresentaram menor aumento do peso corpóreo entre o primeiro e último dias de imobilização, em comparação com o grupo controle. Este menor aumento do peso corpóreo foi ainda mais evidente no grupo imobilizado em posição de flexão dorsotibial, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

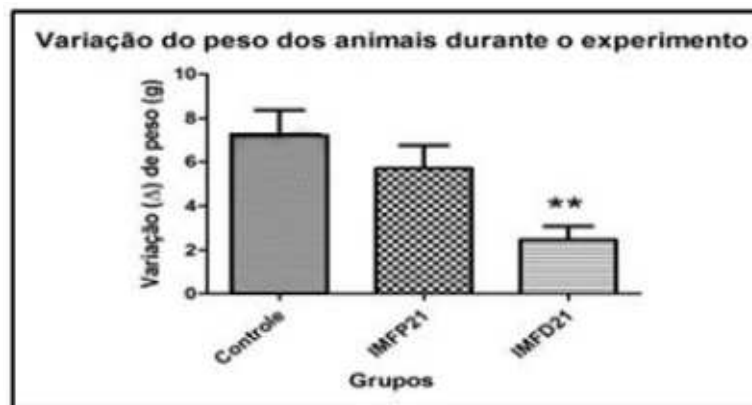


Gráfico 1- Variação (Δ) de peso corpóreo dos animais entre o primeiro e último dias de imobilização (21 dias). Grupo controle= Sem imobilização, IMFP21= Imobilização em flexão plantar por 21 dias, IMFD21= Imobilização em flexão dorsotibial por 21 dias. Valores representam médias \pm erro padrão da média da diferença de peso corpóreo dos animais entre o primeiro e o último dias de imobilização (21 dias) para $n=6$; $**p<0,01$. Fonte: dados da pesquisa, 2016.

Os animais imobilizados apresentaram redução no peso dos músculos gastrocnêmios em comparação ao grupo controle (gráfico 2), sendo que no grupo imobilizado em posição de flexão dorsotibial esta redução no peso muscular foi estatisticamente significativa.

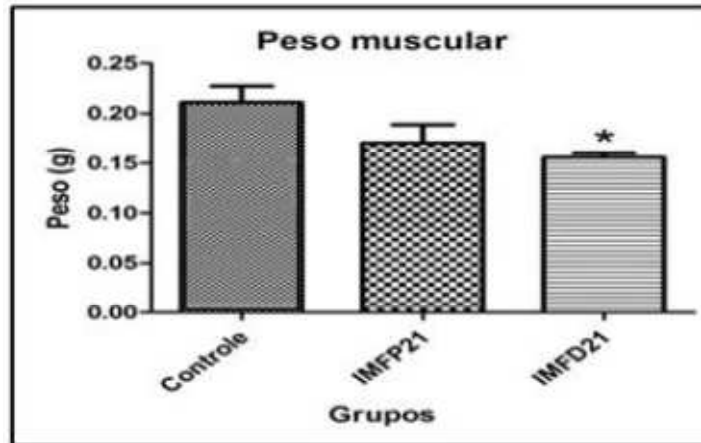


Gráfico 2- Peso (g) dos músculos gastrocnêmios do membro imobilizado ao término do período de imobilização (21 dias). Grupo controle= Sem imobilização, IMFP21= Imobilização em flexão plantar por 21 dias, IMFD21= Imobilização em flexão dorsotibial por 21 dias. Valores representam médias \pm erro padrão da média para $n=6$; $*p<0,05$. Fonte: dados da pesquisa, 2016.

Os músculos gastrocnêmios dos animais imobilizados, tanto em flexão plantar quanto em flexão dorsotibial, apresentaram redução estatisticamente significante na sua largura, em comparação ao grupo controle (gráfico 3).

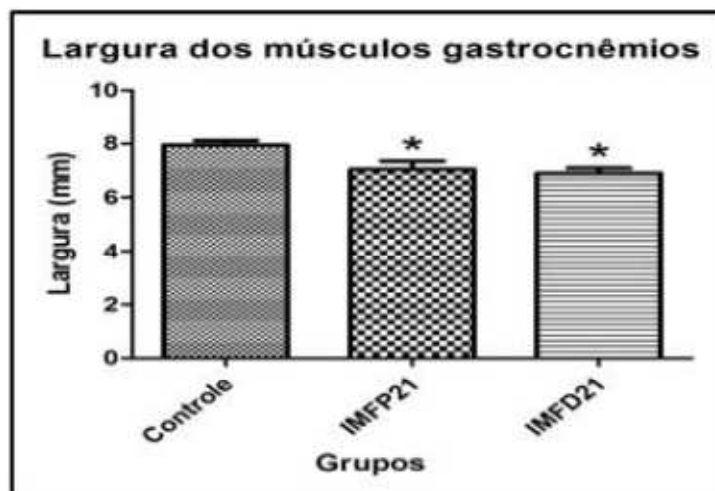


Gráfico 3- Largura (mm) dos músculos gastrocnêmios do membro imobilizado ao término do período de imobilização (21 dias). Grupo controle= Sem imobilização, IMFP21= Imobilização em flexão plantar por 21 dias, IMFD21= Imobilização em flexão dorsotibial por 21 dias. Valores representam médias \pm erro padrão da média para $n=6$; $*p<0,05$. Fonte: dados da pesquisa, 2016.

Os músculos gastrocnêmios dos animais imobilizados, tanto em flexão plantar quanto em flexão dorsotibial, apresentaram redução estatisticamente significante na sua espessura, em comparação ao grupo controle (gráfico 4).

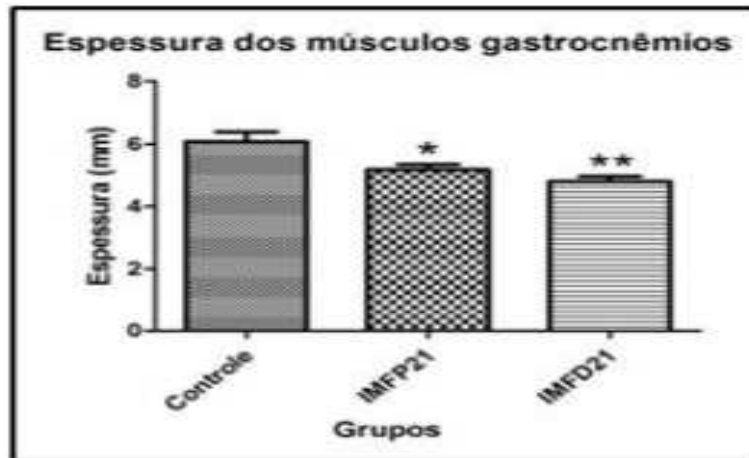


Gráfico 4- Esposura (mm) dos músculos gastrocnêmios do membro imobilizado ao término do período de imobilização (21 dias). Grupo controle= Sem imobilização, IMFP21= Imobilização em flexão plantar por 21 dias, IMFD21= Imobilização em flexão dorsotibial por 21 dias. Valores representam médias \pm erro padrão da média para $n=6$; * $p<0,05$ e ** $p<0,01$

