

ASPECTOS BIOMECÂNICOS MUSCULARES
RELACIONADOS À ADMINISTRAÇÃO
EXPERIMENTAL DE CORTICOSTERÓIDE
SISTÊMICO

Elaine Caetano Silva

Dissertação apresentada à Interunidades Bioengenharia / Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José A. Baddini
Martinez

Ribeirão Preto
2002

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a Silva, Elaine Caetano
Aspectos biomecânicos musculares relacionados à
administração experimental de corticosteróide sistêmico /
Elaine Caetano Silva. -- São Carlos, 2002.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São
Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto
de Química de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2002.
Área Interunidades: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. José A. Baddini Martinez.

1. Corticosteróides. 2. Miopatia. 3. Biomecânica.
4. Ensaio de tração. 5. Análise histoenzimológica.
I.Título.

Agradecimentos

- A Deus e Jesus Cristo pelo meu aprendizado e evolução neste plano.
- Aos meus pais Genésio e Virginia e às minhas irmãs Marli e Márcia Maria, meu eterno agradecimento pelo apoio, incentivo e amor, fundamentais nesta etapa da minha jornada.
- Ao Prof. Dr. José A. Baddini Martinez, minha especial homenagem, pela credibilidade, confiança, ensinamentos e orientação na realização deste trabalho.
- Ao Dr. Antonio Carlos Shimano pelo interesse, dedicação e paciência.
- Ao Prof. Dr. Nilton Mazzer e à Profa. Marisa de Cássia R. Fonseca, pela oportunidade concedida ao meu crescimento profissional.
- Ao Prof. Dr. Luciano Neder e à Biomédica Maria Paula M. Scandar do laboratório de Neuropatologia pelos ensinamentos, apoio, paciência e importante colaboração na interpretação dos achados histológicos.
- À grande amiga Andréa Rossi Campos pela sua amizade, essencial e inestimável colaboração, tornando possível a realização de parte do trabalho.
- Aos técnicos do Biotério do Departamento de Clínica Médica, Adalberto, Maurício e Roni, pela intensa colaboração, dedicação e amizade.
- Aos técnicos do Laboratório de Bioengenharia, Francisco (Chico), Luiz Henrique e à funcionária Maria Teresinha pela importante colaboração e interesse na realização dos experimentos.
- Ao amigo Marcos M. Shimano pelo minucioso trabalho de digitação
- Aos técnicos Sebastião A. Mazzetto e Paulo Alves Júnior da Cirurgia Experimental da FMRP-USP, pela importante colaboração no desenvolvimento da técnica cirúrgica deste trabalho.
- Aos meus colegas de mestrado pelo coleguismo e aprendizado mútuo.
- À amiga Mariam M. Hussein, pelos ensinamentos no nivelamento da área e entendimento nos cálculos do trabalho.

- À grande amiga Amira M. Hussein, pela amizade em todos os meus passos nesta etapa.

- A todos aqueles que direta ou indiretamente tiveram uma parcela de participação, colaborando no desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Tipos de fibras musculares	2
<i>1.1.1 Fibras de Contração Lenta.....</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2 Fibras de Contração Rápida.....</i>	<i>3</i>
1.2 Diafragma	4
1.3 Gastrocnêmio	5
1.4 Miopatia por corticosteróides	6
1.5 Ensaio mecânico.....	13
<i>1.5.1 Ensaio mecânico de tração</i>	<i>13</i>
<i>1.5.2 Ensaio mecânico em tecidos moles.....</i>	<i>14</i>
2 OBJETIVO	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Sacrifício dos animais e obtenção dos músculos para estudos biomecânicos e análise histológica.....	22
<i>3.2.1 Preparo do diafragma</i>	<i>22</i>
<i>3.2.2 Preparo do gastrocnêmio</i>	<i>23</i>
<i>3.2.3 Ensaio mecânico de tração</i>	<i>25</i>
3.3 Análise histológica	32
<i>3.3.1 Análise morfológica</i>	<i>32</i>
3.4 Análise estatística.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Ensaio de tração do diafragma	37
<i>4.1.1 Tensão do Limite Máximo</i>	<i>38</i>
<i>4.1.2 Deformação do Limite Máximo</i>	<i>39</i>
<i>4.1.3 Tensão do Limite de Proporcionalidade.....</i>	<i>40</i>
<i>4.1.4 Deformação do Limite de Proporcionalidade</i>	<i>41</i>
<i>4.1.5 Módulo de elasticidade.....</i>	<i>42</i>
4.2 Ensaio de tração do gastrocnêmio	43
<i>4.2.1 Carga do Limite Máximo</i>	<i>44</i>
<i>4.2.2 Deformação do Limite Máximo</i>	<i>45</i>
<i>4.2.3 Carga do Limite de Proporcionalidade.....</i>	<i>46</i>
<i>4.2.4 Deformação do Limite de Proporcionalidade</i>	<i>47</i>
<i>4.2.5 Rigidez.....</i>	<i>48</i>
<i>4.2.6 Local de Ruptura.....</i>	<i>48</i>
4.3 Análise Histológica.....	49
<i>4.3.1 Músculo Diafragma</i>	<i>49</i>

4.3.2	<i>Músculo Gastrocnêmio</i>	54
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÕES	68
	ANEXOS	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Retirada dos corpos de prova e amostras para análise histológica. **A** - Obtenção de corpos de prova para ensaio de tração com auxílio de um paquímetro. **B** - Região de retirada das amostras no diafragma.....23
- FIGURA 2** – Músculo gastrocnêmio medial. **A** - Retirada da amostra para análise histológica da porção medial do ventre medial do músculo gastrocnêmio. **B** - Corpo de prova para ensaio mecânico com o ventre medial do músculo gastrocnêmio, mantido em sua origem **I** o terço distal do fêmur e **II** o terço proximal de tibia e fíbula.....24
- FIGURA 3** – Ensaio de tração do músculo diafragma. **A** - Sistema para o ensaio de tração do corpo de prova. Observe o relógio comparador para medida dos alongamentos, célula de carga e tração em sentido longitudinal **B** – Note o sistema de fixação e alinhamento do corpo de prova26
- FIGURA 4** – Demonstração dos cálculos das propriedades mecânicas do músculo diafragma: Tensão do limite máximo ($T_{m\acute{a}x}$), Deformação do limite máximo ($D_{m\acute{a}x}$); Tensão do limite proporcional (T_{prop}), Deformação do limite proporcional (D_{prop}); Módulo de elasticidade (inclinação da curva no limite de proporcionalidade);27
- FIGURA 5** – Sistema para o ensaio de tração do músculo gastrocnêmio medial. Observe o relógio comparador para medida dos alongamentos, célula de carga, sistema de fixação (garras), alinhamento do corpo de prova e tração em sentido longitudinal.29
- FIGURA 6** - Demonstração dos cálculos das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio medial: Carga máxima ($C_{m\acute{a}x}$), Deformação máxima ($D_{m\acute{a}x}$); Carga proporcional (C_{prop}), Deformação proporcional (D_{prop}); Rigidez (inclinação da curva no limite de proporcionalidade).....30
- FIGURA 7** – Valores médios e erro padrão da tensão do limite máximo dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.....38
- FIGURA 8** – Valores médios e erro padrão da deformação do limite máximo dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.....39
- FIGURA 9** – Valores médios e erro padrão da tensão do limite de proporcionalidade dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.....40
- FIGURA 10** – Valores médios e erro padrão da deformação do limite de proporcionalidade dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.....41
- FIGURA 11** – Valores médios e erro padrão do módulo de elasticidade dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.....42
- FIGURA 12** – Valores médios e erro padrão da carga do limite máximo dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.....44
- FIGURA 13** – Valores médios e erro padrão da deformação do limite máximo dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.....45
- FIGURA 14** – Valores médios e erro padrão da carga do limite de proporcionalidade dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.....46
- FIGURA 15** – Valores médios e erro padrão da deformação do limite de proporcionalidade dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.....47
- FIGURA 16** – Valores médios e erro padrão da rigidez do limite de proporcionalidade dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.....48
- FIGURA 17** – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo controle na reação Tricrômico de Gomori modificado (200x). Note o aumento da atividade da reação, pela coloração mais acentuada mostrando acúmulo de mitocôndrias na região subsarcolemal (setas).....49
- FIGURA 18** – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo controle na reação de ATPase (pH 9,4). (100x) Observe o padrão em mosaico a presença de fibras tipo I e tipo II (setas).....50

