

**CÂMILA VALENTIM DELUCA**

**TÍTULO: EFEITO DA SOBRECARGA DE LEUCINA  
NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS DURANTE A  
DISTRAÇÃO GRADUAL OSTEOGÊNICA**

**CÂMILA VALENTIM DELUCA**

**EFEITO DA SOBRECARGA DE LEUCINA NO  
MÚSCULO SÓLEO DE RATOS DURANTE A  
DISTRACÃO GRADUAL OSTEOGÊNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Instituto de Ciências Biomédicas  
da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (Biologia Celular e  
Tecidual).

São Paulo

2007

**CÂMILA VALENTIM DELUCA**

**EFEITO DA SOBRECARGA DE LEUCINA NO  
MÚSCULO SÓLEO DE RATOS DURANTE A  
DISTRAÇÃO GRADUAL OSTEOGÊNICA**

Dissertação de Mestrado apresentado  
ao Instituto de Ciências Biomédicas  
da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.

Área de Concentração:  
Biologia Celular e Tecidual

Orientador:  
Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

São Paulo

2007

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Silvia Maria Marcolino Valentim Deluca  
e Edivaldo Deluca pela força, dedicação,  
compreensão, desempenho, coragem e VIDA.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente á Deus, pela enorme força que tem me dado e pelos caminhos maravilhosos que colocou em minha vida e por sempre saber o que faz.

Agradeço à minha família, pessoas maravilhosas que estão sempre ao meu lado, sendo a base de minha estrutura e o meu ponto de apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao Professor Doutor Anselmo Sigari Moriscot pela oportunidade concedida.

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Agradeço aos colegas de laboratório pela amizade conquistada. Principalmente, agradeço a Vanessa Vilas Boas e Marcela Sorelle pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Hércio Yogi Ono pela enorme ajuda e parceria durante o desenvolvimento deste estudo e por tornar meus momentos de trabalho mais divertidos e alegres.

Agradeço à Tânia de Fátima Salvini por ter iniciado toda esta minha trajetória profissional e pelo incentivo, apoio e força fornecidos até hoje.

Agradeço à Eliane de Lima Coutinho por acreditar em mim, me ensinar e fornecer toda a ajuda possível.

Agradeço aos meus inseparáveis e verdadeiros amigos, pessoas que mesmo longe estavam sempre ao meu lado, seja para me consolar, fortalecer, distrair ou alegrar-me.

Agradeço à Celiana, secretária de pós-graduação, que sempre esteve pronta a me ajudar e esclarecer as minhas dúvidas.

Agradeço à Christina Yara Rodrigues pela imensa ajuda profissional pois sem ela não sei se seria capaz de continuar minha trajetória, além é claro, da amizade e conselhos sempre certos.

E agradeço à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução e finalização deste projeto.

A todos, o meu muito OBRIGADA!!!!

"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
2.1. Músculo esquelético: estrutura e função.....	22
2.2. Efeito do alongamento passivo no músculo esquelético.....	24
2.3. Distração Graual Osteogênica (DGO).....	28
2.4. Ação da leucina no músculo esquelético.....	31
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA DO PROJETO.....</b>	<b>34</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Animais e Grupos experimentais.....	35
4.2. Procedimento cirúrgico.....	36
4.3. Sobrecarga de leucina.....	37
4.4. Sacrifício dos animais e retirada dos músculos.....	38
4.5. Determinação do número e comprimento de sarcômeros em série.....	38
4.6. Procedimentos para Análise Histológica e Histoquímica dos músculos.....	39
4.7. Determinação da área das Fibras Musculares.....	40
4.8. Análise do tecido conjuntivo.....	40
4.9. Análise estatística.....	40
<b>5. RESUTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1. Peso Corporal.....	42
5.2. Amplitude de Movimento.....	43



5.3. Comprimento Muscular.....	44
5.4 Comprimento do Tendão.....	45
5.5. Peso Muscular.....	46
5.6. Número e Comprimento de Sarcômeros.....	47
5.7. Percentual e Área de Secção Transversa dos Diferentes Tipos de Fibras Musculares...49	
5.8. Análise Histológica.....	51
5.9. Análise do Tecido Conjuntivo.....	54
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: (A) Ferramentas utilizadas durante o processo cirúrgico e de DGO. (B) Distrator fixado na tíbia do animal e fratura da tíbia.....	37
Figura 2: Análise do peso corporal nos diferentes grupos experimentais.....	43
Figura 3: Análise da amplitude de movimento da articulação do tornozelo nos diferentes grupos experimentais.....	44
Figura 4: Análise do comprimento muscular nos diferentes grupos experimentais.....	45
Figura 5: Análise do comprimento do tendão nos diferentes grupos experimentais.....	46
Figura 6: Análise do peso muscular nos diferentes grupos experimentais.....	47
Figura 7: Análise do número de sarcômeros em série nos diferentes grupos experimentais.....	48
Figura 8: Análise do comprimento dos sarcômeros nos diferentes grupos experimentais.....	48
Figura 9: Análise do porcentual dos diferentes tipos de fibras musculares.....	50
Figura 10: Análise da área dos diferentes tipos de fibras musculares.....	51
Figura 11: Análise dos cortes transversais dos diferentes grupos experimentais em coloração com Azul de toluidina.....	52
Figura 12: Análise dos cortes transversais dos diferentes grupos experimentais em coloração com Hematoxilina e Eosina.....	53
Figura 13: Análise dos cortes transversais dos diferentes grupos experimentais em coloração com Picrosirius Red.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Modelos Experimentais.....	36
Tabela 2: Peso corporal inicial e final, amplitude de movimento, comprimento muscular e do tendão, peso muscular e comprimento e número de sarcômeros em série nos diferentes grupos experimentais.....	42
Tabela 3: Percentual e área dos diferentes tipos de fibras musculares (Tipo I, Tipo II e indiferenciadas).....	50

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

DGO – Distração Gradual Osteogênica;

mTOR – mammalian target of rapamycin;

ADM – Amplitude de Movimento

MHC – Myosin High Chain (miosina de cadeia pesada)

RNAm- Ribonucleic Acid messenger (ácido ribonucléico mensageiro)

BCAAs – Branched-Chain Amino Acids (aminoácidos de cadeia ramificada)

mATPase – miosina ATPase

## RESUMO

O músculo esquelético tem uma alta capacidade de adaptação. Durante o alongamento passivo, o músculo esquelético aumenta o comprimento de suas miofibrilas através da adição de sarcômeros em série, denominado crescimento longitudinal. A Distração Gradual Osteogênica (DGO) é um método clínico utilizado para promover o aumento progressivo do comprimento do membro. No entanto, este método implica em várias conseqüências como por exemplo, alterações dos tecidos moles que dificultam a atividade da vida diária do indivíduo. Ainda não estão bem estabelecidas as modificações estruturais envolvidas na degeneração muscular durante a DGO bem como formas de intervenção para minimizar as alterações do músculo esquelético frente à DGO. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da sobrecarga de leucina (aminoácido envolvido com o aumento da síntese de proteína muscular) no músculo sóleo de ratos submetidos à DGO. Foram utilizados 25 ratos machos Wistar, divididos aleatoriamente em 5 grupos: controle, sham-lengthening, leucina, DGO e DGO+Leucina. A distração de 2mm/dia foi realizada na tíbia até um ganho de comprimento em 20% e a sobrecarga de leucina (114mM) foi administrada oralmente 2 dias antes da cirurgia permanecendo a sobrecarga até o sacrifício dos animais. Posteriormente avaliou-se 1) estrutura histológica do músculo sóleo, 2) número e comprimento de sarcômeros em série nas miofibrilas preexistentes, 3) porcentagem e área dos diferentes tipos de fibras musculares e 4) análise do tecido conjuntivo. Os dados obtidos a partir dos cortes histológicos mostram que a DGO promoveu intensa lesão muscular e aumento do tecido conjuntivo, o que pode ser minimizado pela sobrecarga de leucina. A determinação do número de sarcômeros em série mostrou que o músculo sóleo apresentou uma adaptação durante a DGO através da adição de sarcômeros em série (26%), sendo este aumento intensificado pela sobrecarga de leucina (33%), e conseqüente redução de seu comprimento (20 e 27%,

respectivamente). Não foi observada nenhuma alteração com relação ao tipo de fibra muscular em ambos os tratamentos utilizados, mas observou-se uma diminuição da área de todos os tipos de fibras com a DGO e um aumento somente da área das fibras do tipo I com a sobrecarga de leucina. Desta maneira, o aminoácido leucina minimizou os efeitos causados pela DGO, o que sugere este como um agente terapêutico a ser utilizado no futuro como meio de intervenção terapêutica para maximizar a qualidade muscular durante a DGO.

**Palavras-chave:** Distração gradual osteogênica, lesão muscular, leucina, músculo-esquelético e sarcomerogênese.

## **Effect of the Leucine overload in rat soleus muscle during Gradual Distraction Osteogenesis**

### **ABSTRACT**

Skeletal muscle has a remarkable capacity of adaptation. During passive stretching the skeletal muscle increases myofibers length with serial sarcomere synthesis, the so called longitudinal hypertrophy. Longitudinal hypertrophy is required in Gradual Distraction Osteogenesis (DGO), a clinical method of new bone formation, although this method results in alterations skeletal muscle, such as fibrosis and muscle fiber necrosis. Up to date it is still poorly known which are the structural modifications involved in muscular degeneration driven by DGO and which interventions could be made in order to minimize this alterations of the skeletal muscle. The goal of the present study was to investigate the effect of leucine overload (amino acids involved with the muscular protein synthesis) in the rat soleus muscle before and along DGO. Twenty five male Wistar rats were randomly divided into 5 groups: control, sham-lengthening, leucine, DGO and DGO+leucine. The distraction was 2mm/day and the leucine overload (114mM) was administrated orally 2 days before the chirurgic and continuous until the sacrifice of the animals. Subsequently analyzed 1) histological cross-section, 2) number and lengths sarcomere along a single muscle fiber, 3) percentage and cross-sectional area of the types fibers and 4) connective tissue. The histological data showed that the DGO promoted intense injury and increase of the connective tissue, which can be minimized by leucine overload. The sarcomere serial number increased by ~26% and leucine overload increased this gain to 33%. As expected, there was a reduction of sarcomere length (20 and 27%, respectively). The fibers types didn't show alteration in both treatments used, but showed a decrease of the cross-section area of the all type fibers with the DGO and increase of the type I fibers area with leucine overload. We

conclude that leucine overload is a potential therapeutical device in DGO, seeking improvement of skeletal muscle longitudinal growth.

**Keys words:** Gradual Distraction Osteogenesis, leucine, muscle injury, sarcomerogenesis and skeletal muscle.



## 1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético apresenta uma notável capacidade de adaptação. Esta adaptação é totalmente influenciada pela posição mantida durante a imobilização (Herbert e Balnave, 1993). O mecanismo pelo qual o músculo esquelético se adapta é um processo bem documentado na literatura (Jarvinen, 1977; Williams, 1988; Gamrin et al, 1998). O comprimento fisiológico da miofibrila é mantido pela homeostase existente entre a síntese e degradação de proteínas contráteis, e o tamanho do músculo esquelético durante a imobilização é um fator importante nesse balanço protéico (Karpakka et al, 1990).

Sabe-se que a imobilização em posição de alongamento promove a adição de sarcômeros em série ao longo da fibra muscular causando o aumento do comprimento muscular (Goldspink, 1977; Williams, 1988; Salvini, 2000). Sugere-se que o aumento do número de sarcômeros em série ocorra em consequência da alteração do comprimento funcional ideal do sarcômero, prejudicando assim, a sobreposição dos filamentos de actina e miosina (Coutinho et al, 2004; Cox et al, 2000; Goldspink et al, 1995; Williams e Goldspink, 1976). Desta maneira, um aumento de sarcômeros em série ocorreria para que os sarcômeros mantivessem seu comprimento ideal, impedindo o prejuízo da capacidade funcional total do músculo, como perda de força e massa muscular e aumento do tecido conjuntivo.

Muitos estudos já descritos na literatura mostram o efeito do alongamento passivo, incluindo ganho de flexibilidade e amplitude de movimento (ADM), melhora da performance muscular e aproveitamento energético no atleta, assim como prevenção de lesões (Feland et al, 2001; Norkin e White, 1995; Gajdosik, 2001).

Diferente do estiramento fisiológico (alongamento passivo), onde o músculo é capaz de ganhar até 25% de seu comprimento original sem sinais de degeneração, a Distração Gradual

Osteogênica (DGO) promove um aumento de comprimento muscular com intensos sinais degenerativos.

A DGO é um método clínico utilizado para induzir a formação óssea (Ilizarov, 1989), promovendo a correção das discrepâncias ortopédicas, problemas traumatológicos e deficiências ósseas (Aronson et al, 1997; Day et al, 1997). Neste método, promove-se o aumento progressivo do comprimento do membro, assim como um estiramento da musculatura esquelética relacionado com o osso a ser alongado. Apesar do grande potencial terapêutico, este método implica em vários problemas, sendo os principais aqueles relacionados com as alterações do tecido muscular esquelético, incluindo contratura, fraqueza e fibrose muscular (Day et al, 1997; Paley, 1990), fatores que acabam limitando o uso da técnica. Por esse motivo, durante a DGO, a adaptação do músculo é um fator crucial para o sucesso da técnica.

Atualmente, pouco se sabe sobre os aspectos estruturais envolvidos nas respostas musculares degenerativas frente ao estiramento provocado pela DGO, os principais achados até o momento estão relacionados às alterações estruturais musculares decorrentes de diferentes protocolos de DGO, incluindo ritmo e amplitude final. No entanto ainda não há consenso sobre o efeito degenerativo que a DGO pode ter sobre os músculos esqueléticos envolvidos, e quais as possíveis intervenções para minimizar tais efeitos.

Existem estudos que sugerem que na DGO existe um aumento do comprimento muscular e do número de sarcômeros em série adequados em animais adultos (Lindsey et al, 2002), enquanto que outros sugerem que somente animais jovens (esqueleticamente imaturos) possuem capacidade de adaptação muscular sem déficit funcional (Hayatsu e De Deyne, 2001).

No entanto, ainda não é conhecido por que existem diferenças marcantes (principalmente relacionadas com o crescimento longitudinal muscular insuficiente) na adaptação muscular durante a DGO quando comparada com o estiramento fisiológico. O ritmo imposto na DGO e a

amplitude final desejada são fatores que contribuem diretamente para estas diferenças (Caiozzo et al, 2002; Green et al, 2002; Lindsey et al, 2002; Matano, Tamai e Kurokawa, 1994; Williams e Goldspink, 1985; Williams et al, 1994). Também, até o momento, não existe na literatura quais as possíveis intervenções terapêuticas para minimizar os efeitos degenerativos no músculo esquelético frente a DGO.

Desta forma, é de fundamental importância que uma análise detalhada e sistemática seja realizada para um melhor entendimento das alterações estruturais para uma tentativa de ampliar a capacidade de crescimento do músculo esquelético em animais submetidos à DGO. De fato, essa é a estratégia experimental proposta neste projeto e utilizamos a sobrecarga de leucina como um agente terapêutico para um aumento do crescimento muscular frente à DGO.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Músculo esquelético – estrutura e função**

O músculo esquelético é um tecido altamente especializado para promover a produção de força e movimento, ações que estão diretamente relacionados com várias funções do nosso organismo, tais como manutenção da postura, mecânica da respiração, deambulação e produção de calor (Junqueira e Carneiro, 2004; Wilmore e Costill, 2001).