5.2 Análise de micronúcleos (MN)

Os resultados da investigação do possível potencial mutagênico estão representados na tabela 1 e gráfico 5. Os animais imobilizados, tanto em posição de flexão plantar quanto em posição de flexão dorsotibial, apresentaram, aumento na frequência média de micronúcleos, em comparação aos respectivos grupos controles negativos, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Na relação de eritrócitos policromáticos/normocromáticos (PCE/NCE) também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos imobilizados e seus respectivos controles. Embora cada grupo contenha seis animais, por intercorrência no experimento, em tais análises só foi possível utilizar cinco animais por grupo.

Tabela 1- Número de micronúcleos por animal, média \pm erro padrão, e relação de eritrócitos policromáticos/normocromáticos dos camundongos submetidos à imobilização e seus respectivos grupos controles.

ANIMAIS								
Tratamentos	A1	A2	A3	A4	A5	Média \pm SE	PCE/NCE	
Controle Positivo	18	18	11	10	19	15,2 \pm 1,93	-	-
Controle negativo/FP21	2	2	3	0	0	1,4 \pm 0,59	0,102 \pm 0,031	
Controle negativo/FD21	3	2	0	2	2	1,8 \pm 0,48	0,168 \pm 0,030	
IMFP21	5	5	4	1	2	3,4 \pm 0,81	0,032 \pm 0,005	
IMFD21	7	5	1	1	3	3,4 \pm 1,16	0,042 \pm 0,013	

A=Animal; Controle negativo/FP21= Antes da imobilização em flexão plantar por 21 dias; Controle negativo/FD21 = Antes da imobilização em flexão dorsotibial por 21 dias; Controle positivo = Ciclofosfamida 50 mg/kg p.c (peso corpóreo); IMFD21 = Imobilização em flexão dorsotibial por 21 dias; IMFP21 = Imobilização em flexão plantar por 21 dias; PCE/NCE = Relação de eritrócitos policromáticos/normocromáticos; n=5; SE = Erro padrão; $P \leq 0,05$. Fonte: dados da pesquisa, 2016.

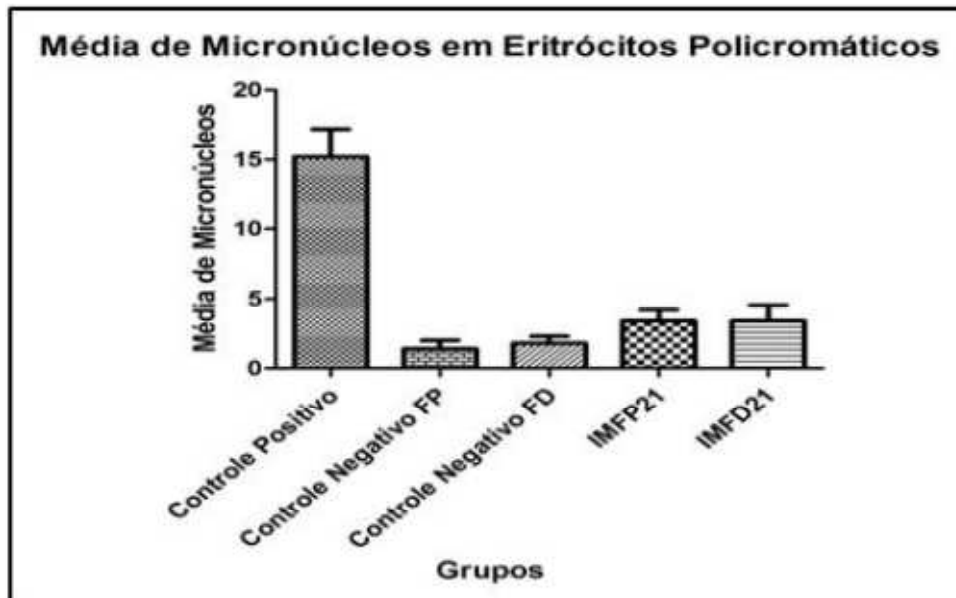


Gráfico 5- Média de micronúcleos em eritrócitos policromáticos. Grupo controle Positivo= administração de ciclofosfamida por via intraperitoneal, Grupo controle Negativo FP= coleta de sangue sem imobilização, Grupo controle Negativo FD= coleta de sangue sem imobilização, IMFP21 = coleta de sangue após imobilização em flexão plantar por 21 dias, IMFD21 = coleta de sangue após imobilização em flexão dorsotibial por 21 dias. Valores representam médias \pm erro padrão da média para n=5; * $p < 0,05$. Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.3 Análise morfológica

Os músculos gastrocnêmios de todos os animais foram seccionados em cortes transversais e longitudinais de 5 μm de espessura, permitindo a visualização e análise qualitativa das estruturas através do microscópio de luz.

5.3.1 Cortes longitudinais (50x)

Em microscopia de luz com ampliação de 50x, foram observados no grupo controle, uma camada de tecido conjuntivo chamada epimísio (cabeça de seta preta). Do epimísio partem finos septos de tecido conjuntivo constituindo o perimísio (asteriscos), que se dirigem para o interior do músculo separando e envolvendo os feixes de fibras musculares (figura 6).

Nos grupos imobilizados, houve aumento na quantidade de perimísio (asteriscos). As fibras apresentam-se disformes, sem separação nítida de feixes de fibras. Já é possível ver endomísio (setas pretas) em alguns pontos da imagem, mostrando que houve aumento deste tecido conjuntivo (figura 6).