- FIGURA 19** – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental pela coloração Hematoxilina-Eosina(H&E). **A-** fibras em miofagocitose (100 x). **B-** necrose hialina (100x). **C-** Fibras em miofagocitose (200x).51
- FIGURA 20** – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental pela reação da NASBI (100x). Note a presença de miofibras com coloração mais intensa mostrando aumento da atividade da fosfatase ácida lisossomal (setas).....52
- FIGURA 21** – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental (reação de PAS) (400x).. Observe nas miofibras pela intensa coloração, o aumento do conteúdo de glicogênio (setas).....52
- FIGURA 22** – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental (reação de Oil red “O”) (200x). Note fibra com aumento da quantidade de lipídeos no sarcoplasma (seta)53
- FIGURA 23** – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental. **A-** reação de Tricrômico de Gomori modificado (400x). Observe o aumento da atividade da reação, pela coloração mais acentuada mostrando acúmulo de mitocôndrias na região subsarcolemal (fibras “ragged red”) (setas). **B-** reação de SDH (200x). Note pela coloração mais intensa a presença de fibras com aumento subsarcolemal da atividade da succinato desidrogenase (SDH) (setas).....54
- FIGURA 24** – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo controle. **A** – Hematoxilina & Eosina (H&E) (100x). **B** – Tricrômico de Gomori modificado (100x). Observe em **A** e **B** aspecto normal das fibras55
- FIGURA 25** – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo controle GC (reação de PAS) (100x). Note fibras com conteúdo normal de glicogênio.56
- FIGURA 26** – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do GC na reação de ATPase (pH 4,65).(40x). Note o predomínio das fibras do tipo I (escuras) em relação às fibras do tipo II (claras).....56
- FIGURA 27** - Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo experimental. **A** – Hematoxilina & Eosina (H&E) (100x). **B** – Tricrômico de Gomori modificado (100x). Observe em **A** e **B** Aspecto normal das fibras.....57
- FIGURA 28** – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo experimental (reação de PAS) (400x). Note pela coloração mais intensa a presença de algumas fibras com discreto aumento do conteúdo de glicogênio no sarcoplasma (setas).58
- FIGURA 29** – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo experimental (reação de Oil red “O”) (200x). Observe fibra com discreto aumento quantitativo do conteúdo de lipídeo no sarcoplasma (seta).....58
- FIGURA 30** – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo experimental (reação de SDH) (200x). Note pela coloração mais intensa ,a presença de raras fibras com aumento subsarcolemal da atividade da succinato desidrogenase (SDH).....59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores médios do peso dos animais, do diafragma e do gastrocnêmio.....	35
TABELA 2 – Valores médios das dimensões dos corpos de prova do diafragma.....	36
TABELA 3 – Valores médios das dimensões do músculo gastrocnêmio.....	36
TABELA 4 – Valores médios das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração dos corpos de prova do diafragma.....	37
TABELA 5 – Valores médios das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração do músculo gastrocnêmio.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	-hormônio adrenocorticotrófico
mg	-miligramas
CK	-creatina fosfoquinase
G	-gramas
mg/Kg	-miligramas por quilograma
coloração PAS	-coloração ácido Periódico de Schiff
cm/min	-centímetro por minuto
MHz	-megahertz
W/cm ²	-watt por centímetro quadrado
°C	-grau centígrado
mm	-milímetro
Kgf	-quilograma-força
mm/min	-milímetro por minuto
q	-teta
álcool 95° G	-álcool 95 graus Gay-Lussac
ATP	-Adenosina trifosfato
M	-Mol
mM	-miliMol
N/m ²	-Newton por metro quadrado
m/m	-metro por metro
N/m	-Newton por metro
J/m ³	-Joule por metro cúbico
N	-Newton
m	-metro

RESUMO

SILVA, E.C. (2002). *Aspectos Biomecânicos Musculares Relacionados à Administração Experimental de Corticosteróide Sistêmico*, Ribeirão Preto, 2002. 81p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

O objetivo deste estudo foi avaliar, através de ensaios de tração, os efeitos do desenvolvimento de miopatia metabólica secundária a administração de corticosteróide sobre propriedades biomecânicas dos músculos diafragma e gastrocnêmio medial de coelhos.

Foram estudadas 30 coelhas albinas adultas da raça Nova Zelândia, divididas em dois grupos de 15: Grupo Experimental (GE), que recebeu injeções subcutâneas de succinato sódico de 21 metil-prednisolona (Solumedrol®; Pharmacia - Up John N.N. / S.A. – Puurs - Bélgica) nas doses de 2 mg/kg/dia, e Grupo Controle (GC) que recebeu soro fisiológico a 0,9% por via subcutânea em volumes proporcionais. Ambos os grupos foram tratados durante 21 dias consecutivos.

Os ensaios de tração foram realizados utilizando uma Máquina Universal de Ensaio do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Para o hemi-diafragma esquerdo foram feitos 24 ensaios, 12 para o GE e 12 para o GC e excluídos 3 animais de cada grupo devido a problemas técnicos.

Para o gastrocnêmio medial esquerdo foram feitos 30 ensaios, sendo 15 no GE e 15 no GC

A análise histoenzimológica dos músculos hemi-diafragma e gastrocnêmio medial direitos foi feita em 3 coelhos do GE e 3 do GC.

O peso médio final dos animais no GE foi 3,6 Kg e no GC 4,0 Kg. A variação média percentual de peso final no GE foi - 8,4% e no GC 3,1%.

O valor médio de peso final do gastrocnêmio no GE foi 5,6g e no GC 7,0g.

Os valores médios de área, largura e espessura do gastrocnêmio no GE foram $2,4 \times 10^{-4} \text{m}^2$, 21,7 mm e 5,4 mm, respectivamente e no GC $2,8 \times 10^{-4} \text{m}^2$, 24,1 mm e 6,7 mm

Nos diafragmas os valores médios de tensão e deformação do limite máximo, tensão e deformação do limite de proporcionalidade e módulo de elasticidade no GE comparado ao GC utilizando o teste t de *Student* e teste de *Mann Whitney*, não mostraram diferenças estatisticamente significantes.