O tecido muscular esquelético é formado por células multinucleadas (núcleos periféricos), alongadas, cilíndricas (10 a 100  $\mu\text{m}$ ) e de comprimento variável (até 30 cm), denominadas miofibrilas ou fibras musculares, especializadas em contração muscular (Kierszenbaum, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004). Cada fibra muscular é delimitada por uma membrana plasmática, denominada sarcolema, que é envolta pela lâmina basal (Lieber, 1992; Kierszenbaum, 2004). Entre o sarcolema e a lâmina basal existem células mononucleadas e quiescentes no estado basal, denominadas células satélites, importantes na manutenção, no reparo, na regeneração e na hipertrofia muscular (Muir, Kanji e Allbrook, 1965; Schultz e McCormick, 1994; Goldspink, William e Simpson, 2002).

No músculo esquelético, as fibras musculares estão envoltas por uma camada de tecido conjuntivo denominada endomísio e são agrupadas em feixes ou fascículos, que se estendem do ponto de origem até sua inserção. Cada fascículo é envolto por tecido conjuntivo denominado perimísio, derivado do epimísio, tecido conjuntivo denso que envolve todo o músculo (Lieber, 1992; Kierszenbaum, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004). Nas extremidades do músculo, o tecido conjuntivo sofre espessamento dando origem aos tendões. Estes por sua vez, estão conectados aos

ossos, transmitindo ao esqueleto as tensões ativas geradas pelo músculo (Junqueira e Carneiro, 2004).

As miofibrilas, por sua vez, são constituídas por dois filamentos principais, os filamentos delgados que contém actina, e os filamentos espessos compostos por miosina (Sandborn, 1970; Kierszenbaum, 2004). Os miofilamentos se organizam em unidades contráteis denominadas sarcômeros que se repetem em série e em paralelo ao longo da miofibrila (Junqueira e Carneiro, 2004).

Apesar de serem constituídas pelas mesmas características anteriormente citadas, as fibras musculares são classificadas em diferentes tipos, de acordo com as diferenças morfológicas, bioquímicas, funcionais (velocidade de contração) e expressão da miosina de cadeia pesada (MHC) (Saltin, 1977; Scott, Stevens e Binder-Macleod, 2001). De um modo geral, podemos classificá-las em: fibras de contração lenta (que expressam miosina de cadeia pesada do tipo I - oxidativa), fibras de contração rápida (que expressam miosina de cadeia pesada do tipo IIb - glicolítica) e fibras intermediárias (que expressam miosina de cadeia pesada do tipo IIa) (Brooke e Kaiser, 1970). A maioria dos músculos esqueléticos contém uma mistura dos três tipos, podendo haver prevalência de um tipo (Kierszenbaum, 2004). Dependendo da demanda muscular (aumento ou diminuição da atividade ou atividade neuromuscular, desuso e idade) o músculo esquelético apresenta a habilidade de converter seu tipo de fibras (para revisão ver Pette e Staron, 1990).

Por último, o músculo esquelético também apresenta a capacidade de adaptar seu volume dependendo a demanda mecânica. Quando há uma diminuição dessa demanda, o músculo apresenta uma rápida perda de volume das fibras musculares, denominado atrofia muscular (Clement, et al, 1984; Alford et al, 1987; Ferrando et al 1995). Já quando há um aumento da

demanda, seja ela por sobrecarga mecânica ou alongamento passivo, novos sarcômeros são formados levando a hipertrofia muscular (Goldspink, William e Simpson, 2002).

## **2.2. Efeito do alongamento passivo no músculo esquelético**

A performance física e a ADM têm uma estreita relação com a flexibilidade muscular do indivíduo, por isso sua extrema importância nas atividades esportistas e de reabilitação (Rosário, Marques e Maluf, 2003). Uma das maneiras de promover o ganho da flexibilidade é através do alongamento muscular.

O tecido muscular é de origem viscoelástica e suas substâncias apresentam alterações de acordo com a força imposta sobre ele. A aplicação de força constante promoverá um aumento no comprimento muscular. Já se o comprimento for mantido constante, assim como no alongamento estático, a força a ser aplicada será diminuída com o decorrer do tempo (Alter, 1999). Tal mecanismo ocorre devido à diminuição da tensão passiva do músculo através do estresse do relaxamento viscoelástico. Na retirada da força, o músculo retorna ao seu comprimento original (Alter, 1999).

Estudos em humanos mostram que a adaptação do músculo esquelético decorrente do alongamento pode ser medida pela ADM, não sendo confirmado aumento no número de sarcômeros em série (Gajdosik, 2001). Por outro lado, estudos realizados em animais mostram que essa adaptação do músculo durante o alongamento é mensurada pelo comprimento muscular e número e comprimento de sarcômeros em série ao longo da fibra muscular preexistente (Goldspink, 1977; Williams e Goldspink, 1985). Durante o alongamento há um decréscimo da viscoelasticidade do tecido conjuntivo, como efeito imediato o aumento da ADM (Rosário, Marques e Maluf, 2003), enquanto que cronicamente, a maior ADM dá-se pelas alterações da

estrutura muscular mensuradas pelo comprimento muscular e número de sarcômeros em série (Goldspink e Williams, 1971). Williams (1990) analisou o efeito do alongamento intermitente em ratos de 15 e 30 minutos, 1 e 2 horas diários durante duas semanas após imobilização e verificou no grupo somente imobilizado uma redução significativa da ADM e do número de sarcômeros em série em torno de 19%, no grupo alongado 15 min houve uma pequena perda na ADM e no número de sarcômeros em série, mas insignificativa. Nos grupos alongados 30 min e 1 hora a ADM foi normal e houve uma prevenção na perda do número de sarcômeros em série. Por fim, no grupo de 2 horas de alongamento houve um aumento no número de sarcômeros em série.

Mas como ocorre o aumento no número de sarcômeros em série? Trabalhos na literatura mostram que o alongamento fisiológico da fibra muscular é mantido pelo equilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas contráteis, e o tamanho do músculo durante a imobilização é um fator importante nesse balanço protéico (Karpakka et al, 1990). O aumento do comprimento muscular esquelético durante o desenvolvimento pós-natal e durante a imobilização do músculo na posição de alongamento resulta na adição de sarcômeros em série na miofibrila preexistente (Williams e Goldspink, 1971, 1976; Goldspink, 1968, Goldspink et al, 1995), devido ao comprimento constante dos filamentos de actina e miosina, a fim de manter a ótima sobreposição entre eles (Goldspink, 1977; Tabary et al, 1972; Koh, 1995).

Do mesmo modo que o músculo mantido em posição de alongamento promove a adição de sarcômeros em série, o contrário também ocorre. Williams e Goldspink (1971) demonstraram que em resposta a um período de imobilização em posição de alongamento ou encurtamento, verifica-se, respectivamente, adição ou subtração de sarcômeros em série nas fibras musculares.

Outro fator que influencia o grau de hiper ou hipotrofia em resposta à imobilização é a constituição de fibras do músculo. Fibras musculares do tipo I (contração-lenta) encontradas em

grande proporção nos músculos posturais são mais afetadas pela imobilização em comparação às fibras do tipo II b (contração-rápida) (Witzmann, Kim e Fitts, 1982; Jaspers e Tischler, 1984; Fell et al., 1985). Após a imobilização, é verificado um aumento na porcentagem de fibras brancas no músculo sóleo com concomitante redução na porcentagem de fibras vermelhas (Booth e Kelso, 1973; Boyes e Johnston, 1979; Edgerton et al., 1975). Goldspink et al (1992) demonstraram que a transição de fibras vermelhas para fibras brancas e as alterações na distribuição das isoformas de miosina de cadeia pesada, após a imobilização, contribuem para diminuição da resistência à fadiga.

Harjola, Jankala e Harkonen (2000) verificaram, no músculo gastrocnêmio, redução de 50% na abundância de RNAm apenas para miosina de cadeia tipo IIa (fibras intermediárias) em animais imobilizados em relação aos animais controle. Entretanto, neste estudo acima citado, não houve alteração na abundância das outras isoformas de miosina (Tipo I, Tipo IIx e Tipo IIb). Harjola, Jankala e Harkonen (2000) ainda observaram que a distribuição de miosina não foi alterada em função de 1 semana de imobilização (Tipo I 2,5%; Tipo IIa 4,4%, Tipo IIx 19,5% e Tipo IIb 73,5%) em relação ao controle (Tipo I 3,1%; Tipo IIa 5,8%, Tipo IIx 21,3% e Tipo IIb 69,8%).

Outra alteração encontrada na estrutura muscular durante a imobilização é a quantidade de tecido conjuntivo. O perimísio é considerado o tecido que mais contribui para a resistência passiva extracelular no músculo esquelético, devido a sua organização. A perda de sarcômeros e a redução no comprimento da fibra muscular estão associadas ao aumento na resistência passiva do músculo durante o alongamento. Sabe-se também que a força passiva imposta ao músculo durante um alongamento é transmitida ao músculo como um todo através do tecido conjuntivo intramuscular.



Estudos mostram que músculos imobilizados em posição de encurtamento apresentaram precocemente grande quantidade de tecido conjuntivo na fibra muscular e após dois dias de imobilização ocorre um aumento de tecido conjuntivo no perimísio, seguido de um aumento no endomísio após uma semana (Williams et al, 1988; Alter, 1999; Gajdosik, 2001). Assim, a adaptação do músculo imobilizado quando submetido a alongamento passivo é diferente do músculo normal em decorrência da velocidade de degradação de proteínas e tecido conjuntivo intramuscular. Ainda, quando as articulações são imobilizadas por longo período de tempo, os elementos do tecido conjuntivo do músculo perdem sua flexibilidade. Além disso, a imobilização está associada à mudança concomitante na estrutura química desse tecido, causando perda da extensibilidade e aumento na rigidez do tecido conjuntivo (para revisão ver Alter, 1999). Para Gajdosik (2001) a diminuição do comprimento e extensibilidade passiva dos músculos imobilizados em posição de encurtamento são causadas pela perda dos sarcômeros em séries e proliferação do tecido conjuntivo, e a perda da massa muscular é o resultado da perda das proteínas subcelulares (miosina, actina, titina e desmina).

Williams e Goldspink (1984) mostraram que alongamentos diários de 15 min no músculo sóleo encurtado de ratos, foram suficientes para prevenir a proliferação de tecido conjuntivo em músculos imobilizados em posição de encurtamento durante quatro semanas. Também observaram que alongamentos diários de 30 min em músculos sóleos imobilizados, foram suficientes para prevenir tanto a proliferação do tecido conjuntivo muscular, quanto à perda de sarcômeros em série e da amplitude de movimento (Williams, 1988; Williams, 1990).

Todos esses estudos que tiveram por objetivo entender o mecanismo de desenvolvimento e adaptação do músculo esquelético permitiram algumas importantes conclusões: a) o músculo se adapta às alterações em seu comprimento, através da regulação do número de sarcômeros em

série; b) a posição (encurtada ou alongada) em que o músculo é mantido é um fator determinante na regulação do número de sarcômeros em série (diminuindo ou aumentando, respectivamente); c) embora a adaptação das fibras musculares ocorra tanto em posição de encurtamento como de alongamento, a resposta em relação ao número de sarcômeros é mais intensa na posição encurtada (redução de 40% do número de sarcômeros em série) do que na posição alongada (aumento de 20% no número de sarcômeros em série); d) o grau de atrofia muscular observado durante a imobilização depende da posição de imobilização e é maior no grupo encurtado; e) a posição de alongamento, além de impedir o encurtamento e a atrofia muscular, ativa a síntese protéica e a adição de sarcômeros em série.

### **2.3. Distração Gradual Osteogênica (DGO)**

A DGO, método clínico utilizado para formação óssea (Ilizarov, 1989), correção das discrepâncias ortopédicas, problemas traumatológicos e de deficiências ósseas (Day, 1997; Aronson, 1997), promove um aumento do comprimento do membro através da osteogênese após a osteotomia. Apesar da sua grande utilização na regeneração óssea, este método implica em vários problemas após o período de distração, como diminuição da amplitude de movimento, aumento da tensão passiva, pé em eqüino, subluxação da articulação e desvio axial (Paley, 1990; Aronson, 1994, Day, 1997). Sendo as principais complicações as relacionadas com as alterações dos tecidos moles, incluindo danos neurológicos e vasculares e fraqueza, fibrose e contratura muscular (Paley, 1990).

Ainda hoje, pouco se sabe por que o músculo esquelético está relacionado às complicações da DGO e, qual o seu papel neste processo para um melhor sucesso no alongamento do membro (Day, 1997). Sabe-se que o bom resultado da DGO depende da

estabilidade da fixação dos segmentos ósseos, adequada duração do período de latência e consolidação após a distração.

Durante a DGO, as forças de distração aplicadas ao osso também cria uma tensão nos tecidos moles que estão ao redor do osso alongado, especialmente do músculo esquelético, e inicia uma seqüência de mudanças adaptativas conhecidas como distração histogênica. Mesmo não estando bem documentado na literatura, acredita-se que o mecanismo de adaptação das fibras musculares durante o alongamento do membro apresenta-se de maneira similar ao crescimento do músculo esquelético durante o período pós-natal (Matano, Tamai e Kurokawa, 1994; Williams et al, 1998, 1999). Apesar de o músculo esquelético apresentar um notável potencial para a adaptação, os parâmetros clínicos utilizados para a distração nem sempre são os melhores para essa adaptação muscular (Lindsey, 2002).

As principais variáveis relacionadas com a adaptação muscular, que compreende o aumento do número de sarcômeros em série e, conseqüente aumento do comprimento da fibra muscular (Williams e Goldspink, 1973, 1978; Hayatsu e De Deyne, 2001; De Deyne et al, 1999), são: frequência e ritmo da distração implantada, crescimento total da tíbia e período de latência, as denominadas variáveis mecânicas. Estudos demonstram que a DGO compromete a adaptação muscular quando realizada a uma razão maior que 1 mm por dia ou se o ganho total no comprimento da tíbia é maior que 20% (Simpson et al, 1995; Williams et al, 1998). Lee et al (1993) comparou em seu estudo a distração realizada até um aumento no comprimento da tíbia de 10, 20 e 30% comparado com o inicial, em um ritmo de distração de 0.5 mm por dia, e observou que não houve alterações como fibrose do endomísio e internalização do núcleo quando a distração é feita até 10%, mudanças observadas em 20 e 30%. Ainda, este mesmo grupo de pesquisadores sugeriu que o dano muscular irreversível pode ocorrer quando o ganho no

comprimento da tíbia é acima de 20%, causando fraqueza aguda do músculo gastrocnêmio, possivelmente decorrente do aumento da fibrose no perimísio e endomísio.