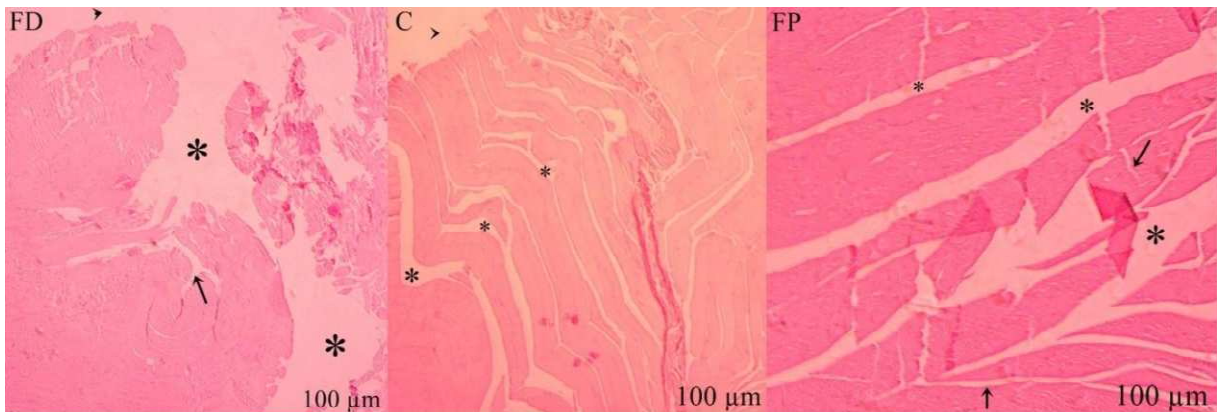


Figura 6- Secções longitudinais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 50x. Epimísio (cabeça de seta preta), perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.3.2 Cortes transversais (50x)

No grupo controle, foram observados o epimísio (cabeça de seta preta), septos de tecido conjuntivo constituindo o perimísio (asteriscos), separando e envolvendo os feixes de fibras musculares. É também observado o endomísio (setas pretas) envolvendo cada fibra.

No grupo imobilizado em flexão dorsotibial, visualiza-se epimísio (cabeça de seta preta), as fibras apresentam-se organizadas em numerosos feixes com poucas fibras em comparação ao controle. Já é possível ver nitidamente o endomísio (setas pretas) em muitos pontos da imagem, mostrando que houve aumento deste tecido conjuntivo (figura 7).

No grupo imobilizado em flexão plantar, foram observados infiltrados de epimísio em direção ao perimísio (cabeça de seta preta), separando nitidamente grandes feixes de fibras musculares. É também observado o endomísio bem desenvolvido (setas pretas) envolvendo cada fibra (figura 7).

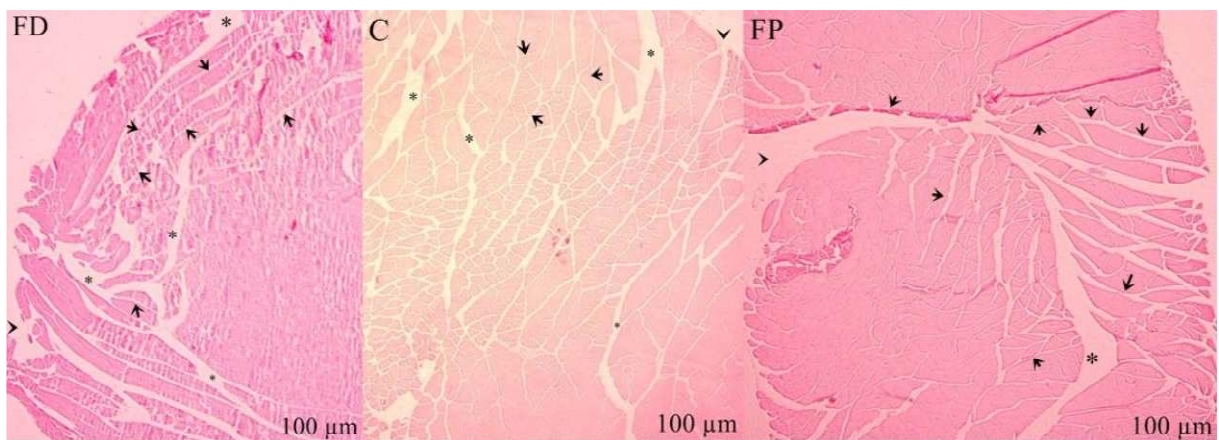


Figura 7- Secções transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 50x. Epimísio (cabeças de setas pretas), perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.3.3 Cortes longitudinais (100x)

No aumento de 100x no grupo controle, já é possível visualizar estriações transversais das fibras (cabeça de seta branca). As fibras apresentam espessuras variáveis e estão associadas ao endomísio (setas pretas) (figura 8).

No grupo imobilizado em flexão dorsotibial, a configuração disforme permanece nas fibras, é possível ver o epimísio adentrando no músculo. Além disso a grande distância dos feixes evidenciados na imagem, mediada pelo perimísio (asteriscos) e o aumento do endomísio (setas pretas) que também aparecem no grupo imobilizado em flexão plantar (figura 8).

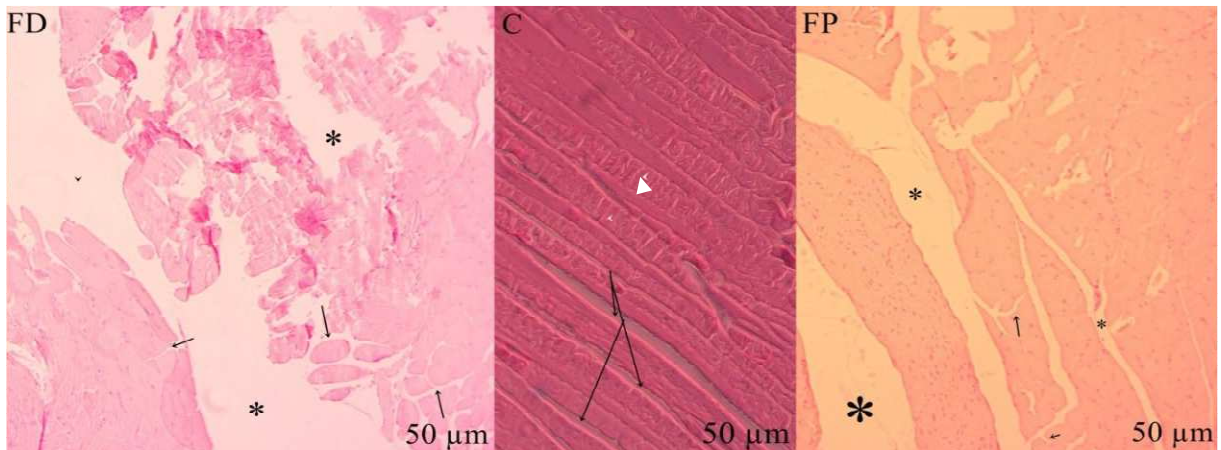


Figura 8- Secções longitudinais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 100x. Epimísio (cabeça de seta preta), perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas), estriações transversais das fibras (cabeça de seta branca). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.3.4 Cortes transversais (100x)

No aumento de 100x, no grupo controle, já é possível visualizar o endomísio mais pronunciado (setas pretas). Além do mais, o epimísio (cabeça de seta preta) adentrando ao músculo formando o perimísio (asteriscos) (figura 9).