Nos gastrocnêmios os valores médios de carga máxima, carga e deformação do limite de proporcionalidade e rigidez no GE comparado ao GC, pelo teste t de *Student* não mostraram diferença estatística significativa. Porém, o valor médio de deformação máxima

no GE foi $26,63 \times 10^{-3} \text{m}$ e no GC $32,33 \times 10^{-3} \text{m}$, mostrando significância estatística entre os grupos através do teste t de *Student*. Quanto aos locais de ruptura, no GE, 9 foram no ventre muscular, 2 na porção miotendínea distal e 4 na origem e no GC 8 ocorreram no ventre muscular, 5 na porção miotendínea distal e 2 na origem.

Do ponto de vista histopatológico observamos que: a miopatia metabólica apresentou-se mais evidente nos diafragmas do GE; houve alterações metabólicas leves nos gastrocnêmios do GE e ocorreu aumento da succinato de desidrogenase (SDH) e Tricrômico de Gomori modificado nos diafragmas do GC.

Diante disto, concluímos que: 1) Os diafragmas não mostraram alterações de suas propriedades biomecânicas, nas fases plástica e elástica, apresentando a mesma capacidade de alongamento em ambos os grupos, suportando cargas semelhantes; 2) O músculo gastrocnêmio medial manteve suas características e capacidade de alongamento na fase elástica. Entretanto, o tratamento com esteróide, na fase plástica, levou a uma significativa redução do seu limite máximo de deformação, apresentando uma menor capacidade de alongamento, embora com mesma carga máxima do controle.

Palavras-chave: 1. Corticosteróides. 2. Miopatia. 3. Biomecânica. 4. Ensaio de tração. 5. Análise histoenzimológica. I. Título

ABSTRACT

SILVA, E.C. (2002). *Aspects of Muscular Biomechanics Related to Experimental Administration of Systemic Corticosteroids*, Ribeirão Preto, 2002. 81p. Dissertation (Master's Degree) Engineering School of São Carlos/Medicine School of Ribeirão Preto/Chemistry Institute of São Carlos, at University of São Paulo.

The aim of this study was to assess, using traction assays, the effects of the metabolic myopathy secondary to corticosteroids on biomechanical features of the diaphragm and the medial gastrocnemius muscles of rabbits.

The study was composed of 30 albino adult rabbits of the New Zealand breed, which were divided into 2 groups of 15: Experimental Group (EG), which received subcutaneous injections of sodium succinate of 21 methyl-prednisolone with doses of 2mg/Kg/day, and the Control Group (CG) which received subcutaneous Saline in proportional volumes. Both groups were treated during 21 consecutive days.

The traction assays were performed by applying the Universal Machine of Assays from the Bioengineering Laboratory at the Medical School of Ribeirão Preto - USP.

For the left hemi-diaphragm, 24 assays were performed, 12 for EG and 12 CG. Three animals from each group were excluded due to technical problems.

For the left medial gastrocnemius, 30 assays were done, 15 for the EG and 15 for CG. The histoenzymologic analysis of both the hemi-diaphragm muscles and the right mild gastrocnemius were performed in three rabbits of the EG, and 3 of the CG.

The final average weight for the animals in EG was 3,6Kg, and in the CG was 4,0Kg. The average percentage variation from the initial to the final weight for the EG was -8,4% and for the CG 3,1%.

The final average weight of gastrocnemius was 5,1g in the EG and 7,0g in the CG. The average value of the area width and thickness of the EG was $2,4 \times 10^{-4} \text{m}^2$, 21,7 mm and 5,4 mm, respectively, and for the CG $2,8 \times 10^{-4} \text{m}^2$, 24,1 mm and 6,7mm.

In the diaphragms, the average values of the tension and deformity in the maximum threshold, tension and deformity at the proportional threshold and elasticity module in the EG compared to the CG, through the *Student t* Test and the *Mann Whitney* test, presented no significant statistical differences.

In the gastrocnemius, average values of the maximum load, load and deformity within the threshold of proportions and stiffness in the EG compared to the CG, according to the *Student t* test, did not present a significant statistical difference.

However, the average values of maximum deformity were $26,63 \times 10^{-3}$ m in the EG and $32,33 \times 10^{-3}$ m in the GC, showing statistical significant difference between groups.

Concerning the locations of the rupture in the EG, 9 were in the muscle belly, 2 in the myotendinous distal junction, and 4 in the origin; in the CG the rupture occurred 8 times in the muscle belly, 5 in myotendinous distal junction and 2 in the origin.

From a histopathological view, we have observed that metabolic myopathy was presented clearly evident in the diaphragms of the EG; there were slight metabolic alterations in the gastrocnemius of the EG, and there was an increase of the succinic dehydrogenase (SDH) and modified Gomori Trichrome in the diaphragms of the CG.

In this manner, we conclude that: 1) The diaphragms didn't show alterations of their biomechanical properties, in elastic and plastic phases, showing the same elongation capacity in both groups, with equal loads; 2) The medium gastrocnemius muscles, kept their biomechanical features and elongation capacity in elastic phase. However, the steroid treatment lead to a significant decrease of the elongation capacity in the plastic phase, with maximal loads similar to the control group; 3) It was not found a relationship between histological evidences of metabolic myopathy and changes in the biomechanical properties of the studied muscles.

Key-words: 1. Corticosteroids. 2. Myopathy. 3. Biomechanics. 4. Traction assay. 5. Histoenzymologic analysis. I. Title

1 INTRODUÇÃO

Os músculos são os elementos do corpo humano com propriedades de encurtamento e alongamento que quando acionados, de forma voluntária ou involuntária, produzem o movimento dos segmentos corporais. Além disso, atuam no sentido de estabilizar as articulações (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 1999).

Os músculos unem-se aos ossos pelos tendões, os quais são estruturas contínuas com o tecido conjuntivo denso que envolve o músculo externamente constituindo a fáscia ou aponeurose. Esse tecido conjuntivo emite septos que ao penetrarem no interior do músculo o subdividem em fascículos ou feixes de fibras. Cada um destes feixes consiste em um conjunto de fibras, as unidades funcionais musculares. Cada fibra também subdivide-se em fibrilas, porém, do ponto de vista prático, esta subdivisão não tem valor, pois as fibrilas de uma fibra contraem-se conjuntamente.

Cada fibra muscular possui uma bainha elástica, o sarcolema, que contém em seu interior numerosos núcleos. Esta bainha confere à fibra propriedades que permitem seu alongamento e encurtamento. No interior das fibras musculares existem proteínas com propriedades contráteis, as miofibrilas, dispostas como unidades em paralelo as quais são ativadas por um nervo motor (LEVY, 1984).

Uma fibra nervosa ao perfurar o sarcolema forma uma placa terminal, dependente do sistema nervoso central, emitindo descargas elétricas, provocando as contrações musculares. Entre as fibras musculares há muitos vasos sanguíneos, assegurando a elas uma boa irrigação. Dentre os tecidos biológicos, o músculo é o mais plástico, caracterizando-se por sua capacidade de adaptação e de resposta a estímulos normais ou patológicos (ROSE ; ROTHSTEIN, 1982).