Quando Simpson et al (1995) realizou DGO na tíbia de coelhos em diferentes ritmos de distração, de 0,4 mm a 4,0 mm por dia, ele observou um aumento no número de sarcômeros em série nas miofibrilas em todas as velocidades de distração, mas quando a distração é realizada em velocidades maiores que 1 mm por dia, os sarcômeros tornam-se *over-stretching* devido a uma adição insuficiente de sarcômeros em série, resultando em fraqueza muscular e perda da amplitude de movimento.

Williams et al (2001) analisou o dano e a regeneração das fibras musculares no músculo tibial anterior de coelhos adultos originados após a DGO em dois diferentes ritmos de distração 1,3 e 3mm por dia. Williams et al (2001) observou um aumento no dano muscular no ritmo de 1,3mm por dia, processo corrigido pela regeneração muscular. Por outro lado, no ritmo mais alto (3mm por dia) a degeneração foi mais intensa e não houve uma regeneração das unidades contráteis musculares, mas sim um aumento de tecido conjuntivo.

A frequência de distração diária é uma variável mecânica que interfere também na adaptação muscular durante a DGO (Shilt et al, 2000). Estudos mostram que um aumento na frequência de distração diária pode promover novas formações musculares, assim promovendo melhor acomodação muscular durante a DGO (Mizumoto et al, 1996) e minimizando os danos nos músculos esqueléticos induzidos pela distração (Makarov et al, 2001).

Além das variáveis mecânicas, outra variável que influencia a adaptação do músculo durante a DGO é a maturidade esquelética. Estudo recente observou que a regeneração de novos tecidos musculares em resposta da DGO foi mais vigorosa em animais jovens e, mais discreta em adultos, devido a uma resposta mais pronunciada da proliferação dos mioblastos ou células satélites nos jovens. Como consequência, os músculos de animais esqueleticamente imaturos

apresentam manutenção da função contrátil (força muscular) quando comparados com os coelhos adultos, os quais apresentaram uma severa fraqueza muscular (Kanbe et al, 1998; De Deyne et al, 1999, 2000, 2002; Hayatsu e De Deyne, 2001).

Portanto, estudos mostram que mesmo com um aumento no número de sarcômeros, quando a frequência e ritmo de distração são altos, os sarcômeros adicionados ao longo da fibra muscular são insuficientes para uma adequada adaptação muscular durante a DGO, apresentando uma diminuição da sobreposição dos filamentos de actina e miosina (Simpson et al, 1995; De Deyne et al, 1999, Green et al, 2002; Lindsey et al, 2002) e, conseqüente dano nas unidades contráteis das fibras musculares (Makarov et al, 2001).

#### **2.4. Ação da Leucina no músculo esquelético**

Atualmente, vários estudos vêm analisando a interação entre os nutrientes e a modulação do crescimento muscular. Além da creatina, um nutriente bastante estudado devido sua modulação na plasticidade muscular, recentemente, diversos estudos têm sido realizados utilizando aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) como agentes moduladores do trofismo muscular. Fazem parte dos BCAAs os aminoácidos leucina, isoleucina e valina. Os BCAAs, principalmente a leucina, são um tipo de suplementação protéica que possuem papéis essenciais no organismo, como a regulação do *turnover* macromolecular. Desta maneira, os BCAAs apresentam um efeito anabólico no metabolismo protéico pelo aumento da síntese protéica e/ou diminuição da degradação protéica no músculo esquelético humano (Fulks et al, 1975; Buse e Reid, 1975; Li e Jefferson, 1978; Alvestrand et al, 1990; Nair et al, 1992, Kadowaki e Kanazawa, 2003; Blomstrand et al, 2006). Desta forma, a sobrecarga de leucina pode ser efetiva na limitação de perda de massa protéica no músculo esquelético em pacientes humanos em condições patológicas como sepsis e trauma, bem como potencializar a função muscular em atletas e

prevenir a perda de massa muscular durante o envelhecimento (Sapir e Walser, 1977; Sherwin, 1978; Mitch et al, 1981, Garlick, 2005).

Kobayashi et al (2006) estudou a razão entre a síntese e degradação de síntese protéica durante a infusão de BCAAs em animais normais e submetidos a dois diferentes modelos de atrofia muscular, ratos tratados com corticosterona e imobilização. Kobayashi et al (2006) mostrou que o BCAA estimulou, nos animais normais, a síntese protéica muscular, mas não interferiu na degradação de proteínas. Por outro lado, alguns estudos mostraram que em outros modelos animais de atrofia muscular, o BCAA restaurou a inibição de síntese protéica e reduziu a degradação protéica (Fulks et al, 1975; Buse e Reid, 1975; Li e Jefferson, 1978; Garlick, 2005). Por fim, Combaret e colaboradores mostraram que a suplementação com leucina restaurou a inibição pós-prandial da proteólise dependente de proteassoma em animais velhos de 22 meses de idade em músculo esquelético de ratos (Combaret et al, 2005).

Recentemente, vários estudos têm sido realizados com o intuito de promover um avanço no conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na regulação nutricional e da síntese protéica promovida pela leucina (Anthony et al, 2000; 2001; Lynch et al, 2002; Kimball e Jefferson, 2006). Sugere-se que a leucina promova o aumento da síntese protéica através da estimulação da síntese protéica ribossomal (Anthony et al, 2001). No entanto, evidências também apontam a leucina como um inibidor da degradação protéica no músculo esquelético, atuando diretamente na via da ubiquitina-proteassoma (Kadowaki e Kanazawa, 2003). De qualquer forma, estudos mostram um aumento da síntese de proteína no músculo esquelético através da sobrecarga de leucina via oral (Kimball e Jefferson, 2002; Crozier et al, 2005). Neste sentido, Lynch (2002) realizou a suplementação de leucina adicionada em água (via oral) em ratos e verificou os efeitos dessa suplementação crônica após de 12 dias na síntese protéica em vários tecidos, como músculo esquelético, coração, tecido adiposo e outros. No músculo esquelético,

Lynch (2002) observou que a suplementação de leucina foi acompanhada pelo aumento da síntese protéica.

Com base de que a DGO é uma técnica que apresenta limitação no seu uso devido as alterações musculares ocorridas durante o procedimento, alterações estas principalmente relacionadas com o trofismo muscular, e que a leucina apresenta uma capacidade de promover ativação de vias moleculares relacionadas com a síntese protéica, utilizaremos este aminoácido para intensificar a adaptação muscular durante a DGO. Contudo, promovendo uma melhor adaptação muscular, com um aumento no ganho do crescimento longitudinal, e diminuindo as alterações degenerativas do tecido muscular durante a DGO, conseguiríamos minimizar os danos causados pela técnica no músculo esquelético e aumentar a sua utilização, uma vez que o músculo é o fator limitante da mesma.

## **OBJETIVOS**

Investigar o efeito da sobrecarga de leucina durante o crescimento longitudinal do músculo sóleo de ratos submetidos a DGO. Para isso os seguintes parâmetros foram analisados:

- a) Peso corporal;
- b) Peso e comprimento muscular, comprimento dos tendões, amplitude articular;
- c) Número e comprimento de sarcômeros em série nas fibras musculares;
- d) Percentual e área dos diferentes tipos (I, II e híbridas) de fibras musculares;
- e) Estrutura histológica muscular geral;
- f) Análise do tecido conjuntivo



### **3. JUSTIFICATIVA DO PROJETO**

Está relatado na literatura, que o comprometimento de tecidos moles (em especial tecido muscular) limita a utilização adequada da DGO, ocasionando contraturas musculares, diminuição da amplitude de movimento, fraqueza muscular, aumento da tensão passiva e fibrose muscular, alterações essas que interferem na atividade de vida diária do indivíduo. Vários estudos anteriores abordaram aspectos histológicos das alterações musculares desencadeadas pela DGO. No entanto, até agora, nenhum estudo foi realizado como intervenção terapêutica para minimizar as conseqüências provocadas pela DGO. O uso de leucina como estimulador do crescimento muscular durante a DGO aprofundará nosso conhecimento sobre as alterações histológicas que este aminoácido é capaz de promover no crescimento longitudinal muscular induzido pela DGO e também possui interface com uma intervenção terapêutica potencial.

#### **4. MATERIAL E MÉTODO**

Todos os protocolos descritos neste estudo estão de acordo com os padrões dos Princípios Éticos em Pesquisa com Animais, seguido pela Comissão Brasileira de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – Comitê de Ética para Pesquisa Animal (CEEA) no.168, página 24 do livro dois, 23/02/2006.

##### **4.1. Animais e Grupos experimentais**

Foram utilizados 25 ratos Wistar, com peso corporal médio de  $248 \pm 12,6$ g, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) e mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas I (ICB-I) da Universidade de São Paulo (USP).

Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrões, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 h de ciclo claro/escuro), com livre acesso à água e ração peletizada. Utilizou-se 1 animal por gaiola.

Os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos (Tabela 1):

Grupo 1 (n=5): Estes animais permaneceram intactos e foram considerados como controle.

Grupo 2 (n=5): Estes animais foram submetidos ao processo cirúrgico, colocação do aparelho distrator, mas não sofreram DGO. Os animais foram sacrificados 13 dias após a realização da cirurgia (*sham-lengthening*).

Grupo 3 (n=5): Estes animais receberam apenas sobrecarga de leucina (114 mM adicionados a água de beber) (Lynch, 2002). A sobrecarga de leucina foi iniciada 2 dias antes de realizar a cirurgia.

Grupo 4 (n=5): Esses animais foram submetidos ao processo de DGO da tíbia direita, com 2 mm por dia realizado em dois incrementos de 1 mm a cada 12 horas, até um aumento no crescimento da tíbia de 20% comparado com o inicial. Estes animais sofreram a cirurgia e após 4 dias a DGO foi iniciada. A DGO foi mantida por 4 dias e 5 dias após a DGO os animais foram sacrificados.

Grupo 5 (n=5): Esses animais foram submetidos ao processo de DGO da tíbia direita da mesma forma que o grupo 4 e receberam sobrecarga de leucina como no grupo 3.

Tabela 1: Modelos Experimentais

<b>Tempo</b>	<b>Controle</b>	<b><i>Sham-lengthening</i></b>	<b>Sobrecarga de leucina</b>	<b>Distraído 2mm/dia</b>	<b>Distraído 2mm/dia e com sobrecarga de leucina</b>
	<b>Sem Alongamento</b>	<b>Sem Alongamento</b>	<b>Sem Alongamento</b>	<b>20% de Alongamento</b>	<b>20% de Alongamento</b>
<b>Dia 0</b>	<b>Sem Sobrecarga</b>	<b>Sem Sobrecarga</b>	<b>Início da Sobrecarga</b>	<b>Sem Sobrecarga</b>	<b>Início da Sobrecarga</b>
<b>Dia 2</b>	<b>Sem cirurgia</b>	<b>Cirurgia</b>	<b>Sem cirurgia</b>	<b>Cirurgia</b>	<b>Cirurgia</b>
<b>Dia 8</b>	<b>Sem DGO</b>	<b>Sem DGO</b>	<b>Sem DGO</b>	<b>Início da DGO</b>	<b>Início da DGO</b>
<b>Dia 9</b>				<b>Término da DGO</b>	<b>Término da DGO</b>
<b>Dia 15</b>	<b>Coleta de dados</b>	<b>Coleta de dados</b>	<b>Coleta de dados</b>	<b>Coleta de dados</b>	<b>Coleta de dados</b>

#### 4.2. Procedimento cirúrgico

Os animais submetidos à técnica de DGO da tíbia direita foram previamente anestesiados com Ketamina (30 mg/kg) e Xylazina (10 mg/kg) intra-peritoneal. Após o efeito da anestesia, foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo da porção anterior da tíbia, os músculos foram afastados e foi atingida a superfície externa da tíbia. Um distrator unilateral (Figura 1A) foi utilizado para que a fixação da tíbia e a DGO dos fragmentos ósseos pudessem ser realizadas. Os parafusos foram inseridos no osso após perfurá-los com um perfurador elétrico em plano perpendicular ao eixo dos ossos. Foi realizada uma incisão longitudinal no perióstio num comprimento em torno de 1 cm e afastado para a realização da osteotomia transversa da tíbia entre os parafusos fixados (Figura 1B). Utilizou-se um fio de náilon agulhado para a sutura do tecido subcutâneo e da pele. A DGO foi iniciada 4 dias após a realização do procedimento cirúrgico. Nenhum anti-inflamatório foi utilizado durante o processo cirúrgico e DGO.

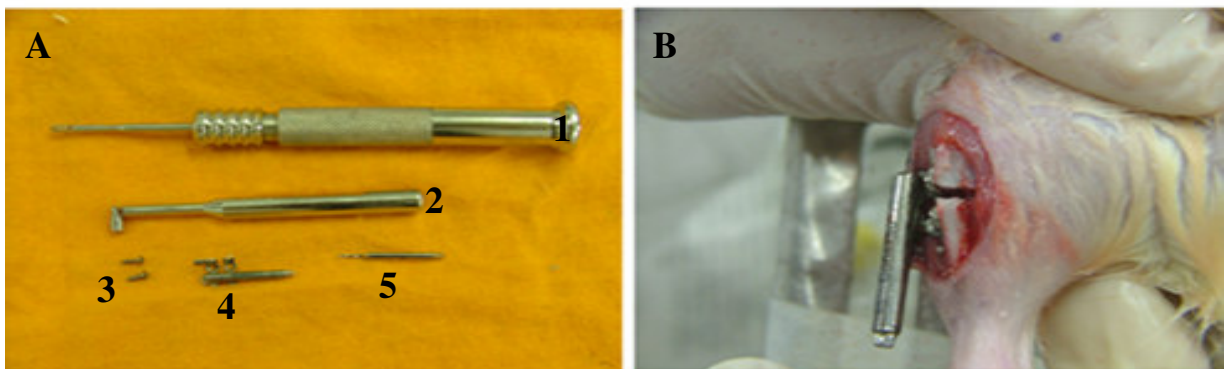


Figura 1: (A) Ferramentas utilizadas durante o processo cirúrgico e de DGO: 1- chave Philips longa; 2 - chave de ativação do distrator; 3- parafusos; 4- distrator e 5- broca. (B) Distrator fixado na tíbia do animal e fratura da tíbia.

### **4.3. Sobrecarga de leucina**

Os animais sofreram uma sobrecarga de leucina (Ajinomoto) 2 dias antes da realização da cirurgia para a fixação do distrator e que se estendeu até o sacrifício dos animais (total de 15 dias), numa suplementação crônica de 114mM. adicionados na água (via oral), como sugerido por Lynch (2002).

### **4.4. Sacrifício dos animais e retirada dos músculos**

Após o fim do experimento, os animais de todos os grupos foram anestesiados para a retirada do músculo sóleo. Em seguida, ainda sob efeito da anestesia, os animais foram sacrificados com super dosagem de anestésico.

Para a medição da amplitude de movimento da articulação do tornozelo de todos os animais, utilizou-se um goniômetro de humanos. Uma régua deste goniômetro foi colocada paralela ao osso da tíbia, posteriormente foi realizada a flexão plantar máxima da pata, acompanhada pela segunda régua do goniômetro que foi mantida paralela aos ossos metatarsos da pata do animal. Após ser atingida a máxima de flexão da pata, foi medida a amplitude de movimento da articulação desejada.