No grupo imobilizado em flexão dorsotibial, o perimísio (asteriscos) se encontra abundante em relação ao controle, e em muitos pontos sua distinção do endomísio (setas pretas) é dificultada. No grupo imobilizado em flexão plantar, já é possível visualizar a distinção do perimísio (asteriscos) do endomísio (setas pretas) mais pronunciada (figura 9).

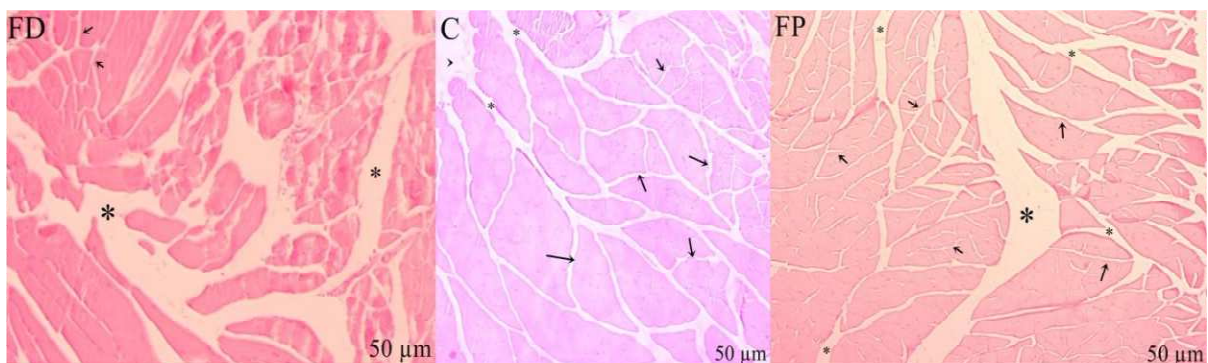


Figura 9- Secções transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 100x. Epimísio (cabeça de seta preta), perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.3.5 Cortes longitudinais (200x)

No aumento de 200x, no grupo controle, a distinção entre endomísio (setas pretas) e perimísio (asterisco) pode ser melhor visualizada (figura 10).

No grupo imobilizado em flexão dorsotibial, a quantidade de endomísio (setas pretas) e perimísio (asteriscos) é muito maior em relação às fibras. Estas ainda apresentam traços amorfos em alguns pontos da imagem.

No grupo imobilizado em flexão plantar, o endomísio (setas pretas) e perimísio (asteriscos) podem ser mais facilmente visualizados. Feixes de fibras e fibras individuais já são bem delimitadas (figura 10).

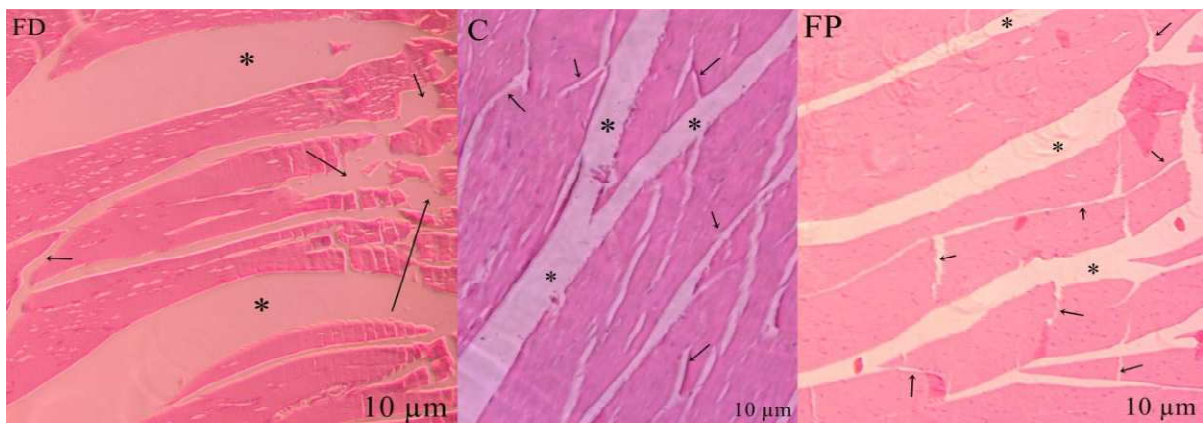


Figura 10- Secções longitudinais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 200x. Perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.3.6 Cortes transversais (200x)

No aumento de 200x, no grupo controle, a quantidade de endomísio (setas pretas) é bem discreta em relação aos grupos imobilizados. Não é feita uma distinção clara entre endomísio e epimísio nesse aumento (figura 11).

No grupo imobilizado em flexão dorsotibial, o endomísio (setas pretas) e perimísio (asterisco) podem ser mais facilmente visualizados. A quantidade de ambos é muito maior em relação às fibras. Um vaso (V) entre fibras é observado. O perimísio (cabeça de seta preta) e endomísio (setas pretas) puderam ser mais facilmente visualizados no grupo imobilizado em flexão plantar. É notável o grande aumento deste último, pela vista de fibras individualizadas (figura 11).

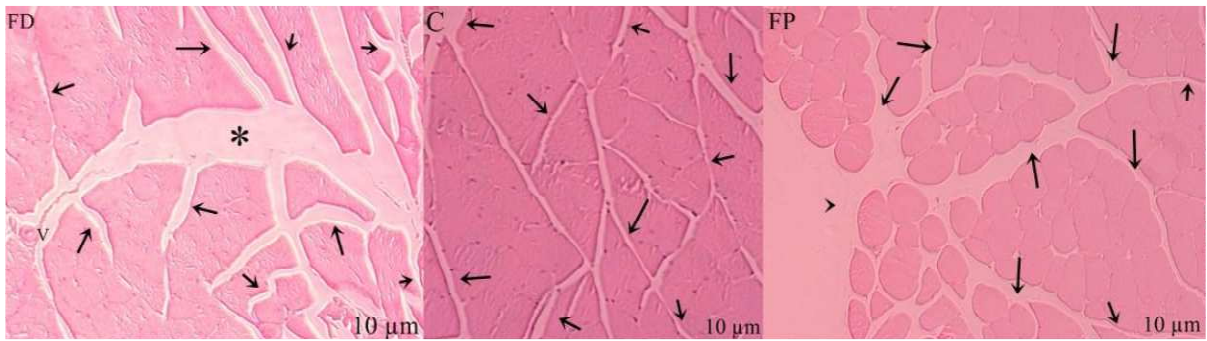


Figura 11- Secções transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 200x. Epimísio (cabeças de setas pretas), perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas), vaso (v). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.3.7 Cortes longitudinais (400x)

No aumento de 400x, no grupo controle, endomísio (setas pretas) está em destaque como também perimísio (asteriscos) e os núcleos das fibras musculares organizados em fileiras (seta amarela) (figura 12).