1.1 Tipos de fibras musculares

As fibras musculares esqueléticas possuem características heterogêneas que podem ser macroscopicamente diferenciadas pela coloração que apresentam. Assim, elas podem ser distinguidas como fibras vermelhas, brancas e intermediárias.

Apesar de inúmeros debates quanto ao método, terminologia e critérios para a classificação dos músculos esqueléticos, dois tipos distintos de fibras foram identificados e classificados quanto às suas características contráteis e metabólicas em fibras tipo I (fibras vermelhas), tipo IIb (fibras brancas) e tipo IIa (fibras intermediárias). Todos estes três tipos de fibras ou seja, tipo I, IIb e IIa encontram-se presentes na maioria da musculatura dos mamíferos (LEVY, 1984; KELLY ; RUBISTEIN, 1994).

1.1.1 Fibras de Contração Lenta

A energia para a contração das fibras de contração lenta é gerada a partir do sistema aeróbico. Estas fibras possuem: nível de atividade de miosina ATPase relativamente baixo, menor capacidade para manipular o cálcio, velocidade de contração reduzida e capacidade glicolítica menos desenvolvida, comparadas às fibras de contração rápida.

Engel (1962) e Stein ; Padykula (1962), em estudos empregando análises histoquímica e citológica em músculos periféricos de humanos e ratos demonstraram que as fibras de contração lenta têm uma quantidade significativa de mitocôndrias relativamente volumosas, altos níveis de mioglobina, presença de gotículas de lipídeos, grande conteúdo de enzimas oxidativas mitocondriais, tais como a desidrogenase succínica e citocromo oxidase. Assim, devido a estas características estas fibras foram denominadas fibras vermelhas e dependentes do metabolismo oxidativo.

Estas fibras são resistentes à fadiga, sendo apropriadas ao exercício aeróbico prolongado. Além disso, diferenças na capacidade oxidativa dos dois tipos de fibras é que

determinam a capacidade de fluxo sanguíneo através do músculo, sendo este em maior proporção nas fibras de contração lenta (MacARDLE ; KATCH ; KATCH., 1998).

1.1.2 Fibras de Contração Rápida

Estas fibras musculares, denominadas tipo II, são subdivididas em tipo IIa e IIb.

As fibras IIa em relação as tipo I e IIb têm diâmetro, volume mitocondrial e capacidade de gerar força intermediários, atividade da enzima ATPase e capacidade glicolítica altas, capacidade oxidativa média a alta, moderada a alta resistência a fadiga e atividade elétrica fásica.

No entanto, as fibras tipo IIb comparadas às fibras tipo I e IIa têm como características: grande diâmetro, atividade da enzima ATPase, capacidade glicolítica, resistência à fadiga e capacidade de gerar força altas, baixo volume mitocondrial, atividade da ATPase alta e atividade elétrica fásica. (MacARDLE ; KATCH ; KATCH, 1998).

Engel (1962) e Stein ; Padykula (1962), em estudos empregando análises histoquímica e citológica em músculos periféricos de humanos e ratos demonstraram que as fibras de contração rápida tem um conteúdo enzimático mitocondrial menor e elevada atividade da enzima fosforilase e outras enzimas sarcoplasmáticas. Assim, estas fibras, também denominadas tipo II, dependem de forma essencial de seus sistemas glicolíticos bastante desenvolvidos para transferir energia. Estes fatos explicam como estas fibras são ativadas em atividades rápidas e de curta duração, bem como em outras contrações vigorosas, onde a produção de energia depende quase que exclusivamente do metabolismo anaeróbio.

1.2 Diafragma

O diafragma é uma estrutura presente apenas nos mamíferos e em poucas espécies de pássaros (AGOSTONI ; SANT´AMBROGIO, 1970). Constitui-se no principal músculo da respiração, sendo responsável por 75% da alteração do volume torácico durante a respiração calma. Sua arquitetura tem o formato de uma cúpula e separa a cavidade torácica da abdominal (RUPPEL, 2000).

As fibras musculares diafragmáticas estão agrupadas em três porções: vertebral, costal e esternal. As fibras vertebrais originam-se das segunda e terceira vértebras lombares, ligamento arqueado medial (psoas) e lateral (quadrado lombar). As fibras costais têm origem ao lado e na margem superior das seis costelas inferiores, interdigitando-se com as fibras do transversal abdominal. A porção esternal tem origem na parte posterior do processo xifóide.

Gauthier ; Padykula (1966) em estudos citológicos, comparando o diafragma costal de diversos mamíferos, inclusive coelhos, demonstraram que este músculo é composto por três tipos de fibras. Assim, observaram que: (1) os animais de menor tamanho, como o rato, apresentavam diafragma de aspecto homogêneo, contendo em grande parte fibras de pequeno diâmetro, coloração vermelha, abundante conteúdo mitocondrial e gotículas de triglicérides; (2) nos animais de tamanho intermediário inclusive coelho e homem, o diafragma era mais heterogêneo, o diâmetro de suas fibras, conteúdo mitocondrial e gotículas de triglicérides eram intermediários entre os grupos de animais menores e maiores; (3) nos animais de maior tamanho predominou fibras de diâmetro maior, conteúdo mitocondrial baixo e gotículas de triglicérides esparsas ou ausentes

Green ; Reichmann ; Pette (1984) em experimento por microfotometria, analisaram a atividade da desidrogenase succínica (SDH) e a composição de fibras do diafragma costal em vários mamíferos com amplas diferenças na frequência respiratória. Observaram que a atividade média da desidrogenase: (1) não foi significativamente diferente nas fibras tipo I e

IIa dos animais estudados; (2) foi significativamente menor nas fibras IIb, comparada às fibras I e IIa no gato, cobaia, rato e coelho, enquanto no camundongo não houve diferença; (3) foi maior nas fibras tipo I no camundongo e rato, intermediária no coelho e cobaia e menor no gato. Quanto à composição de fibras do diafragma puderam observar que o diafragma do camundongo, o menor animal do experimento, apresentou 90% de fibras tipo II, enquanto que no cão, o maior animal do estudo, a composição foi de 70% de fibras tipo I. Para os demais animais examinados, o diafragma continha 60 a 70% de fibras tipo II.

A diferenciação metabólica do diafragma através da análise da atividade média da desidrogenase nas diferentes espécies, devido aos valores médios apresentados, demonstrou haver uma relação entre a frequência respiratória e o potencial oxidativo aeróbico dos vários tipos de fibras no diafragma dos animais estudados.

Várias doenças pulmonares podem alterar a ação do diafragma, por exemplo, no enfisema avançado ocorre aprisionamento de ar e hiperinsuflação pulmonar, com conseqüente deslocamento deste músculo para uma posição mais aplanada. Esta situação leva a uma diminuição de sua excursão vertical durante a inspiração, tornando sua ação menos eficaz, contribuindo para sua fraqueza. Deste modo, suas fibras costais acabam tracionando a porção torácica inferior para dentro, resultando num estreitamento da expansão torácica lateral e prejuízo da ventilação pulmonar (RUPPEL, 2000).

1.3 Gastrocnêmio

O gastrocnêmio é um músculo situado na face posterior da perna, em humanos desempenha uma função anti-gravitacional e, com ação fásica, contribui para a manutenção da postura ereta, e durante a marcha contrai-se de forma tônica.