Para a dissecação dos músculos sóleos, colocou-se a articulação do tornozelo em 90°. e os comprimentos do músculo sóleo e tendão foram aferidos com a utilização de um paquímetro (Williams e Goldspink, 1976). O músculo sóleo foi dividido longitudinalmente ao meio e sua porção lateral foi fixada com glutaraldeído (2,5%), pesada e em seguida submetida aos procedimentos de rotina para avaliação do número e comprimento de sarcômeros em série (Goldspink, 1968). A porção medial do sóleo foi pesada e dividida transversalmente em duas partes: uma delas foi congelada para posterior análise histologia/histoquímica e a outra foi mantida como reserva.

#### **4.5. Determinação do número e comprimento de sarcômeros em série**

A porção lateral do músculo sóleo foi destinada à avaliação do número de sarcômeros após a obtenção de fibras musculares isoladas. Inicialmente colocou a porção lateral do músculo em glutaraldeído (2,5%) por 3 h para fixação. Posteriormente as metades dos músculos foram colocadas em ácido nítrico (30%), para hidrólise do tecido conjuntivo, permanecendo por dois dias e em seguida foi armazenada em solução de glicerol (50%).

Para a contagem do número de sarcômeros de cada fibra muscular foram retiradas cinco fibras inteiras de tendão a tendão do músculo. O isolamento das fibras foi realizado colocando-se primeiramente o músculo em uma placa de petri e com o auxílio de lupa (Stemi DRC- Zeiss) as fibras foram isoladas através de pinças com pontas ultrafinas. As fibras retiradas foram montadas em uma lâmina histológica contendo gelatina glicina (Sigma) e 24 h após as fibras serem montadas, foram protegidas com uma lamínula sobre uma fina camada de Entellan para posterior observação em microscópio de luz (objetiva 100 com imersão).

Para a quantificação do número de sarcômeros de cada fibra muscular, foi selecionada a região média da fibra através de microscópio de luz e a imagem foi projetada em monitor de vídeo. Foi contado o número de sarcômeros ao longo de 300  $\mu\text{m}$  (Williams and Goldspink, 1977).

O comprimento dos sarcômeros ao longo da fibra muscular foi mensurado através da relação entre 300  $\mu\text{m}$  e o número de sarcômeros ao longo dos 300  $\mu\text{m}$ , ou seja,  $300/\text{número de sarcômeros}$  (Williams and Goldspink, 1977).

#### **4.6. Procedimentos para Análise Histológica e Histoquímica dos músculos**

Um fragmento transversal obtido do ventre de cada músculo sóleo foi congelado em isopentano, pré-congelado em nitrogênio líquido e estocado em freezer à -80 °C.

De todos os músculos foram obtidos cortes histológicos (10 µm) transversais e seriados, em micrótomo criostato (Microm HM 505 E), mantido à temperatura de -25 °C. As lâminas com os cortes histológicos obtidos foram submetidas de modo intercalado aos seguintes protocolos: a) coloração com azul de toluidina (para avaliação da estrutura muscular geral), b) coloração com Hematoxilina e Eosina (para avaliação da lesão dos músculos analisados), c) identificação dos diferentes tipos de fibras (I, II e híbridas) através da reação para miosina ATPase (m.ATPase), pré-incubada em meio ácido (ac-m.ATPase, pHs 4.3 e 4.6; Brooke e Kaiser, 1970) e alcalino (alc-m.ATPase, pH 10.3; Guth e Samaha, 1969, modificado por Butler e Cosmos, 1981) e d) coloração com Picrosirius Red para análise de tecido conjuntivo.

#### **4.7. Determinação da área das Fibras Musculares**

Dos cortes histológicos, o melhor foi utilizado para a análise das áreas das fibras musculares (cortes sem artefatos de coloração e/ou congelamento) de cada músculo. A imagem captada no microscópio foi gravada e visualizada em monitor de computador para a realização das medidas em µm<sup>2</sup>.

Dos cortes captados e visualizados no computador, foram selecionadas 100 fibras na região média da secção histológica de cada músculo que tiveram suas áreas medidas. A mensuração das áreas das fibras musculares foi feita através do software Image Pro-Plus.

#### **4.8. Análise do tecido conjuntivo**

Cortes histológicos foram utilizados para a análise do tecido conjuntivo. A quantidade total e a distribuição do colágeno foram determinadas qualitativamente através do método de Picrosirius Red, seguido de visualização em microscópio de luz polarizada para identificação das fibras colágenas (Junqueira, Cossermelli e Brentani, 1978).

#### **4.9. Análise estatística**

Foram avaliados os resultados de todas as variáveis (peso corporal, peso muscular, comprimento muscular, número de sarcômeros em série e comprimento de sarcômeros) obtidas do músculo sóleo da pata direita (submetida ao protocolo) para a realização da análise estatística. Para isso, foi realizada análise de variância para comparação múltipla entre os grupos (ANOVA Two-way), seguida de Teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ .



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Peso Corporal

Todos os grupos analisados apresentaram uma tendência de ganho de peso após os 15 dias de experimento, sem diferenças estatísticas significativas (Tabela 2, Figura 2). Os resultados obtidos mostram que o modelo de DGO e a sobrecarga de leucina não influenciaram no peso corporal final dos animais quando comparado com o inicial ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2: Peso corporal inicial e final, amplitude de movimento, comprimento muscular e do tendão, peso muscular e comprimento e número de sarcômeros em série nos diferentes grupos experimentais. <sup>a</sup> vs controle, *sham-lengthening*, com sobrecarga de leucina  $p < 0,001$ . <sup>b</sup> vs controle, *sham-lengthening*, com sobrecarga de leucina e distraído 2mm/dia  $p < 0,001$ . <sup>c</sup> vs controle, *sham-lengthening*, com sobrecarga de leucina  $p < 0,001$ . <sup>d</sup> vs controle, *sham-lengthening*, com sobrecarga de leucina  $p < 0,01$ . <sup>e</sup> vs controle, *sham-lengthening* e com sobrecarga de leucina  $p < 0,001$  e vs distraído 2mm/dia  $p < 0,05$ . Dados expressos em média  $\pm$  DP.

		Controle	Sham-lengthening	Sobrecarga de leucina	Distraído 2mm/dia	Distraído 2mm/dia+Sobrecarga de leucina
Peso Corporal (g)	Inicial	250,7 $\pm$ 9,5	250 $\pm$ 4,0	249,9 $\pm$ 9	246,4 $\pm$ 20,9	238,5 $\pm$ 19,8
	Final	277,1 $\pm$ 14,3	263,2 $\pm$ 3,5	263,9 $\pm$ 21,3	261,0 $\pm$ 20,9	250,7 $\pm$ 17,6
Amplitude de Movimento ( <sup>o</sup> )		179,5 $\pm$ 0,6	169 $\pm$ 0,71	179,2 $\pm$ 0,8	118 $\pm$ 8,04 <sup>a</sup>	126,3 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>
Comprimento Muscular (mm)		20 $\pm$ 1,0	20,3 $\pm$ 0,6	20,4 $\pm$ 1	24 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	26,3 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
Comprimento do tendão (mm)		5,0 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 1,4	5,0 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>	7,0 $\pm$ 1,0 <sup>d</sup>
Peso Muscular (g)		0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,096 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 0,002 <sup>e</sup>
N <sup>o</sup> de Sarcômeros		7700 $\pm$ 426	7800 $\pm$ 286	7530 $\pm$ 347	9640 $\pm$ 760 <sup>a</sup>	10180 $\pm$ 568 <sup>b</sup>
Comprimento dos Sarcômeros ( $\mu$ m)		2,6 $\pm$ 0,09	2,6 $\pm$ 0,06	2,6 $\pm$ 0,08	2,1 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>

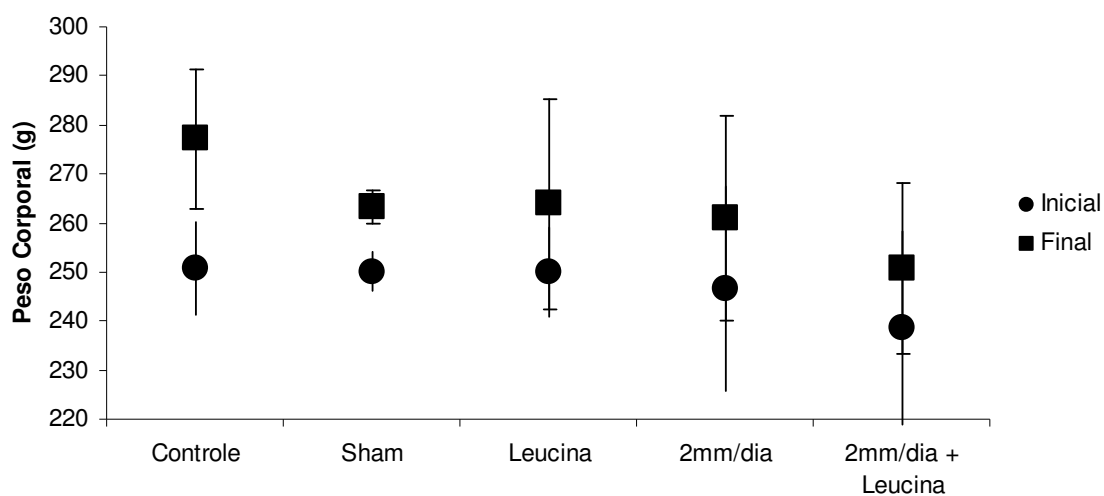


Figura 2: Análise do peso corporal nos diferentes grupos experimentais.

## 5.2. Amplitude de Movimento

Não encontramos diferença na amplitude de movimento durante o experimento nos animais dos grupos controle, *sham-lengthening* e leucina (Tabela 2, Figura 3), os animais do grupo apenas distraído 2mm/dia mostraram uma significativa perda na amplitude de movimento do tornozelo comparado com os grupos controle e *sham-lengthening* (34% e 28%, respectivamente,  $p < 0,001$ ) ao término do experimento. A sobrecarga com leucina nos animais distraídos 2mm/dia amenizou a perda da amplitude de movimento em 4%, insuficiente para manter seus valores próximos da amplitude de movimento dos animais do grupo controle ( $p < 0,001$ ).

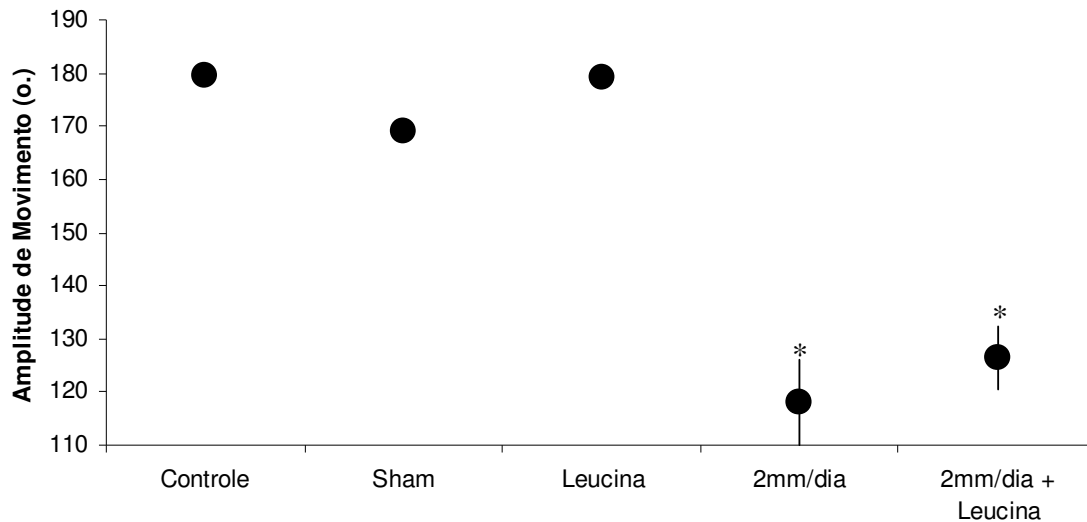


Figura 3: Análise da amplitude de movimento da articulação do tornozelo nos diferentes grupos experimentais.  
 \*  $p < 0,001$  quando comparado com o controle, *sham-lengthening* e com sobrecarga de leucina.

### 5.3. Comprimento Muscular

A colocação do distrator nos animais não interferiu no comprimento dos músculos sóleos, como é mostrado nos resultados obtidos dos animais que sofreram a cirurgia, mas não sofreram a DGO (grupo *sham-lengthening*). Somente a sobrecarga com leucina não interferiu no comprimento muscular dos animais. Houve um aumento no comprimento dos músculos sóleos dos animais que apresentaram DGO da tibia (Tabela 2, Figura 4). Os animais apenas distraídos 2mm/dia e os animais distraídos 2mm/dia e com sobrecarga de leucina obtiveram um aumento significativo no comprimento muscular de aproximadamente 20 e 31%, respectivamente, quando comparado com os grupos controle, *sham-lengthening* e suplementados com leucina ( $p < 0,001$ ). Os animais distraídos 2mm/dia e com sobrecarga de leucina apresentaram um aumento de 11% ( $p < 0,001$ ) no comprimento dos músculos sóleos quando comparado com os animais apenas distraídos.

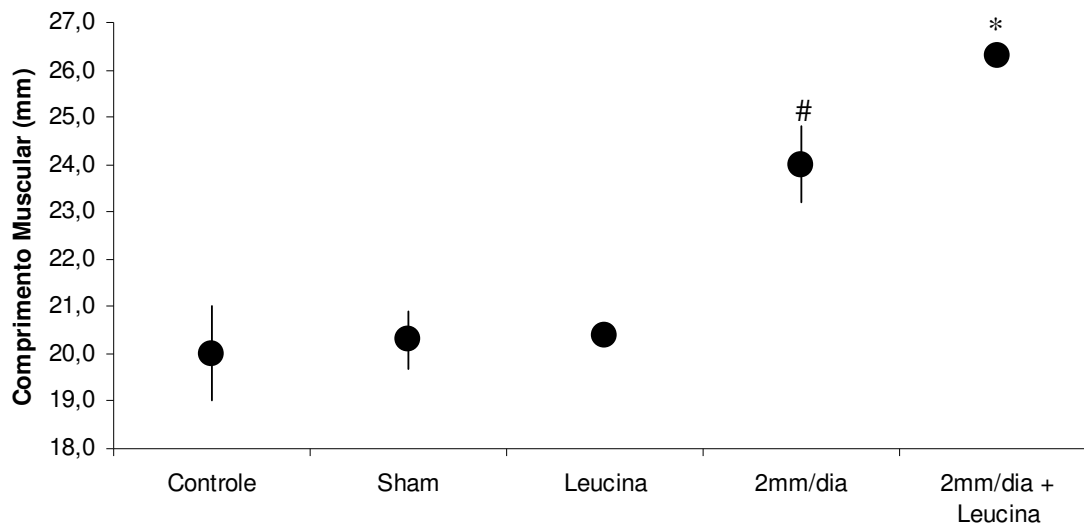


Figura 4: Análise do comprimento muscular nos diferentes grupos experimentais. #  $p < 0,001$  quando comparado com os grupos controle, *sham-lengthening* e com sobrecarga de leucina; \*  $p < 0,001$  quando comparado com os grupos controle, *sham-lengthening*, com sobrecarga de leucina e distraído 2mm/dia.