Nos grupos imobilizados, destaque para o perimísio (asterisco) que se mostra nesse aumento em relação ao controle, bem evidente. É possível ver um vaso (V) associado a uma fibra no grupo imobilizado em flexão dorsotibial. No grupo imobilizado em flexão plantar, o endomísio (setas pretas) mostrou-se bem representativo (figura 12).

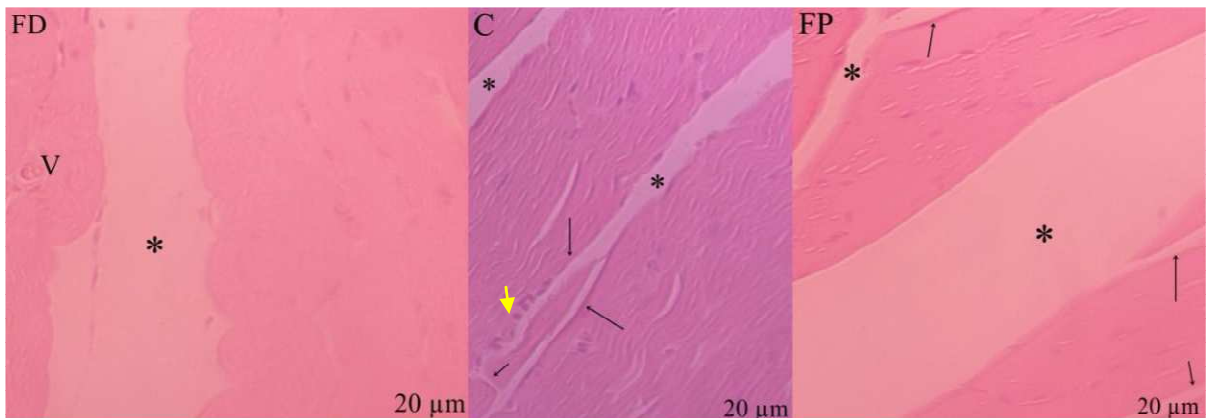


Figura 12- Secções longitudinais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 400x. Perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas), núcleos das fibras musculares (seta amarela), vaso (v). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.3.8 Cortes transversais (400x)

No aumento de 400x, no grupo controle, o endomísio (setas pretas) está em destaque como também perimísio (asteriscos) (figura 13).

Nos grupos imobilizados, destaque para o perimísio (asteriscos) e endomísio que se mostram nesse aumento em relação ao controle, bem evidentes. É possível ver um vaso (V) em destaque, imerso no tecido conjuntivo do grupo imobilizado em flexão dorsotibial (figura 13).

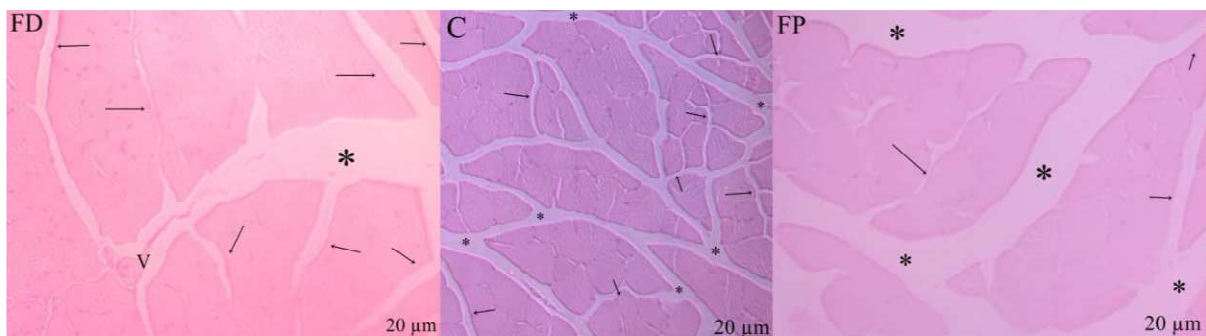


Figura 13- Seções transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 400x. Perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas), vaso (v). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.3.9 Cortes Longitudinais (1000x)

O aumento de 1000x, no grupo controle, permitiu a visualização dos núcleos enfileirados das fibras (cabeças de setas amarelas) associados intimamente ao endomísio (figura 14).

No animal imobilizado em flexão dorsotibial, são vistos os núcleos das fibras (cabeças de setas amarelas) e dos fibroblastos, células presentes no endomísio (seta preta), ambos indistinguíveis, perimísio em destaque (asterisco) e um vaso (V) ampliado.

No animal imobilizado em flexão plantar, observou-se poucos núcleos das fibras musculares (cabeças de setas amarelas), perimísio (asterisco) em grande quantidade e a zona de transição (cabeças de seta vermelha) deste e do endomísio (seta preta), marcada por grande quantidade de tecido conjuntivo (figura 14).

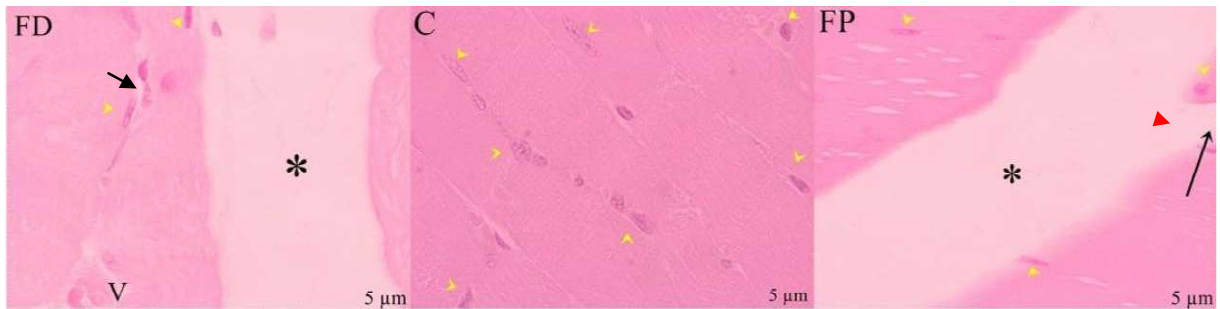


Figura 14- Seções longitudinais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 1000x. Perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas), núcleos das fibras e dos fibroblastos (cabeças de setas amarelas), transição entre perimísio e endomísio (cabeça de seta vermelha), vaso (v). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

5.4.0 Cortes transversais (1000x)

O aumento de 1000x, no grupo controle, foi permitido a visualização dos núcleos periféricos (pontas de setas amarelas) das fibras separadas o endomísio (setas pretas). O aspecto granuloso das miofibrilas no citoplasma celular mostra-se acentuado nesse aumento (figura 15).