Sréter ; Woo (1963), estudando em ratos a composição de fibras musculares, demonstraram que não houve uniformidade quanto à distribuição de fibras vermelhas e brancas no gastrocnêmio. Porém, a proporção de fibras brancas foi maior na parte externa do músculo, enquanto que na camada mais profunda predominaram as fibras vermelhas.

1.4 Miopatia por corticosteróides

Um dos principais grupos de hormônios esteróides é o glicocorticóide, secretado pela células da zona fasciculada da supra-renal, cuja síntese é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) secretado pela hipófise anterior. Os principais hormônios endógenos são a hidrocortisona e a corticosterona, os quais afetam o metabolismo dos hidratos de carbono e das proteínas (RANG ; DALE ; RITTER, 2001).

Os corticosteróides exercem atividade anti-inflamatória e imunossupressora, tendo se constituído numa valiosa arma terapêutica, freqüentemente usada no tratamento de doenças diversas tais como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, doenças intersticiais pulmonares, doenças colágeno-vasculares, vasculites sistêmicas, transplantes de órgãos, entre outras.

Alguns estudos em humanos e animais revelam que seu uso, seja por via oral ou parenteral, em altas doses ou por períodos de tempo prolongados, pode levar a miopatia dos músculos estriados (COOMES, 1965; FALUDI; GOTLIEB; MEYERS., 1966; D'AGOSTINO; CHIGA, 1966; AFIFI; BERGMAN, 1969; DEKHUIJZEN; DECRAMER, 1992).

Clínicamente pode-se observar o desenvolvimento de dois tipos distintos de miopatia: aguda e crônica.

A miopatia aguda é encontrada com pouca frequência (MacFARLANE; ROSENTHAL, 1977; VAN MARLE; WOODS, 1980; KNOX; MASCIE-TAYLOR; MUERS, 1986; WILLIANS *et al.*, 1988; SHEE, 1990).

Willians *et al.* (1988), num relato de dois casos de miopatia severa aguda, em pacientes asmáticos recebendo altas doses de corticosteróides, puderam observar: (1) desenvolvimento de fraqueza muscular generalizada e acometimento dos músculos respiratórios 5 a 7 dias após o uso de altas doses de hidrocortisona (250 mg) e dexametasona (30 mg/24h) no paciente 1 e betametasona (24 mg/24h) no paciente 2. (2) aumento marcante dos níveis séricos da enzima creatina fosfoquinase (CK), podendo ocorrer rabdomiólise; (3) biópsias musculares apresentando necrose focal e difusa, sem predileção por atrofia das fibras tipo IIb.

Shee (1990), estudou por análise retrospectiva, os fatores de risco para o desenvolvimento de miopatia em pacientes portadores de asma severa aguda. Após intubação endotraqueal os pacientes foram sedados continuamente e receberam terapia por nebulização de broncodilatadores e succinato sódico de hidrocortisona. Após a extubação, o corticóide em uso foi substituído por prednisolona. Foi observado o aparecimento de fraqueza muscular de todos os membros, afetando em alguns pacientes mais os membros superiores e em outros os membros inferiores, porém, o predomínio da fraqueza foi em extremidades proximais dos membros.

A comparação entre os sujeitos saudáveis e os miopáticos não mostrou diferença clara com relação a idade, sexo, tipo de droga usada, níveis séricos de potássio, tempo de ventilação mecânica e paralisia muscular, dose total de brometo de pancurônio ou doses médias diárias de hidrocortisona. A principal diferença entre os dois grupos foi na dose total de hidrocortisona, onde os pacientes miopáticos receberam doses maiores que 5,0 g e os outros, doses menores que 4,0 g.

Willians *et al.* (1988) relataram que a miopatia crônica foi o tipo mais frequente com o uso prolongado e em baixas doses de corticosteróides, apresentando fraqueza muscular

proximal e podendo envolver os músculos respiratórios; os níveis séricos de CK são normais ou levemente aumentados, sem mioglobinúria;. Puderam observar que esse tipo de miopatia teve maior incidência pelo uso de prednisona em doses acima de 40 mg/dia.

Estudos histológicos em músculos periféricos de humanos e animais, mostraram que em casos de miopatia crônica por esteróides ocorre atrofia seletiva das fibras tipo IIB (ASKARI ; VIGNOS ; MOSKOWITZ, 1976 ; MacLEAN ; CHURR., 1959 ; SMITH, 1964; VIGNOS ; GREENE, 1973 ; GARDINER ; EDGERTON., 1979).

Goldberg ; Goodman (1969), em seus estudos em ratos hipofisectomizados, provocaram fraqueza muscular por injeção de acetato de cortisona em altas doses durante 15 dias. Por secção do nervo ciático, provocaram desnervação dos músculos solear e plantar, aumentando o trabalho destes através da tenotomia do gastrocnêmio. Puderam observar: (1) diminuição do peso corporal dos animais; (2) fraqueza dos membros após 5 dias de uso de corticóide; (3) diminuição de aproximadamente 40% do peso do plantar, gastrocnêmio e tibial anterior, após 10 dias de injeção da droga, porém, sem perda significativa de peso do solear; (4) atrofia maior na porção superficial do gastrocnêmio (composta primariamente por fibras pálidas) em relação a parte profunda deste músculo (composta primariamente por fibras escuras); (5) musculatura mais escura nos animais do grupo experimental, sugerindo uma fraqueza das fibras; (6) os efeitos catabólicos da cortisona foram maiores no plantar desnervado; (7) diminuição dos efeitos catabólicos devido a hipertrofia produzida por trabalho.

Os autores concluíram que possivelmente, o efeito catabólico dos corticosteróides seria maior nos músculos com menor atividade de síntese protéica e ainda que, a fraqueza muscular presente nos músculos da coxa em pacientes deveria estar relacionada com o desuso.

Ellis (1956), em estudo experimental, estudou as alterações histológicas musculares em um grupo de coelhos recebendo injeções de acetato de cortisona em doses diárias de 10 mg/Kg, comparado a um grupo controle recebendo solução salina 0,9% em doses iguais por

um período de 7 a 25 dias. Após este período, foram analisados os tecidos musculares da pata dianteira, peitoral maior, grupos anterior e posterior da coxa, psoas maior, sacroespinhais, face abdominal do diafragma, língua, bexiga urinária e cólon. Após 21 dias ou mais de injeção de corticóide os animais do grupo experimental apresentaram músculos pálidos, leves e atróficos e ao exame microscópico havia necrose espalhada, fagocitose de resíduos e regeneração de fibras musculares. Houve ausência de alterações nos músculos cardíaco, involuntários da bexiga, vagina, trompas de falópio, cólon e camada média das artérias, bem como no grupo controle. Foi observado ainda que os animais do grupo corticóide sacrificados com 6, 12, 16, 21 e 22 semanas após a interrupção da droga, tiveram seus músculos na maioria das vezes histologicamente normais, com ausência de fibrose. A análise química dos músculos com necrose cortico-induzida revelou aumento na quantidade de água, lipídeo e sódio e redução na quantidade de potássio quando comparado ao grupo controle.