#### 5.4 Comprimento do Tendão

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o comprimento dos tendões dos músculos sóleos dos grupos controle, *sham-lengthening* e leucina. Os animais de ambos os grupos, apenas distraído 2 mm/dia e distraído 2mm/dia e com sobrecarga de leucina apresentaram um aumento significativo do comprimento do tendão (50%;  $p < 0,001$  e 40%;  $p < 0,01$ , respectivamente) quando comparado com o grupo controle, *sham-lengthening* e suplementados com leucina. Não houve diferença entre os grupos apenas distraído 2mm/dia e distraído e com sobrecarga de leucina (Tabela 2; Figura 5).

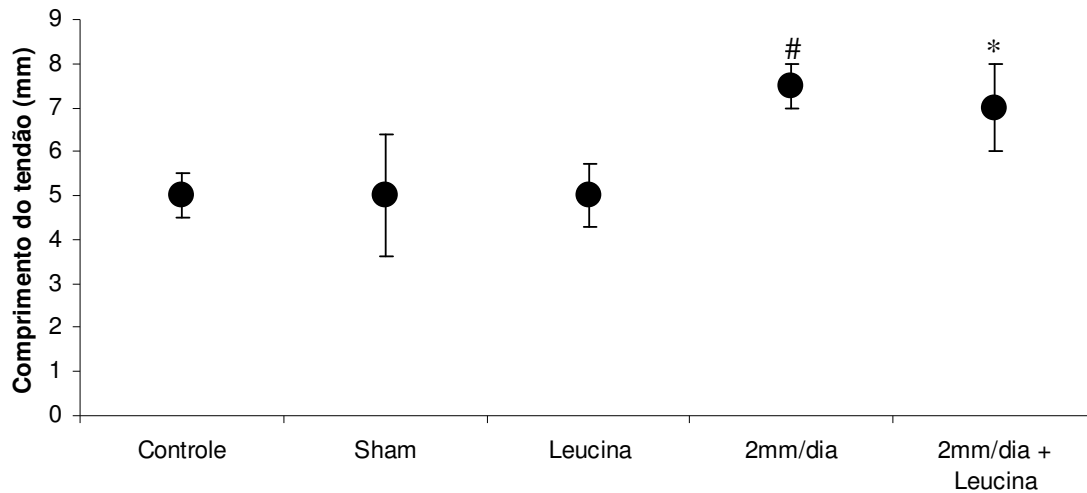


Figura 5: Análise do comprimento do tendão nos diferentes grupos experimentais. #  $p < 0,001$  quando comparado com os grupos controle, *sham-lengthening*, com sobrecarga de leucina; \*  $p < 0,01$  quando comparado com o controle, *sham-lengthening* e com sobrecarga de leucina.

### 5.5. Peso Muscular

Não foi observada nenhuma diferença entre o peso muscular dos animais do grupo controle, *sham-lengthening* e leucina (Tabela 2 e Figura 6). O grupo distraído 2mm/dia apresentou uma queda no peso muscular de 40% ( $p < 0,001$ ) quando comparado com os grupos controle, *sham-lengthening* e leucina. Os animais submetidos a DGO de 2mm/dia e com sobrecarga de leucina apresentaram uma queda de 30% ( $p < 0,001$ ) quando comparado com os grupos controle e *sham-lengthening*. Em relação aos grupos que sofreram distração, o grupo distraído e com sobrecarga de leucina apresentou um aumento significativo de 10% ( $p < 0,05$ ) no peso muscular quando comparado com o grupo distraído 2mm/dia.

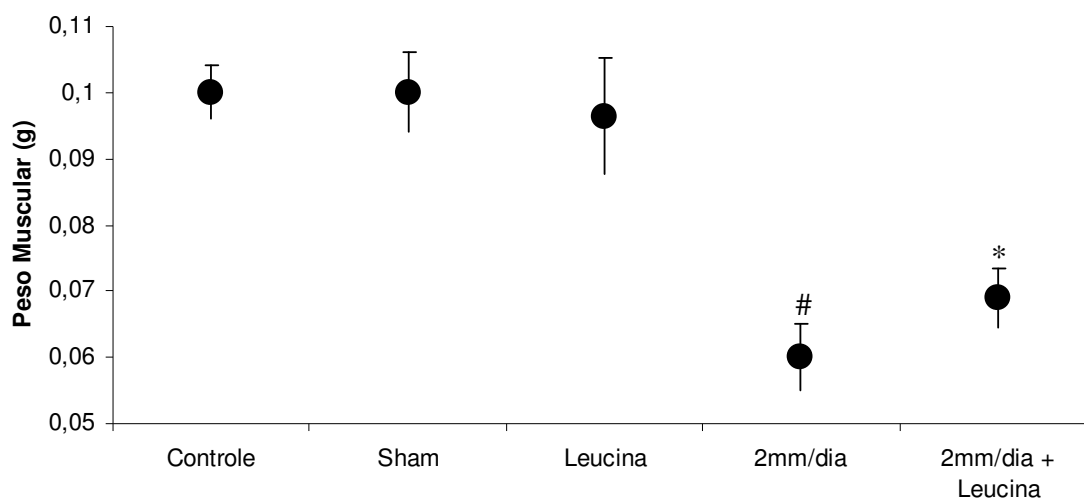


Figura 6: Análise do peso Muscular nos diferentes grupos experimentais. #  $p < 0,001$  quando comparado com os grupos controle, *sham-lengthening*, com sobrecarga de leucina; \*  $p < 0,001$  quando comparado com os grupos controle, *sham-lengthening* e com sobrecarga de leucina e  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo distraído 2mm/dia.

## 5.6. Número e Comprimento de Sarcômeros

Não foi observada nenhuma diferença entre o número e comprimento de sarcômeros em série dos animais do grupo controle, *sham-lengthening* e leucina (Tabela 2 e Figura 6). A DGO resultou na adição significativa de sarcômeros em série ao longo da fibra muscular e foi intensificada após a sobrecarga de leucina (Tabela 2 e Figura 7). Com um ritmo de DGO de 2 mm/dia houve um aumento no número de sarcômeros em série de 26% ( $p < 0,001$ ), enquanto que a DGO de 2mm/dia associada a sobrecarga de leucina resultou em um aumento de 33% ( $p < 0,001$ ) quando comparado com os grupos controle e *sham-lengthening*. Quando se compara os grupos distraídos entre si, houve uma diferença significativa entre eles,  $p < 0,001$ .

O aumento do comprimento muscular dos grupos distraídos foi confirmado pelas medidas de comprimento sarcomérico. Nestas medidas, o músculo é fixado in vivo com ângulo articular de 90° da articulação do tornozelo e a análise do comprimento sarcomérico mostrou-se significativamente diminuída em ambos os grupos: distraído e, distraído e com sobrecarga de

leucina, 20 e 27%, respectivamente, ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o grupo controle e *sham-lengthening* (Tabela 2 e Figura 8). Diferente do resultado obtido no número de sarcômeros em série, os grupos distraído 2mm/dia e distraído 2mm/dia e com sobrecarga de leucina não apresentaram diferença significativa quanto ao comprimento dos sarcômeros.

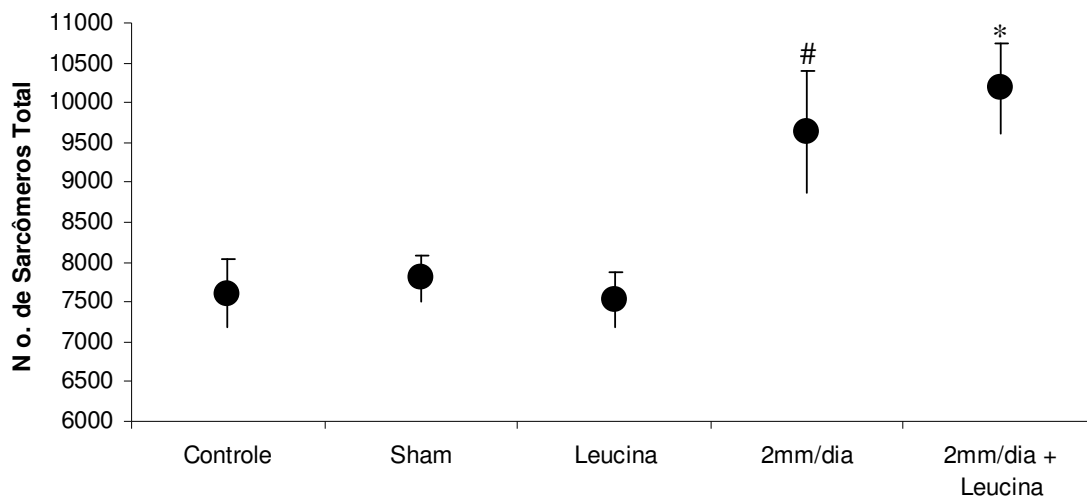


Figura 7: Análise do número de sarcômeros em série nos diferentes grupos experimentais. #  $p < 0,001$  quando comparado com os grupos controle, *sham-lengthening* e com sobrecarga de leucina; \*  $p < 0,001$  quando comparado com os grupos controle, *sham-lengthening*, com sobrecarga de leucina e distraído 2mm/dia.

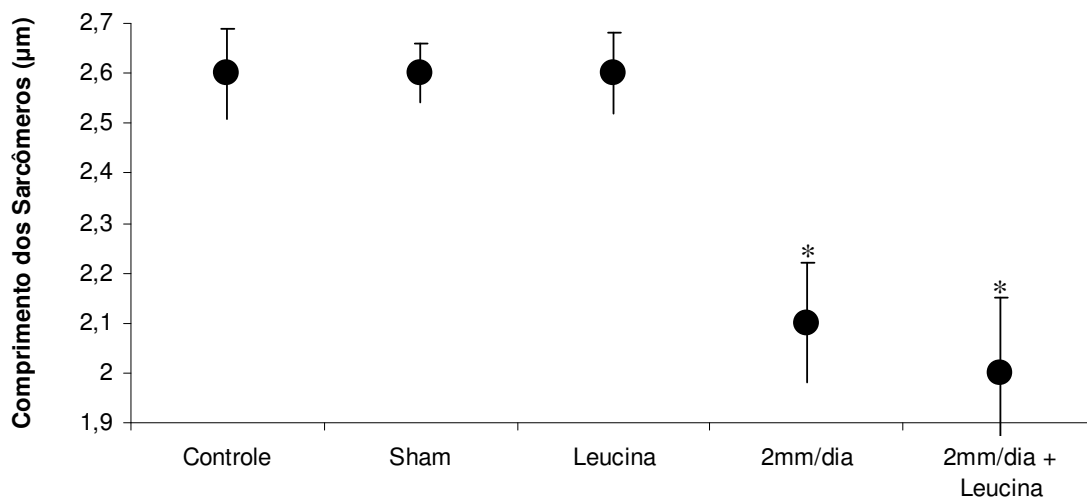


Figura 8: Análise do comprimento dos sarcômeros nos diferentes grupos experimentais. \*  $p < 0,001$  quando comparado com o controle, *sham-lengthening* e com sobrecarga de leucina.

## **5.7. Percentual e Área de Secção Transversa dos Diferentes Tipos de Fibras Musculares**

A coloração com mATPase nos cortes dos músculos sóleo revelou que o percentual dos diferentes tipos de fibras não foi alterado durante todo o experimento, independente do tipo de tratamento utilizado, DGO e/ou sobrecarga de leucina (Tabela 3, Figura 9).

Por outro lado, a área das fibras musculares mostrou alterações diferenciadas frente ao tipo de tratamento utilizado. O grupo *sham-lengthening* não apresentou diferença quando comprado como grupo controle. Somente a sobrecarga de leucina promoveu um aumento significativo de 44% nas fibras do tipo I quando comparado com o grupo controle, o que não aconteceu nas fibras do tipo II e indiferenciadas.

Por sua vez, a área de todos os tipos de fibras musculares foi significativamente reduzida durante a DGO. A maior redução ocorreu nas fibras do tipo I (65%), sendo de 54% a redução na área de secção transversa do tipo II e uma queda de 47% nas fibras indiferenciadas quando comparadas com o grupo controle. A sobrecarga de leucina nos animais distraídos apresentou uma redução minimizada nas áreas das fibras musculares (38, 20 e 18% das fibras do tipo I, II e indiferenciadas, respectivamente), sendo somente significativa a redução das fibras do tipo I.



Tabela 3: Percentual e área dos diferentes tipos de fibras musculares (Tipo I, Tipo II e indiferenciadas). <sup>a</sup> p<0,05 vs controle e sham-lengthening. <sup>b</sup> p<0,001 vs leucina. <sup>c</sup> p<0,01 vs leucina. <sup>d</sup> p<0,05 vs leucina. <sup>e</sup> p<0,05 vs controle e sham-lengthening e p<0,01 vs leucina. <sup>f</sup> p<0,05 vs leucina. Dados expressos em média ± DP.

		Controle	Sham-lengthening	Sobrecarga de leucina	Distraído 2mm/dia	Distraído 2mm/dia+Sobre carga de leucina
Porcentual dos diferentes tipos de fibras musculares	Tipo I	85,4 ± 1,0	81,9 ± 2,3	88,3 ± 5,4	85,4 ± 3,5	86,9 ± 2,3
	Tipo II	9,7 ± 0,9	13,2 ± 2,6	9,7 ± 5,8	10,9 ± 2,4	10,4 ± 1,3
	Indif.	4,9 ± 0,9	5,0 ± 0,2	1,9 ± 0,5	6,4 ± 0,7	7,5 ± 1
Área dos diferentes tipos de fibras musculares (µm <sup>2</sup> )	Tipo I	1975,5 ± 25,1	2007 ± 20,5	2856,4 ± 161 <sup>a</sup>	904,2 ± 42,4 <sup>a,b</sup>	1792 ± 18,1 <sup>c</sup>
	Tipo II	1971,4 ± 239,4	2010 ± 116	2176,8 ± 75,2	915,8 ± 39,6 <sup>a,c</sup>	1313,8 ± 33,8 <sup>f</sup>
	Indif.	193,6 ± 64,8	2046 ± 171	2086,7 ± 126,9	1024,6 ± 21,2 <sup>a,d</sup>	1374,5 ± 55,6

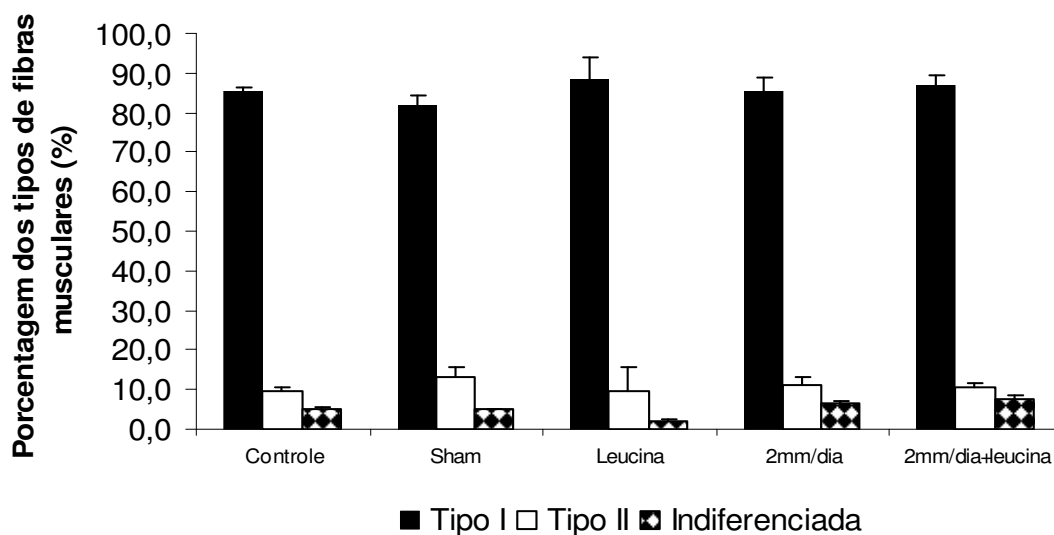


Figura 9: Análise do percentual dos diferentes tipos de fibras musculares.