No grupo imobilizado em flexão dorsotibial, foi visto os núcleos enfileirados das fibras (pontas de setas amarelas), perimísio (asterisco) em destaque, e infiltrado de tecido conjuntivo (cabeças de setas vermelhas) do perimísio (asterisco) indo ao encontro do endomísio (seta preta), gerando uma visualização de fibras individualizadas.

No animal imobilizado em flexão plantar, esse aumento permitiu a visualização dos núcleos das fibras (cabeças de setas amarelas), centralizados em alguns pontos, e um endomísio (setas pretas) bem desenvolvido. O infiltrado de tecido conjuntivo (cabeça de seta vermelha) também é notável (Figura 15).



Figura 15- Seções transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos pertencentes ao grupo controle (C), imobilizados em flexão dorsotibial (FD), imobilizados em flexão plantar (FP), visualizadas em microscopia de luz, contrastadas com Hematoxilina-Eosina. Na ampliação de 1000x. Perimísio (asteriscos), endomísio (setas pretas), núcleos das fibras (cabeças de setas amarelas), transição entre perimísio e endomísio (cabeça de seta vermelha). Fonte: dados da pesquisa, 2016.

6 DISCUSSÃO

Embora existam na literatura diferentes achados a respeito da imobilização, sabe-se que existe atrofia da musculatura esquelética no membro imobilizado, e que, além disso, o próprio indivíduo sofre perdas em diversos segmentos e sistemas de seu organismo (DITTMER et al, 1993) que vão desde transtornos de inervação, circulação, atrofia óssea, alterações ligamentares, aumento de tecido conjuntivo, edema, rigidez articular, a alterações morfométricas e histológicas das fibras musculares (CARVALHO et al., 2008).

Durante o período que permaneceram imobilizados, ocorreram decréscimos de pesos corpóreo e muscular. Embora a imobilização utilizada não tenha dificultado o acesso à alimentação, o estresse oriundo desse procedimento alterou a homeostasia metabólica, dificultando o crescimento do animal. O decréscimo de peso muscular também foi relatado nos estudos feitos por Carvalho et al. (2002), Júnior et al. (2010) e Carvalho et al. (2013), pelo fato da imobilização promover diminuição de síntese, e aumento da degradação de proteínas, menor produção de força, diminuição do diâmetro, no número de mitocôndrias, bem como alterações no metabolismo de glicogênio, contribuindo para a redução de massa muscular (JACKMAN, 2005; BRITO et al., 2011; SALVINI et al., 2012).

Nessas situações de desuso muscular, imediatamente ocorre a diminuição do diâmetro individual das fibras e de força muscular (LARA, 2003; ABDALLA; BERTONCELLO; CARVALHO, 2009), que culminam na redução da largura e espessura muscular, evidenciada no nosso estudo, e com conseqüente redução de volume muscular. Essa redução está relacionada a perda de proteínas contráteis, o que leva à diminuição de tensão nas fibras, alterando a biomecânica de contração (ROCHA, 2006).

Embora os resultados negativos do Teste de Micronúcleo indiquem que o estresse submetido aos animais através da imobilização, não se mostrar suficiente para ser considerado mutagênico, observa-se que houve surgimento de micronúcleos após passarem esse tempo imobilizado, indicando que a imobilização pode ser considerada como um fator de estresse com potencial mutagênico, e seus danos citogenéticos podem se acentuar em períodos mais longos de imobilização.

Histologicamente, os músculos gastrocnêmios do grupo controle apresentaram fibras íntegras, com variações de tamanho e estruturas preservadas. O endomísio é bastante discreto, com escassa população celular. Nos grupos imobilizados, observa-se diversas alterações que vão desde a presença de infiltrado de tecido conjuntivo, variação de tamanho, processos degenerativos e feixes bem expressivos, relatadas também por Carvalho et al. (2013) em seu

estudo. Em ambas as posições, houve perda na área das fibras e aumento de espaço entre os feixes musculares. Tais alterações são relatadas por Kannus et al. (1998) e Venojarvi et al. (2004) devido ao aumento de tecido conjuntivo intramuscular no endomísio e perimísio, o que também foi verificado por Durigan et al. (2006) em seus estudos experimentais em ratos.

O papel funcional do tecido conjuntivo é manter as fibras musculares unidas, possibilitando que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro. É ainda através dele, que a força de contração do músculo é transmitida a outras estruturas como tendões e ossos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). O grande infiltrado de tecido conjuntivo, nos músculos imobilizados por aparecer em grande quantidade, favorece a presença de fibrose e, conseqüentemente, diminuição de mobilidade (CARVALHO et al., 2013).

Fatores que interferem no comprimento, peso e tamanho das fibras podem interferir em sua dinâmica de funcionamento (PIOVESAN, 2010). Um comprimento ótimo dos sarcômeros é necessário para que a musculatura possa exercer sua função de forma a não perder suas propriedades mecânicas como velocidade, potência, capacidade de deformação, flexibilidade, resistência, e também bioquímicas e fisiológicas para que o movimento ocorra sem déficits funcionais (ROCHA et al., 2010). De um modo geral, a perda de componentes básicos do tecido em virtude de um processo de imobilização pode repercutir negativamente nas funções teciduais básicas (AQUINO et al., 2005).

Isso se torna relevante na prática clínica, pois as intervenções corretas nas alterações musculares podem favorecer a recuperação morfológica e funcional do segmento, prevenir e nortear protocolos de programas de reabilitação.

7 CONCLUSÕES

- 1- A imobilização durante 21 dias, em ambas as posições de flexão plantar e flexão dorsotibial, comprometeu o ganho de peso corpóreo.
- 2- Os animais imobilizados, em ambas as posições de flexão plantar e flexão dorsotibial, apresentaram redução do peso, largura e espessura dos músculos gastrocnêmios.
- 3- Houve um discreto aumento na frequência de micronúcleos nos eritrócitos dos animais imobilizados durante 21 dias, sugerindo que a imobilização representa um estresse com potencial mutagênico.
- 4- A imobilização gerou alterações morfológicas visíveis no tecido muscular.
- 5- As alterações morfológicas foram mais evidentes nos músculos gastrocnêmios dos animais imobilizados em flexão dorsotibial, sugerindo que a imobilização em flexão plantar pode ser menos nociva para os músculos gastrocnêmios.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. R; BERTONCELLO, D. CARVALHO, L. C. Avaliação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas imobilizado e submetido à corrente russa. **Fisioterapia e Pesquisa**, São Paulo, v.16, n.1, p.59-64, jan./mar. 2009. ISSN 1809-2950.