Coomes (1965), investigou o desenvolvimento de miopatia induzida por corticóide em humanos por meio de estudos eletromiográficos com medidas da duração média do potencial do músculo deltóide. Foi observado que: (1) no grupo controle, não houve nenhuma diferença significativa entre os potenciais registrados nas porções superficial e profunda do músculo estudado; (2) 20 pacientes portadores de artrite reumatóide, com ou sem evidência de doença no ombro ou cintura escapular, apresentaram a média de duração do potencial de ação, dentro da faixa da normalidade; (3) após submeter a exames 50 pacientes com artrite reumatóide e um com espondilite anquilosante, todos fazendo uso de prednisolona, a média de duração do potencial foi menor no grupo clinicamente classificado como portador de hipercorticismo severo; (4) a dose e o tempo de administração do corticosteróide não pareceram ter relação direta com a diminuição da duração média do potencial.

Faludi ; Gotlieb ; Meyers (1966), através de estudos histoquímicos em ratos, investigaram o desenvolvimento de miopatia nos músculos quadríceps, peitorais, músculo

cardíaco, bem como no fígado e baço. Os animais receberam injeções de altas doses de vários tipos de esteróides por quatro semanas. Ficou demonstrado que os animais dos grupos experimentais perderam peso, com exceção do grupo controle e os que receberam prednisolona; houve diminuição do peso do quadríceps em relação ao peso corporal total e diminuição não significativa do peso do peitoral comparado ao peso corporal. Do ponto de vista clínico, houve um acometimento maior dos músculos das extremidades posteriores, em especial do quadríceps.

Histologicamente, este mesmo estudo demonstrou uma diminuição na espessura das fibras de todos os músculos do grupo experimental, comparado ao grupo controle. O decréscimo foi menor nos grupos que receberam hidrocortisona e metilprednisolona e maior nos grupos parametasona e betametasona.

Os autores concluíram que: (1) todos os esteróides investigados induziram a miopatia; (2) as mudanças mais significantes ocorreram com os esteróides contendo radicais flúor (parametasona e betametasona); (3) a gravidade das mudanças musculares ocorridas dependeu da escolha da droga, tempo de terapia, dose aplicada e exercício.

D'Agostino ; Chiga (1966), em experimento feito em coelhos, estudaram o desenvolvimento de miopatia no diafragma, quadríceps, solear e gastrocnêmio, induzida por injeções de acetato de cortisona durante 14 dias. Ocorreram mudanças significativas nas fibras granulares (tipo I, B e C) dos músculos estudados, porém, estas alterações foram mais proeminentes no diafragma. Portanto, neste músculo foi observado envolvimento primário das fibras granulares; aumento no conteúdo de lipídeos; maior alargamento do diâmetro transversal com aumento aparente do conteúdo sarcoplasmático e mitocôndrias de aspecto bizarro. No entanto, o conteúdo de glicogênio mostrou acúmulo em ambas as fibras, granulares e agranulares.

Afifi ; Bergman (1969), estudaram em coelhos as alterações nos músculos solear, sartório, quadríceps femural, diafragma e coração induzidas pela injeção diária de acetato de cortisona numa dose de 10 mg/Kg. Os animais receberam a droga na extremidade inferior da

pata, sendo sacrificados em intervalos de 4, 8, 12 horas após a primeira injeção e 2 semanas após a interrupção de injeção diária por 14 dias a intervalos de 2, 4, 7, 9, 11, 15, 20, 23, 30, 37, 42 e 58 dias durante o período de recuperação. Neste estudo foram utilizados 3 animais controle, onde um foi sacrificado no início do experimento, um não tratado e outro recebendo injeção de solução salina foram sacrificados no final do experimento.

Os autores observaram que o processo da miopatia esteróide induzida, numa fase mais inicial apresentou prevalência de agregados massivos de glicogênio, com preservação da arquitetura da fibra muscular. Na fase tardia o acúmulo de glicogênio estava reduzido e foi caracterizado por quebra dos elementos contráteis, necrose, infiltrado celular e fagocitose. Unindo estas duas fases, uma fase intermediária foi melhor estudada por microscopia eletrônica mostrando alterações irreversíveis nas mitocôndrias, mudanças na linha Z e uma experiência produtiva na regeneração.

A análise microscópica deste estudo mostrou as seguintes alterações no diafragma: (1) quatro horas após a injeção de cortisona, a coloração PAS anormalmente marcada estava limitada a áreas de subsarcolema e cortes coloridos com azul de toluidina pareceram normais; (2) alterações significativas oito horas após a primeira injeção, em relação às observadas após quatro horas; (3) os cortes coloridos com azul de toluidina, 12 horas após a primeira injeção, mostraram uma fibra ocasional, com fragmentação do material contrátil na área do subsarcolema, enquanto cortes corados em PAS mostraram que as mesmas áreas tiveram coloração PAS intensamente positiva; (4) 24 horas da primeira injeção, as fibras estavam facilmente reconhecíveis e as alterações descritas anteriormente estavam localizadas principalmente na região do subsarcolema, mas muitas fibras permaneceram intactas; (5) dois dias após o tratamento houve uma distinta progressão do processo degenerativo, envolvendo muitas fibras. e uma extensão da área de predileção limitada ao subsarcolema para o envolvimento de toda a fibra; (6) três dias após o tratamento, muitas fibras estavam envolvidas em sacos vacuolares, com substituição do material contrátil por massas globulares densas, as quais reagiram intensamente com o ácido periódico de Schiff; (7)

quatro dias após, algumas das fibras severamente acometidas começaram a se desintegrar e sofreram fagocitose, enquanto outras menos afetadas mantiveram sua arquitetura geral e exibiram uma reação PAS intensa; (8) nenhuma diferença significativa no quinto e sexto dias, comparado ao observado 4 dias após o tratamento.

Van Balkon *et al.* (1996) estudaram no diafragma costal de 60 ratos, os efeitos provocados pela administração de metilprednisolona, via subcutânea, por 8 semanas. Os animais foram divididos em 4 grupos: Grupo C – receberam injeções diárias de solução salina; Grupo MP-C – receberam injeções diárias de corticóide; Grupo MP – A receberam injeções de corticóide, alternando com injeções de solução salina e Grupo MP-B – receberam pulsos de corticóide por 2 semanas, seguido de 4 semanas de solução salina e retornando com mais 2 semanas de corticóide. O músculo estudado foi submetido a estimulações tetânicas de 25, 160, 50, 160, 80, 160 e 120 Hz – 250 ms. Os resultados foram analisados através de análise imunohistoquímica, bioquímica e geração de força no diafragma costal. Foi observado em todos os grupos experimentais, redução na curva força-frequência e na área de secção transversal das fibras tipo I, IIX e IIB; a atividade glicogenolítica foi menos afetada no grupo MP-A, comparado ao grupo MP-C; diminuição da atividade da creatina quinase e capacidade β oxidativa no grupo MP-B comparado ao grupo MP-C; aumento da capacidade oxidativa em todos os grupos MP. Os autores concluíram que, embora os diferentes regimes de tratamento com metilprednisolona tenham afetado a morfologia e a atividade enzimática do diafragma de diferentes formas, a capacidade de gerar força diminuiu na mesma extensão em todos os grupos tratados.