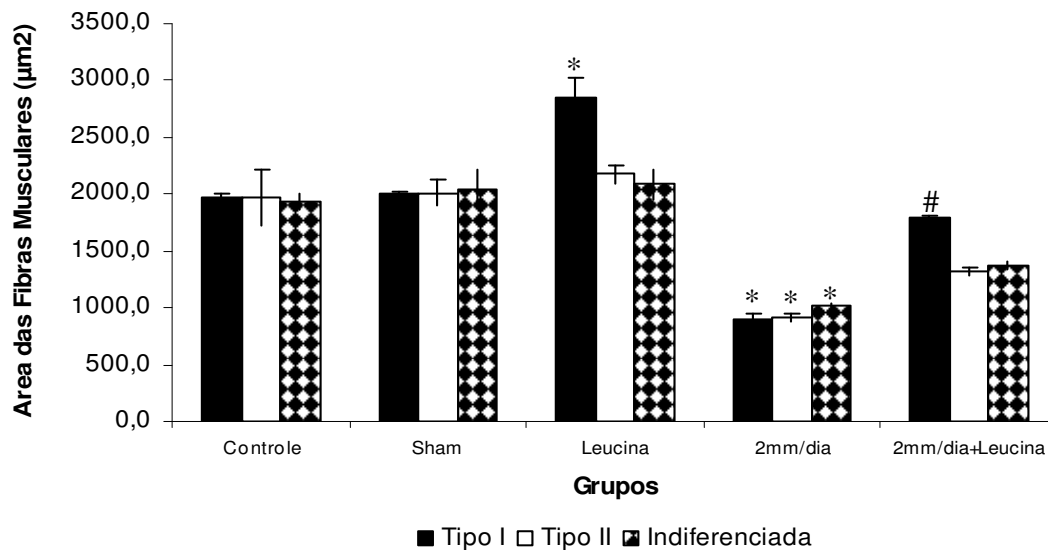


Figura 10: Análise da área dos diferentes tipos de fibras musculares. \*  $p < 0,001$  quando comparado com os grupos controle e *sham-lengthening*. #  $p < 0,05$  quando comparado com os grupos controle e *sham-lengthening* e  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo leucina.

### 5.8. Análise Histológica

Os animais do grupo *sham-lengthening* (Figura 11B e G, figura 12L e Q) e com sobrecarga de leucina (Figura 11C e H, figura 12M e R) não apresentam anormalidades em relação à estrutura histológica quando comparado com o grupo controle (Figura 11A e F, figura 12K e P), o que mostra que a cirurgia e a sobrecarga de leucina não interferiram nas estruturas das fibras musculares. Estas fibras, assim como as fibras do grupo controle apresentaram um formato poligonal, típico da fibra muscular esquelética, com núcleos periféricos, e nítida limitação entre as fibras musculares e tecido conjuntivo. Já os animais do grupo distraído 2mm/dia (Figura 11D e I, figura 12N e S) apresentam sinais intensos de lesão muscular, o que pode ser observado pela invasão de células mononucleares inflamatórias e necrose, alterações minimizadas com a sobrecarga de leucina nos animais que sofreram a distração, como é

observado nos animais do grupo DGO com sobrecarga de leucina (Figura 11E e J, figura 12O e T).

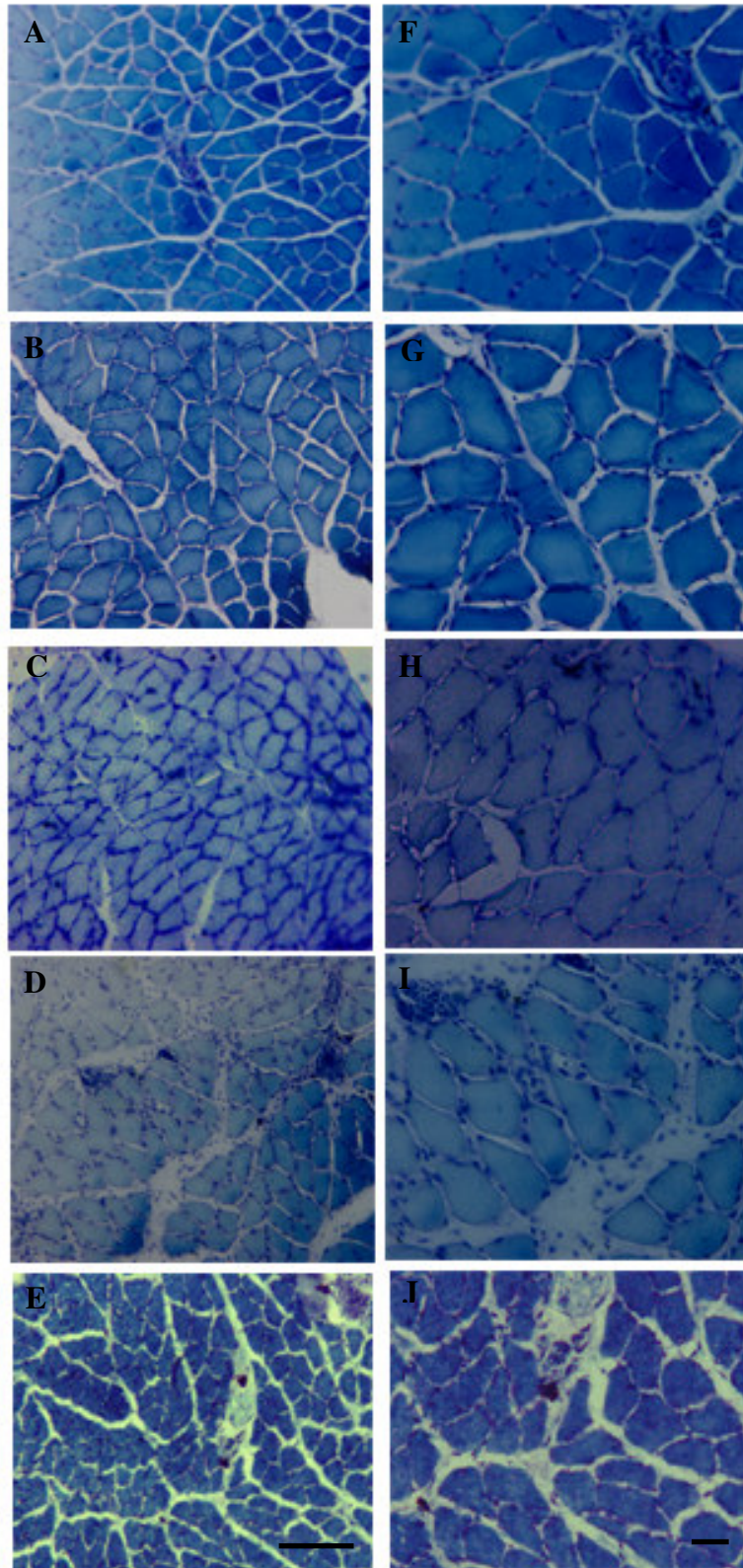


Figura 11: Análise dos cortes transversais dos grupos controle, sham-lengthening, leucina, distraído 2mm/dia e distraído 2mm/dia+leucina, em aumento de 100 (A, B, C, D e E, respectivamente) e 200X (F, G, H, I e J). Coloração com Azul de toluidina. Barra =100µm

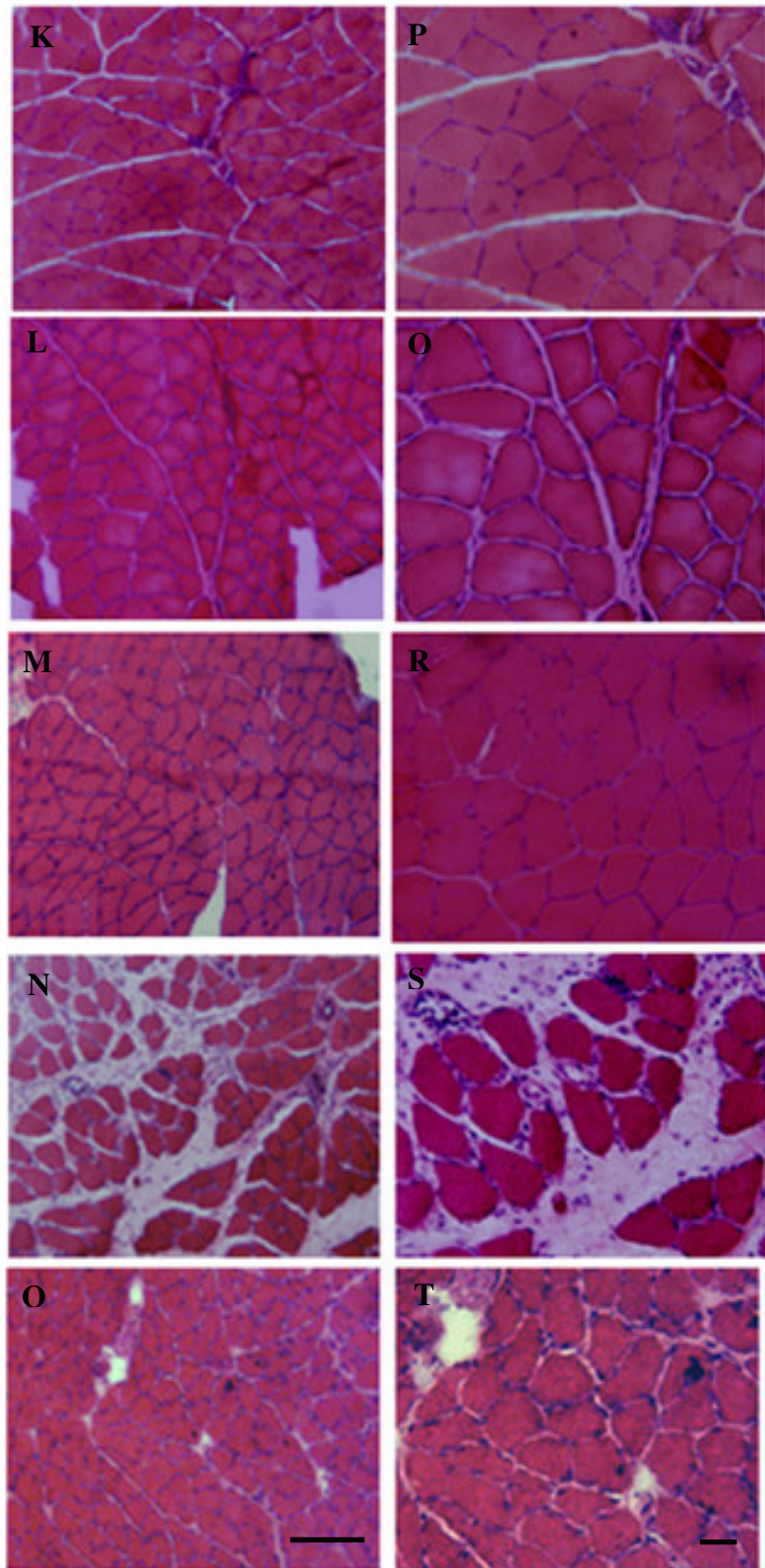


Figura 12: Análise dos cortes transversais dos grupos controle, sham-lengthening, leucina, distraído 2mm/dia e distraído 2mm/dia + leucina, em aumento de 100 (K, L, M, N e O, respectivamente) e 200X (P, Q, R, S e T).. Coloração com Hematoxilina e Eosina. Barra =100µm

### **5.9. Análise do Tecido Conjuntivo**

A análise da imagem dos cortes transversais dos músculos esqueléticos e posterior coloração com Picrosirius Red (Figura 13) mostrou que não houve diferença na quantidade de tecido conjuntivo nos animais do grupo *sham-lengthening* (Figura 13V e AA) e com sobrecarga de leucina (Figura 13W e AB) comparado com o grupo controle (Figura 13U e Z ). Diferente destes grupos, os animais do grupo distraído 2mm/dia (Figura 13X e AC) apresentaram um aumento na quantidade de tecido conjuntivo do epimísio e endomísio. A sobrecarga de leucina minimizou este aumento de tecido conjuntivo nos animais que sofreram a distração, como pode ser visto nos cortes transversais dos animais do grupo DGO e com sobrecarga de leucina (Figura 13Y e AD).