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

APPELL, H. J. Muscular atrophy following immobilization: a review. **Sports Medicine**, v. 10, n.1, p.42-58, 1990.

AQUINO, C. F, VIANA, S.O, FONSECA, S. T. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos ao estresse e à imobilização. **Fisioterapia em Movimento**, 2005.

ARTIFON, E. L; FERRARI, D; CUNHA, D. M. Efeitos do ultrassom terapêutico associado ao alongamento estático sobre parâmetros histomorfométricos longitudinais de sóleos imobilizados de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 18, n. 5, p.341-344, 2012. doi: 10.1590/S1517-86922012000500012

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

BODINE, S. C; LATRES, E; BAUMHUETER, S; LAI, V. K. M; NUNEZ, L. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, vol. 294, n. 5547, p.1704-1708, 2001.

BOOTH, F. W. Effect of immobilization on skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, 1982.

BOWERS S. L; BILBO S. D; DHABHAR, F. S; NELSON, R. J. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. **Brain Behavior and Immunity**, 2008.

BRITO, V. C; OLIVEIRA, B. D. R; MORAES, S. R. A. Effects of immobilization on rat skeletal muscle tissue. **Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, vol. 28, n. 4, p.217-221, 2011.

CAMPANA, M.A. et al. Micronuclei induction in *Rana Catesbeiana* tadpoles by the Pyrethroid insecticide lambda-Cyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n.1, p.99-103, 2003.

CANCELLIERO, K. M; DIAS, C. N. K; SILVA, C. A; GUIRRO, R; CHINGUI, J. L. Alterações do conteúdo de glicogênio e do peso muscular em função da posição articular e do período de imobilização. **Fisioterapia Brasil**, vol. 9, n. 2, p.173-179, 2005.

CARRARD, V. C; COSTA, C. H; FERREIRA, L. A; LAUXEN, I. S; RADOS, P. V. Teste dos micronúcleos - Um biomarcador de dano Genotóxico em células descamadas da mucosa

bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia**. Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p.77-81, jan./dez. 2007.

CARVALHO, C. M. M; SHIMANO, A. C; VOLPON, J. B. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, Uberlândia, v. 18, n. 2, p.65-73, maio/ago. 2002.

CARVALHO, L. C; SHIMANO, A. C; PICADO, C. H. F. Estimulação elétrica neuromuscular e o alongamento passivo manual na recuperação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio imobilizado. **Acta Ortopédica Brasileira**, 2008.

CARVALHO, M. M; MATINS, W. R; BLACKZICK, J. C; SOUZA, H. A; KUCKLHAUS, S. A. S; MOTA, M. R. Análise morfométrica dos efeitos da imobilização sobre o músculo gastrocnêmio de ratos. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 11, n. 2, p.99-106, jul./dez. 2013. doi: 10.5102/ucs.v11i2.2518

COOKE, R. The mechanism of muscle contraction. **CRC**, vol. 21, p.53-118, 1961.

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

DICKMEIS, T; LAHIRI, K; NICA, G; VALLONE, D; SANTORIELLO, C; NEUMANN, C. J; HAMMERSCHMIDT, M; FOULKES, N. S. Glucocorticoids play a key role in circadian cell cycle rhythms. **PLOS Biology**, 2007.

DITTMER, M, D. K, TEASELL, R. Complications of Immobilization and bed rest. Part 1: Musculoskeletal and cardiovascular complications. **Canadian Family Physician**, 1993.

DUESBERG, P. Chromosomal chaos and cancer. **Scientific American**, 2007.

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

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutation Research**, v. 404, p.155-165, 1998.

FERNANDES, T. L; PEDRINELLI, A; HERNANDEZ, A. J. **Lesão muscular – fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e apresentação clínica**. Rev Bras Ortop. 2011.

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

FLINT, M. S; CARROLL, J. E; JENKINS, F. J; CHAMBERS, W. H; HAN, M. L; BAUM, A. Genomic profiling of restraint stress-induced alterations in mouse T lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, 2005.

FLORES, M; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, set./dez. 2008-ISSN 1983-1870.

FOURNIER, M.; ROY, R. R.; PERHAM, H.; SIMARD, C. P., EDGERTON, V. R. Islimb immobilization a model of muscle desuse? **Experimental Neurology**, v. 80, p.147-156, 1983.

GARRET, J. R; BEST, T. M. Anatomy, physiology, and mechanisms of skeletal muscle. **AAOS Orthopaedic Basic Science**, p.89-125, 1994.

GLASS, D. J. Signaling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Nature cell biology**, vol. 5, p.87-90, 2003.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, 2004.

GRAAFF, V. D; KENT, M; **Anatomia Humana**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2003.

GUNNING, P; HARDMAN, E. Multiple mechanisms regulated muscle fiber diversity. **The FASEB Journal**, vol. 15. p.3064-70, 1991.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAIMOVITCH, T. G; CARMELI, E. The Expression of MMP-2 Following Immobilization and High-Intensity Running in Plantaris Muscle Fiber in Rats. **The Scientific World JOURNAL**, n. 6, p.542–550, 2006.

HÄKKINEN, K. Factors influencing trainability of muscular strength during short term and prolonged training. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 7, n. 2, p.32-37, 1985.

HAMILTON, J. P; MELTZER, S. J. A review of the genomics of gastric cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, p.416–425, 2006.

HAYASHI, M. et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, p.293–304, 1994.

JACKMAN, R. W; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, vol. 287, p. 834-43, 2005.

JÚNIOR, F. F. U. S. et al. Alterações Morfométricas em Músculo Respiratório de Ratos Submetidos à Imobilização de Pata. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 3 – Mai/Jun, 2010.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

- JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- JYOTI, R; PANDEY, S. N; SRIVASTANA, R. K. Effect of Immobilization Stress on Spermatogenesis of Albino Rats. **Journal of the Anatomical Society of India**, p.55-57, 2003.
- KANNUS, P; JÓZSA, L; JÄRVINEN, T. L. N; KVIST, M; VIENO, T. Free immobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 4, p.1418-1421, 1998.
- KISNER, C; COLBY, L. A. **Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas**. 5. ed. São Paulo: Manole, 2009.
- KONNO, E. A. B; ALVES, E. P. B; BERTOLINI, G. R. F; BARBIERI, C. H; MAZZER, N. Remobilização por alongamento estático cíclico em músculo sóleo de ratos imobilizados em encurtamento. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 2, 2008.
- KOSTEN, T. A; KARANIAN, D. A; YEH, J; HAILE, C. N; KIM, J. J; KEHOE, P; BAHR, B. A. Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. **Neurobiology of Learning and Memory**, p.167–176, 2007.
- KUNZ, R. I; CORADINI, J. G; RONDON, L. S; BRANCALHÃO, R. M. C.; BERTOLINI, G. R. F.; RIBEIRO, L. F. C. Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.19, n. 2, p. 123-129, 2013.
- LARA, M. A. P. **Algumas propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas submetidas a um modelo de hipoatividade e tratadas com exercício**. 101f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo: USP, 2003.
- LIMA, S. C. et al. Short-term immobilization causes morphometric and mechanical alterations on rat muscles. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.11, n.4, p.297-302, 2007.
- MACHIDA, S; BOOTH, F.W. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 2004.
- MALVANDI, A. M; MOGHIMI A. Acute restraint stress increases the frequency of vinblastine-induced micronuclei in mouse bone marrow cells. **Stress**, p.276-280, 2010. DOI: 10.3109/10253890903296710
- MANTSCH, J. R; TAVES, S; KHAN, T; KATZ, E. S; SAJAN, T; TANG, L. C; CULLINAN; W. E; ZIEGLER, D. R. Restraint-induced corticosterone secretion and hypothalamic CRH mRNA expression are augmented during acute withdrawal from chronic cocaine administration. **Neuroscience Letters**, p.269–273, 2007.
- MATHEUS, J. P. C; GOMIDE, L. B; MILANI, J. P. G. O. A Imobilização gessada por um curto período pode influenciar nas propriedades biomecânicas do Músculo Esquelético? **Brazilian Journal of Biomotricity**, Itaperuna, v. 1, n. 2, p. 28-33, 2007.

MCPHEE, S. J; GANONG, W. F. **Fisiopatologia da Doença: Uma introdução à medicina clínica**. 5ª ed, Porto Alegre: McGraw-Hill, 2011.

MELO, A. C; LÓPEZ, R. A. A importância da atividade física durante o período de imobilização. **Motricidade**, v. 1, n. 2, p.134-141, 2005.

OECD Guideline for the testing of chemicals 474 – Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997). Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948442.pdf>. Acesso em 11 Abr. 2016.

PAIXÃO, A. P; ALVES, E. G. L; BITENCOURT, A. C. V. Padronização da técnica do membro pélvico para estudo da atrofia muscular esquelética em Ratos. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, Campos dos Goytacazes. vol. 4, n. 7, p.271-291, 2011.

PEREIRA, E.V. P; KROLL, B. L; SOUZA, E. B. Análise da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em camundongos (*Mus domesticus domesticus*), tratados com Enzicoba (cobamamida). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, p.31-37, 2004.

PICQUET, F; FALEMPIN, M. Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular proprieties of the rat soleus. **Experimental Neurology**, v. 184, n. 1, p.186-194, 2003

PIOVESAN, R. F. **Efeito do anabolizante decanoato de nandrolona na expressão de marcadores miogênicos e no processo de reparo muscular após criolesão**. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2010.

RIBEIRO, L. R; SALVADORI, D. M. F; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003.

RIEGER, R. M. A; GREEN, M. M. A glossary of genetics and Cytogenetics. **Allen and Unwin**, London, 1968.

ROCHA, M.N.D. **Propriedades mecânicas do músculo esquelético de ratas Wistar pós-imobilização e exercício físico em esteira**. [Dissertação de Mestrado em Bioengenharia], Universidade de São Paulo, 2006.

ROCHA, W. A; GOBBI, G. A; ARAÚJO, V. F. Alterações morfofuncionais musculares em resposta ao alongamento passivo em modelo animal de imobilização prolongada de membro posterior. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 16, n. 6, nov./dez. 2010. doi:10.1590/S1517-86922010000600011

SALVINI, T. F; DURIGAN, J. L. Q; PEVIANI, S. M. Effects of electrical stimulation and stretching on the adaptation of denervated skeletal muscle – implications for physical therapy. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 16, n. 3, p. 175-182, may/jun. 2012. doi: 10.1590/S1413-35552012005000027

SÁNCHEZ, O; ARNAU, A; PAREJA, M; POCH, E; RAMÍREZ, I; SOLEY, M. Acute stress-induced tissue injury in mice: differences between emotional and social stress. **Cell Stress & Chaperones**, p.36–46, 2002.

TAILLANDIER, D; AUROUSSEAU, E; COMBARET, L; GUEZENNEC, C. Y; ATTAIX, D. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, n. 5, p.665-675, 2003.

TAVARES, A. V. **Avaliação in vivo do potencial mutagênico e antimutagênico do extrato etanólico da entrecasca do caule de *Maytenus rígida* Mart. Através do teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos.** Monografia [Bacharelado em Ciências Biológicas]. Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

THOMPSON, C. Experimental muscular atrophy. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 16, p.564-571, 1934.

TIDBALL, J. B; Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. **Journal Applied Physiology**, 2005.

VENOJARVI, M; KVIST, M; ATALAY, M; LOZSA, L; KALIMO, H. Recovery from immobilisation: responses of fast-twitch muscle in rat calf muscles. **Pathophys**, v. 11, p.17-22, 2004.

WEISSMAN, B. A; SOTTAS, C. M; ZHOU, P; IADECOLA, C; HARDY, M.P. Testosterone production in mice lacking inducible nitric oxide synthase expression is sensitive to restraint stress. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, 2007.

ZHANG, P; CHEN, X; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. **Medical Hypotheses**, 2007.

ANEXO A-PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA







PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 6301042016
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 01/04/2016

- 1. Pesquisador Responsável: Aline dos Santos de Maman**
Título do Projeto: ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DOS MÚSCULOS SÓLEO E GASTROCNEMIO DE CAMUNDONGOS E INDUÇÕES MUTAGÊNICAS MEDIANTE TESTE DE MICRONÚCLEO APÓS IMOBILIZAÇÃO DA PATA TRASEIRA
- 2. Considerações:** Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em 01 / 04 / 2016.

Vigência do Projeto	01 de fevereiro de 2016 a 01 de fevereiro de 2017
Espécie / linhagem	Camundongos Balb C
Nº de animais	36
Peso / idade	30 a 35 g / Aproximadamente de 7 a 11 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério FCM

Parecer Final: APROVADO


Thárcia Kiara B. de Oliveira
 Coordenadora do CEUA-CESED



Av. Senador Aguiar de Figueiredo, 1307 - Barão
 CEP: 68104-900 - Campina Grande, PB Fone: 33 3161-8800
www.ceued.br | tales@ceued.br | ceued@ceued.br
 CNPJ: 02.108.023/0001-40