1.5 Ensaio mecânico

Nos dias de hoje a Engenharia Biomédica, em suas várias formas de atuação, tem oferecido uma vasta contribuição para o desenvolvimento científico de áreas multiprofissionais da saúde, especialmente na Medicina e Reabilitação.

Esta união tem por objetivo, oferecer ao homem melhores condições de vida, saúde, recuperação anátomo-funcional e sobrevivência de maneira equilibrada (RAMOS, 1979). Entre inúmeras contribuições, a Engenharia tem fornecido importantes informações no tocante à avaliação das propriedades mecânicas dos materiais ou tecidos componentes do corpo humano, ou de materiais utilizados para substituir ou reparar os tecidos orgânicos. Na determinação do comportamento dos materiais ou tecidos quando submetidos a esforços têm sido utilizados ensaios mecânicos que podem ser de tração, torção, compressão, entre outros.

1.5.1 Ensaio mecânico de tração

Dentre os tipos de ensaios existentes, o de tração é considerado o mais importante devido a sua maior facilidade de execução e reprodutibilidade dos resultados. Consiste em submeter um material a um esforço que tende a alongá-lo, no sentido de promover deformação (SOUZA, 1982).

No ensaio de tração o material sofre a aplicação de forças externas crescentes, tomando-se o cuidado de alinhar bem o corpo de prova, para assegurar a aplicação do esforço na direção de seu eixo axial longitudinal. Durante o ensaio as deformações são medidas por meio de um extensômetro. Neste ensaio, as deformações promovidas no material, são uniformemente distribuídas em todo o corpo. A possibilidade de fazer com que a carga cresça lentamente durante o ensaio de tração, permite medir de maneira satisfatória a resistência do material (SOUZA, 1982). Para que os resultados obtidos sejam fidedignos é

necessário precisão dos aparelhos de medidas disponíveis, de acordo com normas e padronizações pré-estabelecidas (CHIAVERINI, 1979).

1.5.2 Ensaio mecânico em tecidos moles

Ensaio mecânico de tração têm sido utilizados para a investigação das propriedades mecânicas de ligamentos e músculos, submetidos a diferentes condições tais como na presença de lesões por esmagamento ou estiramento.

MacMaster (1933), estudou em coelhos adultos o complexo calcâneo-tendão calcâneo-gastrocnêmio-fêmur, a fim de determinar a resistência à tração. Foram observadas rupturas no ventre muscular e na junção miotendínea, tanto na origem ou na inserção do músculo, bem como fraturas com avulsão óssea. O tendão normal não apresentou ruptura, mesmo quando submetido à tensão extrema. Para que houvesse ruptura tendínea a uma grande tensão, metade de suas fibras já deveria estar rompida; para a ruptura ocorrer a uma tensão moderada, aproximadamente três quartos das fibras já deveriam estar rompidas. Nesse trabalho, entretanto, utilizou-se preparação osso-tendão-músculo avascular, onde ocorreu ruptura 5 semanas após a obstrução do suprimento sanguíneo e a força de estiramento não foi controlada.

Cronkite (1936), submeteu 294 tendões de cadáveres humanos a ensaio de tração. Esse autor constatou significantes variações na tensão de ruptura de diferentes tendões para um mesmo indivíduo, e do mesmo tendão para diferentes cadáveres.

Davidsson (1954), estudou em coelhos e gatos a resistência à tração da unidade músculo-tendão-osso. Foram observadas rupturas na origem muscular ou na inserção tendinosa, mas não no corpo tendíneo.

Welsh *et al.*(1971) em estudo experimental em coelhos, utilizaram tendões dos músculos plantar, flexor longo dos dedos, gastrocnêmio e solear. O estudo foi feito

empregando-se três sistemas: 1) sistema músculo-tendão-osso intacto, submetido à aplicação de carga a velocidades de 1,3 , 25,4 e 127 centímetro por minuto (cm/min); 2) sistema tendão-osso, submetido a testes semelhantes ao anteriormente citado; 3) somente tendão, submetido a um comprimento pré-determinado mantido constante. Os autores observaram, no sistema músculo-osso-tendão, ruptura muscular tanto no ventre quanto adjacente à origem. A aplicação de cargas com diferentes frequências mostrou pouca diferença na força requerida para romper o sistema, bem como quanto ao local de ruptura.

No sistema tendão-osso, foi observado que a 1,3 cm/min o tendão quebrou-se na inserção com pequenos fragmentos ósseos presentes; a 25,4 cm/min houve ruptura na inserção, porém, não associado à presença de fragmento ósseo; a 127 cm/min o tendão quebrou no local onde estava preso à máquina, permanecendo a junção tendão-osso intacta. No sistema apenas tendões, estes romperam no local onde estavam presos à máquina. Apesar do comprimento ter sido mantido constante, houve uma queda na carga necessária para manter o mesmo grau de extensão, denominada tensão de relaxamento. Porém, quando o tendão foi submetido a uma carga mantida constante, foi capaz de suportar uma mudança no comprimento, denominada deslizamento. Em ambas situações, o tendão comportou-se de maneira viscosa.

Garret *et al.* (1987) estudaram em coelhos as propriedades mecânicas do músculo extensor longo dos dedos em resposta ao estiramento, em estado passivo e estimulado eletricamente, o qual foi submetido a alongamentos rápidos até a ruptura. Os animais foram divididos em três grupos: Grupo 1- os músculos foram submetidos a um estímulo elétrico de 64 Hz; Grupo 2 – a estimulação foi a uma frequência de 16 Hz; Grupo 3 – não foram estimulados. Durante a fase de tetania, todos os músculos foram estirados até a ruptura. Evidenciou-se que: 1) a ruptura de todos os músculos ocorreu na porção miotendínea distal; 2) não houve diferença alguma no aumento do alongamento para a ruptura; 3) a energia absorvida foi 18% maior nos músculos estimulados tetanicamente, comparada à condição do

músculo em estado passivo. Foi concluído que as lesões musculares podem ocorrer quando os músculos são incapazes de resistir ao estiramento ou se adaptar a ele.

Nikolaou *et al.* (1987), investigaram o comportamento do músculo tibial anterior em coelhos, frente ao estiramento passivo provocado por 8% da força necessária para provocar ruptura do músculo contra-lateral. Os autores constataram a ocorrência de uma lesão muscular sem ruptura. Foi evidenciada, por meio de análise histológica, a lesão de um pequeno número de fibras musculares, próximas à junção mio-tendínea, com a instalação de reação inflamatória pronunciada 24 a 48 horas após o trauma inicial.

Noonan *et al.* (1994) empregaram os músculos extensor longo dos dedos e tibial anterior em um estudo experimental com coelhos. O objetivo foi identificar um limiar necessário para induzir lesão muscular provocada por estiramento passivo. Desta forma, utilizaram uma força entre 20 e 30% da força requerida para causar ruptura. Observaram, através de análises histológica e mecânica, que os músculos submetidos a estiramento até 30% da força de ruptura apresentavam, próximo à junção miotendínea, áreas com ruptura das fibras musculares, acompanhadas de hemorragias e diminuição das forças contráteis. Porém, os músculos submetidos a estiramento de até 20% da força de ruptura, não apresentaram alterações histológicas e mecânicas. Assim, os autores sugeriram a existência de um limiar para se induzir a lesão muscular por estiramento passivo.