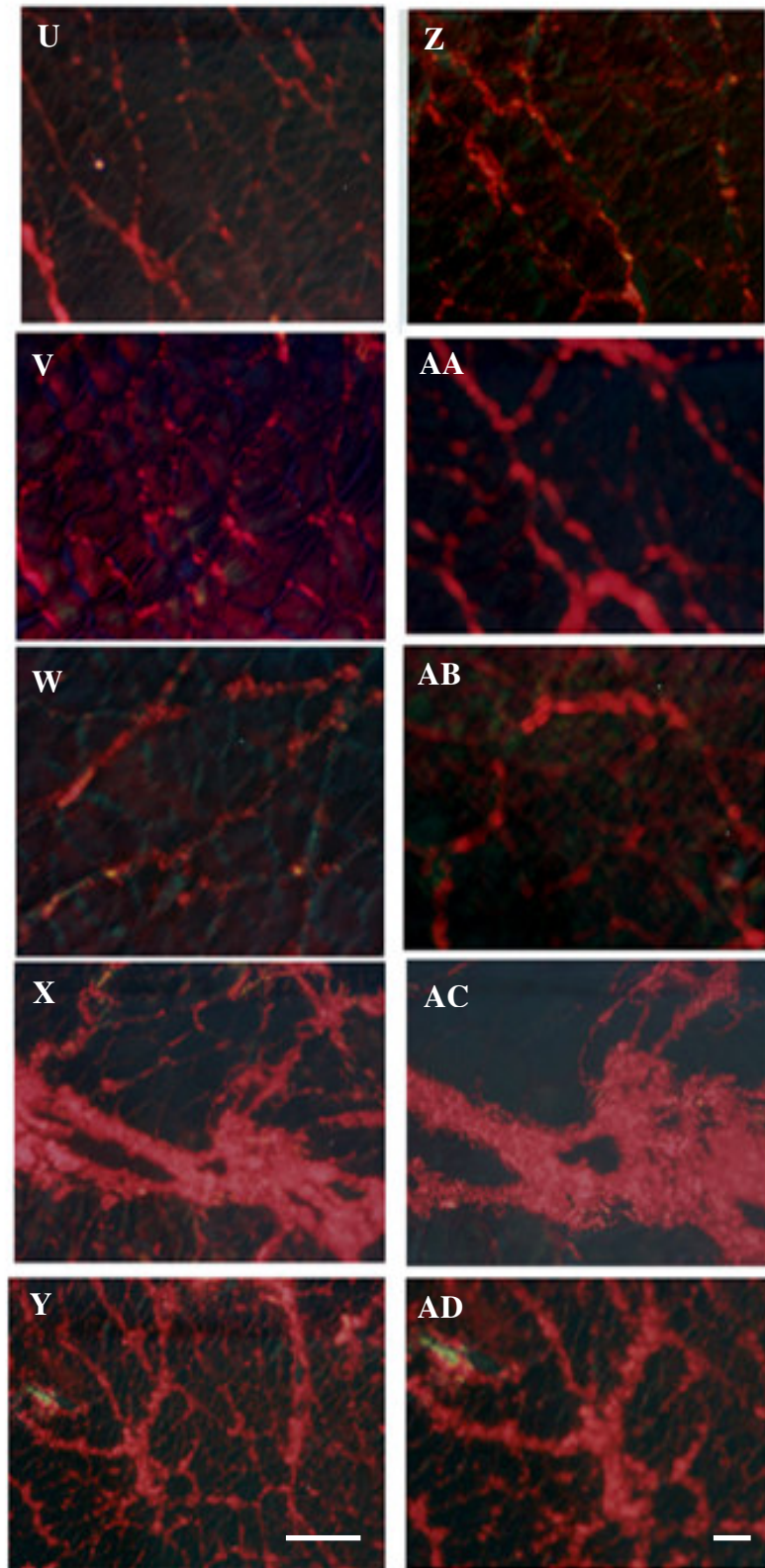


Figura 13: Análise dos cortes transversais dos grupos controle, sham-lengthening, leucina, distraído 2mm/dia e distraído 2mm/dia+leucina,, em aumento de 100 (U, V, W, X e Y, respectivamente) e 200x (Z, AA, AB, AC e AD, respectivamente). Coloração com Picrosirius Red. Barra = 100µm

## 6. DISCUSSÃO

O músculo esquelético é um tecido que apresenta alta capacidade de adaptação. Estudos envolvendo alongamento/encurtamento crônicos mostram que o músculo esquelético é capaz de se adaptar aumentando ou diminuindo seu comprimento funcional pela adição ou remoção de sarcômeros em série (Williams e Goldspink, 1971; 1973; 1976; 1985). Por outro lado, a DGO, utilizada na clínica médica para promover o crescimento ósseo induzido, apresenta uma boa adaptação óssea durante seu procedimento, diferente do osso, o músculo esquelético não apresenta uma adaptação tão adequada. No entanto, este método utilizado frequentemente resulta em complicações dos tecidos moles que estão ao seu redor, como por exemplo, contratura muscular (Paley, 1990), perda da ADM e força muscular (Williams et al, 1998) e lesão muscular (De Deyne et al, 1999), complicações estas relacionadas ao tecido muscular.

Atualmente, pouco se sabe sobre as alterações celulares e moleculares que ocorrem nos músculos esqueléticos durante o procedimento de DGO. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo esclarecer algumas alterações celulares ocorridas no músculo sóleo e investigar o efeito da sobrecarga de leucina durante o crescimento longitudinal do músculo esquelético de ratos submetidos à DGO.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a DGO não influenciou significativamente no peso corporal, o que mostra que o modelo usado provavelmente não interferiu na mobilidade dos animais, permitindo o livre acesso à água e ração. Em contrapartida, a DGO interferiu na massa dos músculos sóleos, podendo nos dar a idéia de que a massa muscular é influenciada pela DGO imposta. Desta maneira, o uso dos distratores pode ter limitado o uso da pata, obtendo como conseqüência atrofia muscular, o que resultaria na diminuição da massa muscular observada. Essa suposta atrofia muscular pode ser reforçada pela



diminuição da área de secção transversa das fibras musculares observado nos animais que sofreram a DGO.

Nosso estudo mostrou uma diminuição significativa de área de todos os tipos de fibras durante a DGO, processo decorrente de um possível aumento da degradação protéica, resultante da atrofia muscular. Até o presente momento, os estudos existentes na literatura apresenta-se controversos, muitos tem reportado a diminuição do diâmetro das fibras do tipo 2B (Lindboe et al, 1985; Urabe et al, 1995; Fink et al, 2000). No entanto, outro estudo mostra mudanças no diâmetro das fibras do tipo I (Lee et al, 1993).

Uma análise do tipo de fibra muscular também é importante, uma vez que este representa mudanças qualitativas nas propriedades do músculo esquelético. A literatura contém muitos estudos sobre as alterações do tipo de fibra muscular durante o processo de distração, mas ainda não existe um consenso nas mudanças morfológicas que ocorrem durante o processo. Alguns estudos mostraram que a porcentagem de fibras do tipo I aumento, quanto as fibras do tipo II diminuíram (Urabe, 1995; Fink et al, 2000). Por outro lado, outros estudos não reportaram alteração no tipo de fibra durante a DGO (Lindboe et al, 1985; Lee et al, 1993). Da mesma maneira que estes últimos estudos mencionados, os nossos resultados não promoveu nenhuma alteração com relação ao tipo de fibra muscular, o que poderia mostrar que o estímulo de alongamento promovido pela distração não foi suficiente para alterar as estruturas morfológicas das fibras.

Assim como a massa muscular e área das fibras musculares, todos os membros distraídos apresentaram uma perda da ADM da articulação do tornozelo. Os animais do grupo *sham-lengthening* não apresentaram alteração da ADM da articulação, o que demonstra que essa perda está associada, principalmente, com o alongamento do membro, e não com o procedimento operatório. Estudo mostra que essa perda da amplitude de movimento dos animais submetidos à

DGO está intimamente relacionada com o ritmo utilizado, músculos distraídos em maiores ritmos mostraram uma perda maior na amplitude de movimento da articulação do tornozelo (Williams et al, 1999). Um estudo realizado por Williams e colaboradores (1999) associou a perda da ADM com a falência das fibras musculares em adicionar sarcômeros juntamente com o aumento de tecido conjuntivo do perimísio e endomísio. Alterações observadas também neste estudo.

Por outro lado, contrapondo a perda de massa muscular, área das fibras musculares e ADM, os resultados mostram que o comprimento muscular acompanhou o crescimento da tibia durante o processo de DGO, sendo um dos indicadores de uma resposta adaptativa muscular. O estiramento ósseo da tibia em 20% (2mm/dia) promoveu um aumento de 20% no comprimento do músculo sóleo. Tais resultados estão de acordo com Williams (Williams et al, 1998), que mostrou um aumento no comprimento muscular relacionado com a DGO, quando mensurados na posição de 90°. da articulação do tornozelo.

Szöke mostrou que, além do comprimento muscular, o processo de DGO também interferiu no comprimento do tendão. Durante o processo de DGO da tibia, houve um significativo aumento da porção proximal do tendão do músculo sóleo, demonstrando que o tendão tem habilidade de se alongar durante o procedimento. Nossos resultados estão de acordo com este estudo, observamos uma resposta adaptativa do tendão, a qual contribui significativamente para o aumento do comprimento do complexo músculo-tendão durante a DGO.

Outro indicador da resposta adaptativa do músculo durante a DGO é o aumento no número de sarcômeros em série ao longo da fibra muscular. Diferente de alguns estudos que mostram que altos ritmos de DGO não promovem adição suficiente de sarcômeros ao longo da fibra (Simpson, 1995; Williams, 1999), nosso estudo mostrou que a DGO de 2mm/dia promoveu um aumento significativo de sarcômeros em série, mostrando que, durante a DGO, o músculo

sóleo apresenta uma capacidade adaptativa através da adição de sarcômeros em série nas miofibrilas preexistentes. Por outro lado, o comprimento dos sarcômeros ao longo da miofibrila apresentou uma diminuição, modificação esta esperada uma vez que, com o aumento de sarcômeros em série, este se ajusta mantendo o seu comprimento ótimo.

No entanto, uma inapropriada adaptação muscular pode resultar em danos das fibras musculares levando a uma necrose na fibra muscular. Desta maneira, os dados obtidos a partir da estrutura histológica muscular geral, mostram que o grupo *sham-lengthening* não apresentou nenhum sinal de dano muscular e alteração da quantidade de tecido conjuntivo, o que pode garantir que o músculo sóleo não sofreu lesão muscular durante o processo operatório e que as anormalidades, semelhantes ao processo de dano muscular, resultantes, por exemplo, do exercício excêntrico, e o aumento da quantidade de tecido conjuntivo, observadas nos cortes transversais dos músculos distraídos 2mm/dia estão relacionadas ao processo de DGO realizado. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Williams (Williams et al, 1994) o qual mostrou que a DGO realizada em ritmos acima de 1mm/dia as alterações musculares são visíveis.

Estudos prévios com DGO mostraram que o componente tecido conjuntivo dos músculos distraídos não adaptou ao processo de distração da mesma maneira que o componente contrátil (Williams et al, 1998; 2001). O mesmo foi observado em nosso estudo, os dados mostram que os animais do grupo *sham-lengthening* apresentaram a mesma quantidade de tecido conjuntivo que os animais do grupo controle, reforçando a idéia de que a cirurgia não foi lesiva para o músculo esquelético, mas sim o processo de distração. Diferentemente, os animais do grupo distraído mostraram um grande aumento de tecido do epimísio e endomísio. Estes dados suportam as observações feitas por Shen e Aronson (1993) que demonstrou que o método de distração com mais de 20% causou fraqueza aguda do músculo gastrocnêmio, decorrente do aumento da fibrose do endomísio e perimísio.

Outro objetivo do estudo foi avaliar o efeito da sobrecarga de leucina durante a DGO na tentativa de minimizar os efeitos maléficos desta técnica no tecido muscular. A partir deste ponto de vista, pode-se observar que a sobrecarga de leucina nos animais intactos somente interferiu na alteração da área das fibras do tipo I, aumentando seu diâmetro drasticamente, não sendo suficiente para alterar qualquer outro parâmetro analisado durante o procedimento. Por outro lado, quando se associou a DGO 2mm/dia à sobrecarga de leucina observamos uma ligeira alteração nos resultados apresentados, amenizando a perda da amplitude de movimento, de peso muscular e área de secção transversa das fibras do tipo I, e intensificando o aumento do comprimento muscular e número de sarcômeros em série, resultados estes obtidos somente com a DGO de 2m/dia. Quando olhamos apenas para a área de secção transversa das fibras musculares, observamos que a leucina foi capaz de alterar apenas o diâmetro das fibras do tipo I, para explicar tal acontecimento, seria necessário uma análise mais detalhada realizando-se a DGO em um músculo branco, assim como fazer a análise molecular desses dois músculos, para saber qual a ação real da leucina nesse tipo de fibra muscular. Através dos resultados apresentados nesse projeto, podemos revelar que a sobrecarga de leucina não é capaz de promover um estímulo de crescimento nos tecidos musculares, mas apresenta uma provável capacidade de intensificar um estímulo quando associada a ela.

Utilizando os conceitos atuais de biologia celular e molecular e os resultados do presente estudo, nós concluímos que o alongamento de membros através da DGO promove uma resposta muscular adaptativa, como já relatado na literatura. A adaptação muscular ocorre, pois a DGO alonga as fibras musculares passivamente promovendo o aparecimento de microlesões, a ponto de causar danos na lâmina basal das fibras musculares e estimular as células satélites (Makarov, Kochutina e Samchukov, 2001; Schultz, 1985). Por outro lado, a DGO utilizada em um ritmo alto pode resultar em lesões mais acentuadas, que poderão não ser reparadas, e assim, promover o

aumento no tecido conjuntivo. Este, por sua vez, pode promover fraqueza muscular e, também, contribuir para a perda da amplitude de movimento. Por outro lado, sabe-se que a leucina atua ativando a via moleculares envolvidas com o trofismo muscular, como AKT/mTOR (via relacionada com o crescimento muscular longitudinal), assim, durante a DGO a sobrecarga de leucina poderia estar intensificando a ação da via, promovendo uma melhor resposta adaptativa do músculo.

Contrapondo as alterações obtidas com a DGO, a sobrecarga de leucina mostra-se promissora para ser utilizada no futuro como uma intervenção terapêutica, uma vez que esta não apresenta efeitos colaterais e limitação no seu uso, e promove um maior aumento no crescimento muscular e ameniza as alterações maléficas resultantes da DGO.

## **7. CONCLUSÃO**

Os dados obtidos em nossos experimentos confirmam que o músculo esquelético apresenta uma capacidade de adaptação frente ao estímulo induzido pela Distração Gradual Osteogênica através da adição de sarcômeros em série e aumento do comprimento muscular. Ao mesmo tempo, a Distração Gradual Osteogênica realizada a 2mm/dia é capaz de promover um processo degenerativo e um aumento na quantidade de tecido conjuntivo, alterações estas não reparáveis durante o procedimento. Por outro lado, a sobrecarga de leucina (114mM adicionados em água de beber) via oral foi capaz de intensificar a adaptação muscular frente ao estímulo e minimizar os efeitos degenerativos e da quantidade de tecido conjuntivo no músculo esquelético. Desta maneira, a leucina parece ser um bom agente terapêutico em potencial para ser utilizado no futuro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alter, MJ *Ciência da flexibilidade*, 2<sup>a</sup> ed. Artmed, Porto Alegre, 1999.
2. Alford EK, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR. Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hindlimb suspension. *Exp. Neurol.* 1987; 96:635-649.
3. Alvestrand A, Hagenfeldt L, Merli K, Oureshi LS. Influence of leucine infusion on intracellular amino acids in humans. *Eur J Clin Invest.* 1990; 20:293-298.
4. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr.* 2000;130:2413-2419.
5. Anthony TG, Anthony JC, Yoshizawa F, Kimball SR, Jefferson LS. Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *J Nutr.* 2001;131:1171-1176.
6. Aoki M, Miyabara EH, Soares AG, Saito ET, Moriscot A. mTOR pathway inhibition attenuates skeletal muscle growth induced by stretching. *Cell Tissue Res.* 2006; 324(1):149-56.
7. Aronson J. Experimental and Clinical experience with distraction osteogenesis. *Cleft Palate-Craniofacial Journal.* 1994; 31(6):473-482
8. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin Jr. CK. Rat model of distraction osteogenesis. *J. Orthop. Res.* 1997; 15:221-226.
9. Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 1996; 7:25-42.
10. Blomstrand E, Eliasson J, Karlsson HKR, Köhnke R. Branched-Chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J Nutr.* 2006;136:269S-273S.
11. Booth FW, Kelso JR. Cytochrome oxidase of skeletal muscle: adaptive response to chronic disuse. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1973; 51(9):679-681.
12. Boyes G, Johnston I. Muscle fiber composition of rat vastus intermedius following immobilization at different muscle lengths. 1979; 381:195-200
13. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch. Neurol.* 1970; 23: 369-97.
14. Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC, Abraham RT. Phosphorilation of the translational repressor PHAS-1 by mammalian target of rapamycin. *Science.* 1997; 277:99-101.

15. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the transcriptional regulators p70 S6 Kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998; 95:1432-1437.
16. Buse MG, Reid SS. Leucine: a possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest.* 1975; 56:1250-1261.
17. Butler J, Cosmos E. Enzymic markers to identify muscle-nerve formation during embryogenesis; modified myosin ATPase and silver-cholinesterase histochemical reactions. *Exp. Neurol.* 1981; 73: 831-6.
18. Caiozzo VJ, Utkan A, Chou R, Khalafi A, Chandra H, Baker M, Rourke B, Adams G, Baldwin K, Green S. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 2002; 403S:S133-S145.
19. Clement G, Gurfinkel VS, Lestienne F, Lipshits MI, Popov, KE. Adaptation of postural control to weightlessness. *Exp. Brain. Res.* 1984; 57: 61-72.
20. Combaret L, Dardevet D, Rieu I, Pouch M, Béchet D, Taillandier D, Grizard J, Attaix D. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *J Physiol.* 2005;569:489-499.
21. Coutinho EL, Gomes AR, França CN, Oishi J, Salvini TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(12):1853-61.
22. Cox VM, Williams PE, Wright H, James RS, Gillott KL, Young IS, Goldspink DF. Growth induced by incremental static stretch in adult rabbit latissimus dorsi muscle. *Exp Physiol.* 2000; 85(2):193-202.
23. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr* 2005;135:376-382.
24. Day CS, Moreland MS, Steven Floyd S, JR., Huard J. Limb lengthening promotes muscle growth. *J. Orthop. Res.* 1997; 15:227-234.
25. De Deyne PG, Hayatsu K, Meyer R, Paley D, Herzenberg JE. Muscle regeneration and fiber-type transformation during distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 1999; 17(4):560-70.
26. De Deyne PG, Meyer R, Paley D, Herzenberg JE. The adaptation of perimuscular connective tissue during distraction osteogenesis. 2000; 379:259-269.
27. De Deyne PG, Kinsey S, Yoshino S, Jensen-Vick K. The adaptation of soleus and edl in a rat model of distraction osteogenesis: IGF-1 and fibrosis. 2002; 20:1225-1231.
28. Dunn SE, Simard AR, Prud'homme RA, Michel RN. Calcineurin and skeletal muscle growth. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(3):E46.
29. Edgerton VR, Barnard RJ, Peter JB, Maier A, Simpson DR. Properties of immobilized hindlimb muscle of the *Galago senegalensis*. *Exp. Neurol.* 1975; 46:115-131.



30. Feland JB, Myrer JW, Schulthies SS, Fellingham GW, Measom GW. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people aged 65 years or older. *Phys. Therapy.* 2001; 81(5): 1111-1117.
31. Fell RD, Gladden LB, Steffen JM, Musacchia XJ. Fatigue and contraction of slow and fast muscles in hypokinetic/hipodynamic rats. *J. Appl. Physiol.* 1985; 58(1):65-69.
32. Ferrando AA, Atuart CA, Brunder DG, Hillman GR. Magnetic resonance imaging quantitation of changes in volume during 7 days of strict bed rest. *Aviat. Space. Environ. Med.* 1995; 66(10): 976-981.
33. Fink B, Neuen-Jacob E, Madej M, Lienert A, Rütther W. Morphometric analysis of canine skeletal muscles following experimental callus distraction according to the Ilizarov method. *J Orthop. Res.* 2000;18:620-628.
34. Fulks RH, Li JB, Goldberg AL. Effects of insulin, glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragms. *J Biol Chem* 1975; 250:290-298.
35. Gajdosik RL. Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications. *Clinical Biomechanics.* 2001; 16:87-101.
36. Gamrin L, Berg HE, Essén P, Tesch PA, Hultman E, Garlick PJ, McNurlan MA, Wernerman J. The effect of unloading protein synthesis in human skeletal muscle. *Acta. Physiol. Scand.* 1998; 163: 369-377.
37. Garlick PJ. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *J Nutr.* 2005; 135: 1553S-1556S.
38. Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell. Biol.* 2003; 5:87-90.
39. Goldspink G. Sarcomere length during postnatal growth of mammalian muscle fibres. *J Cell Sci.* 1968; 3(4):539-48.
40. Goldspink G, Scutt A, Loughna PT, Wells DJ, Jaenicke T, Gerlach GF. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am. J Physiol.* 1992; 262:R356-363.
41. Goldspink DF. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1977; 264 (1):267-82.
42. Goldspink DF, Cox VM, Smith SK, Eaves LA, Osbaldeston NJ, Lee DM, Mantle D.. Muscle growth in response to mechanical stimuli. *Am. Physiol.* 1995; 264:288-297.
43. Goldspink G, William P e Simpson H. Gene expression in response to muscle stretch. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002; 403: S146-152.
44. Green SA, Horton E, Baker M, Utkan A, Caiozzo V. Distraction of skeletal muscle: evolution of a rat model In: Session 3: Muscle growth atrophy, and tissue engineering. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 2002; 403S:S126-S132.

45. Guth L, Samaha FL. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol*, 1969; 25: 138-63.
46. Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP, Kasuga M, Nishimoto I, Avruch J. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:26457-26463.
47. Hayatsu K, De Deyne PG. Muscle adaptation during distraction osteogenesis in skeletally immature and mature rabbits. *J. Orthop. Res.* 2001; 19:897-905.
48. Harjola V, Jankala H, Harkonen M. Myosin heavy chain mRNA and protein distribution in immobilized rat skeletal muscle are not affected by testosterone status. *Acta Physiol Scand.* 2000; 169(4):277-282.
49. Herbert RD, Balnave RJ. The effect of position of immobilization on resting length, resting stiffness and weight of the soleus muscle of the rabbit. *J. Orthop. Res. Society.* 1993; 11:358-366.
50. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissue. Parte I: The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. *Clin. Orthop.* 1989; 238:249-281.
51. Jarvinen M. Immobilization effects on the tensile properties of striated muscle: An experimental study in the rat. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1977; 58:123-127.
52. Jaspers SR, Tischler ME. Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscle in tail cast suspension. *J Appl Physiol* 1984; 57:1472-1479.
53. Junqueira LC e Carneiro J. *Histologia Básica*. 9o edição, Rio de Janeiro: Ed Koogan Guanabara, 1999.
54. Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II, and III by sirius red polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* .1978;41:267-274.
55. Kadowaki M, Kanazawa T. Amino acids as regulators of proteolysis. *J Nutr.* 2003;133:2052S-2056S.
56. Karpakka J, Väänänen K, Orava S, Takala TE. The effects of preimmobilization training and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle. *Int J Sports Med.* 1990; 11(6):484-488.
57. Kanbe K, Hasegawa A, Takagishi K, Shirakura K, Nafase M, Yanagawa T, Katsumi T. Analysis of muscle bionergetic metabolism in rabbit leg lengthening. 1998; 351:214-221.
58. Kierszenbaum AL. *Histologia e biologia celular, uma introdução a Patologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
59. Kimball SR and Jefferson LS. Control of protein synthesis by amino acid availability. *Urr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5:63-67.
60. Kimball SR and Jefferson LS. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(2):500S-507S.

61. Kobayashi H, Kato H, Hirabayashi Y, Murakami H, Suzuki H. Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophying rats. *J Nutr.* 2006; 136:234S-236S.
62. Kobayashi T, Goto K, Kojima A, Akema T, Uehara K, Aoki H, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T. Possible role of calcineurin in heating-related increase of rat muscle mass. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 17:331(4):1301-9.
63. Koh TJ. Do adaptations in serial sarcomere number occur with strength training? *Human Movement Science.* 1995; 14:61-77.
64. Lee DY, Choi IH, Chung CY, Chung PH, Chi JG, Suh YL. Effect of tibial lengthening on the gastrocnemius muscle. *Acta. Orthop. Scand.* 1993; 64 (6):688-692.
65. Li JB, Jefferson LS. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochim Biophys Acts.* 1978; 544:351-359.
66. Lieber RL. *Skeletal muscle structure and function.* Baltimore: William e Wilkins, 1992.
67. Lindboe CF, Fjeld TO, Steen H. Morphological changes in continuously stretched skeletal muscles in sheep. 1985;54:184-190.
68. Lindsey CA, Makarov MR, Shoemaker S, Birch JG, Buschang PH, Cherkashin AM, Welch RD, Samchukov ML. The effect of the amount of limb lengthening on skeletal muscle. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 2002; 402:278-287.
69. Lynch CJ, Hutson SM, Patson BJ, Vaval A, Vary TC. Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283(4):E824-35.
70. Makarov MR, Kochutina LN, Samchukov ML, Birch JG, Welch RD. Effect of rhythm and level of distraction on muscle structure. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 2001; 384:250-264.
71. Matano T, Tamai K, Kurokawa T. Adaptation of skeletal muscle in limb lengthening: A light diffraction study on the sarcomere length *in situ*. 1994; 12:193-196.
72. Mitch WE, Walser M, Sapir DG. Nitrogen Sparing induced by leucine compared with that induced by its keto analogue,  $\alpha$ -ketoisocaproate, in fasting obese man. *J Clin Invest.* 1981; 67:553-562.
73. Mizumoto Y, Mizuta H, Nakamura E, Takagi K. Distraction frequency and the gastrocnemius muscle in tibial lengthening. 1996; 67(6):562-565.
74. Muir AR, Kanji AH e Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J. Anat.* 1965, 99: 435-444.
75. Nair KS, Schwartz RG, Welle S. Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans. *Am J Physiol.* 1992; 263:E928-34.
76. Norkin CC e White DJ. *Measurement of joint motion: a guide to goniometry.* 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, Pa: Fa Davis Co, 1995.

77. Olson EN, Williams RS. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell*. 2000; 101 (7): 689-92.
78. Paley D. Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin Orthop*. 1990; 250:81-104.
79. Paley D, Tetsworth K. Percutaneous osteotomies. Osteotome and Gigli saw techniques. *Orthop Clin North Am*. 1991; 22(4):613-24.
80. Pette D, Staron RS. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1990;116:1-76.
81. Rosário JL, Marques AP e Maluf AS. Aspectos Clínicos do Alongamento: uma revisão da literatura. *Rev. Bras. Fisiot*. 2004; 8(1): 83-88.
82. Saltin B. Human skeletal muscle fibers – properties and function. *Lakartidningen*. 1977; 74(44): 3878-3883.
83. Salvini TF. Plasticidade e adaptação postural dos músculos esqueléticos. In: Marques AP. Cadeias musculares: um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global. Manole, São Paulo, 2000.
84. Sapir DG, Walser M. Nitrogen sparing induced in starvation by infusion of branched chain ketoacids. *Metab Clin Exp*. 1977;26:301-308.
85. Sandborn EB. Skeletal muscle. In: *Cells and tissues by light and electron microscopy*. London: academic Press, 1970; 296-309.
86. Scott W, Stevens J e Binder-Macleod AS. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys. Ther*. 2001; 81(11): 1810-1816.
87. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*. 2000; 103: 253-262.
88. Schultz E e McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 1994; 123: 213-257.
89. Shen XC e Aronson J. Changes in biochemical properties of muscle following tibial lengthening in the rat. In: *Proc 33th Ann Meet Orthopedic Res Soc, San Francisco, USA, 1993:379*.
90. Sherwin RS. Effect of starvation on the turnover and metabolic response to leucine. *J Clin Invest*. 1978; 61:1471-1481.
91. Simpson AH, Williams PE, Kyberg P, Goldspink G, Kenwright J. The response of muscle to leg lengthening. *J Bone Joint Surg Br*. 1995; 77(4):630-6.
92. Song YH, Godard M, Li Y, Richmond SR, Rosenthal N, Delafontaine P. Insulin-like growth factor I-mediated skeletal muscle hypertrophy is characterized by increased mTOR-p70S6K signaling without increased Akt phosphorylation. *J Investig Med*. 2005; 53(3):135-42.
93. Shilt JS, Deeney VF, Vincent F, Quinn CL. The effect of increase distraction frequency on soft tissues during limb lengthening in an animal model. 2000; 20(2):146-150.

94. Schultz E. Satellite cells behavior during skeletal muscle growth and regeneration. *Med Sci Sports Exerc.* 1985; 21(Suppl 5):181-186.
95. Szöke G, Lee SH, Simpson AHRW, Prescott J. Response of the tendon during limb lengthening. *J Bone Joint Surg.* 2005; 87B:583-87.
96. Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol.* 1972; 224(1):231-44.
97. Urabe T, Ichikawa T, Usuda S et al. Skeletal muscle response during gradual bone lengthening. *J Jpn Soc Surg Hand.* 1995;12:483-486.
98. Wilmore JH e Costill DL. *Fisiologia do exercício e do esporte.* São Paulo: Manole, 2001.
99. Williams PE. Effect of the intermittent stretch on immobilized muscle. *Annals. of the Rheumatic Diseases.* 1988; 47: 1014-1016.
100. Williams PE, Goldspink G. Longitudinal growth of striated muscle fibers. *J. Cell Sci.* 1971; 9:751-767.
101. Williams PE. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilized muscle. *Ann Rheum Dis.* 1990;49(5):316-317.
102. Williams P, Kyberd P, Simpson H, Kenwright J and Goldspink G. The morphological basis of increased stiffness of rabbit tibialis anterior muscles during surgical limb-lengthening. *J. Anat.* 1998;193:131-138.
103. Williams P, Simpson H, Kyberd P, Kenwright J and Goldspink G. Effect of rate distraction on loss of range of joint movement, muscle stiffness, and intramuscular connective tissue content during surgical limb-lengthening: a study in the rabbit. *The Anatomical* 1999;255:78-83.
104. Williams P, Simpson H, Kenwright J and Goldspink G. Muscle fibre damage and regeneration resulting from surgical limb distraction. *Cells Tissue Organs.* 2001; 169:395-400.
105. Williams PE, Goldspink G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibers. 1973; 116:45-55.
106. Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. *J. Anat.* 1978; 127:459-468.
107. Williams PE, Goldspink G. The effect of denervation and dystrophy on the adaptation of sarcomere number to the functional length of the muscle in young and adult mice. *J Anat.* 122 (Pt 2): 1976; 455-465.
108. Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat.* 1984;138(Pt2):343-350.

109. Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J. Anat.* 1988; 158: 109-114.
110. Williams PE, Hamish A, Simpson WR, Kyberd PJ, Kenwright J, Goldspink G. Structural changes in the rabbit tibialis anterior muscle following distraction of the tibia. *Basic & Applied Myology.* 1994; 4:431:437.
111. Williams P, Kyberd P, Simpson H, Kenwright J, Goldspink G. The morphological basis of increased stiffness of rabbit tibialis anterior muscles during surgical limb-lengthening. *J. Anat.* 1998; 193:131-138.
112. Williams P, Simpson H, Kyberd P, Kenwright J, Goldspink G. Effect of rate distraction on loss of range of joint movement, muscle stiffness, and intramuscular connective tissue content during surgical limb-lengthening: a study in the rabbit. *The Anatomical* 1999; 255:78-83.
113. Witzmann FA, Kim DH, Fitts RH. Recovery time course in contractile function of fast and slow skeletal muscle after hindlimb immobilization. *J Appl. Physiol.* 1982; 52(3):677-682.