Crisco *et al.* (1994) produziram lesão muscular em ratos por impacto no complexo muscular gastrocnêmio, solear e plantar. Após a lesão, fizeram observações histológicas, fisiológicas e mecânicas no mesmo dia e no 2^o, 7^o e 24^o dias. Os músculos mostraram uma perda significativa da função contrátil desde o dia da lesão até o 7^o dia, enquanto no 24^o dia ela voltou próxima do normal. Posteriormente, os animais foram sacrificados e em seguida realizada tração mecânica dos músculos em estudo.

O teste de tração realizado no 2^o dia, mostrou ruptura muscular no local das lesões. No 7^o dia, de quatro espécimes, dois tiveram ruptura no sítio da lesão e os outros dois ruptura na junção miotendínea distal. No 24^o dia, seis espécimes não apresentaram ruptura no local

da lesão. Nessa última ocasião a ruptura teve início na junção miotendínea distal ou proximal. Tais resultados evidenciaram que houve diminuição das rupturas ocorridas no sítio da lesão em função do tempo de cicatrização.

Mais recentemente em nosso meio Menezes (1997), empregou ensaios de tração em coelhos para analisar o efeito terapêutico da aplicação de ultra som em um modelo de lesão muscular aguda. Para tanto, realizava uma lesão por esmagamento no músculo reto anterior do quadríceps direito e esquerdo. Após três dias da lesão os animais foram tratados com ultra-som de onda pulsada, frequência de 1 MHz e intensidade de 0,5 W/cm² por 5 minutos, durante dez dias. O músculo contra-lateral serviu como controle, sofrendo apenas o esmagamento. Os animais foram sacrificados três dias após o término das aplicações e os músculos foram submetidos a ensaio de tração. Constatou-se que os músculos tratados com ultra-som apresentaram diferença significativa maior na deformação máxima, carga e deformação no limite de proporcionalidade, e na energia de deformação elástica. Assim, estes resultados sugeriram que o limite elástico do músculo migrou para valores maiores, capacitando-o em alongar-se mais e absorver mais energia e conseqüentemente tornou-o mais elástico devido ao padrão de deformação apresentado. A autora concluiu que a aplicação do ultra-som pode ser benéfica na melhora da qualidade da reparação da lesão muscular aguda.

Apesar do grande número de trabalhos realizados envolvendo ensaios de tração em tecidos moles, a utilização dessa metodologia é inédita na investigação dos efeitos dos corticosteróides sobre os tecidos orgânicos.

Carazzato *et al.* (1980), em estudo feito em ratos, investigaram as alterações histológicas e biomecânicas ocorridas pela infiltração local de corticóide e anestésico na junção miotendínea do tríceps sural. Os autores demonstraram que 24 horas após a aplicação do corticóide ocorreu necrose e sensível diminuição da resistência músculo-tendínea, tendo este efeito perdurado por duas semanas. No entanto, nenhuma alteração foi provocada pela infiltração local de xilocaína a 2% apenas.

Oxlund (1980) estudou em ratos os efeitos da injeção local de cortisol por 24 dias sobre as propriedades mecânicas do tendão fibular, ligamento cruzado posterior do joelho e pele do dorso. Foi observado que a injeção local de cortisol por 24 dias aumentou a força de tensão, carga máxima e rigidez do tendão fibular, sem alteração alguma do conteúdo de colágeno das amostras e reduziu a força de união óssea dos ligamentos. Assim pode observar (1) ruptura do ligamento cruzado posterior em dois locais de sua fixação óssea, com redução do valor da carga máxima; (2) na pele ocorreu redução da espessura e conteúdo de gordura; aumento na concentração de colágeno; maior força de tensão e energia absorvida. O autor concluiu que a injeção local de cortisol aumentou a força e rigidez dos tendões, porém, diminuiu a força de união ósteo-ligamentar e que a pele aumentou sua resistência no local distante das injeções.

Oxlund ; Manthorpe (1982) através de novos experimentos, agora em coelhos, investigaram as propriedades dos tendões dos músculos fibulares longo e curto, e pele da região lombar após a administração intramuscular prolongada de prednisolona. Os animais foram divididos em três grupos: (1) grupo controle; (2) grupo que recebeu prednisolona intramuscular na dose de 0,6 mg/Kg de peso corporal durante 63 dias; (3) grupo que sofreu restrição alimentar a partir do momento em que os animais perderam peso na mesma extensão que o grupo em uso de esteróide. Os autores evidenciaram no grupo tratado com esteróides redução do peso seco dos tendões, sem alterações do conteúdo de colágeno ou parâmetros de tensão e deformação, comparado ao grupo controle. Foi evidenciado ainda nesse grupo um aumento da rigidez dos tendões dos fibulares. Na pele houve diminuição do conteúdo de colágeno, da extensibilidade e da resistência. Os autores concluíram que o uso prolongado de esteróides por via intramuscular afeta a pele em grau mais pronunciado do que os tendões.

De tudo que foi exposto até o momento, fica claro que o uso de esteróides por longos períodos, ou altas doses, pode levar ao desenvolvimento de alterações miopáticas em diferentes músculos estriados, incluindo não somente componentes dos membros, como

também o principal músculo respiratório, o diafragma. Fica claro ainda, que os ensaios mecânicos, particularmente os de tração, são instrumentos de pesquisa válidos e úteis para a investigação das propriedades biomecânicas de músculos e tendões. Finalmente, as conseqüências biomecânicas do desenvolvimento de miopatia pelo uso sistêmico de esteróides têm sido motivo de quase nenhuma investigação. Isso é particularmente verdade para o diafragma, onde uma minuciosa revisão da literatura não encontrou nenhuma publicação voltada para a análise desses aspectos. Baseados nessas considerações, procuramos desenvolver uma pesquisa direcionada à avaliação dos efeitos do uso de esteróides em altas doses sobre as propriedades biomecânicas de um músculo periférico e do diafragma.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar, através do emprego de ensaios de tração, os efeitos do desenvolvimento de miopatia metabólica secundária a administração sistêmica prolongada de metilprednisolona em altas doses, sobre propriedades biomecânicas do diafragma e do músculo gastrocnêmio medial de coelhos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O estudo foi desenvolvido com 30 coelhas albinas adultas da raça Nova Zelândia fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram divididos em dois grupos de 15: Grupo Experimental (GE) que recebeu metil-prednisolona por via subcutânea e Grupo Controle (GC), mantido nas mesmas condições que o GE, porém tratado com solução salina.

Os animais permaneceram durante o período de tratamento no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo recebendo água e alimentação *ad libitum*. As coelhas eram recebidas no Biotério e, após um curto período de adaptação, aleatoriamente distribuídas para um dos dois grupos do estudo.

Os animais do GE receberam diariamente, no período da manhã, injeções subcutâneas de succinato sódico de 21 metil-prednisolona (Solumedrol®; Pharmacia - Up John N.N. / S.A. – Puurs - Bélgica) nas doses de 2 mg/kg/dia. As coelhas do GC foram igualmente injetadas com volumes correspondentes de soro fisiológico a 0,9%. Ambos os grupos foram tratados seqüencialmente durante 21 dias. Todos os animais foram pesados e submetidos a controle de ingesta em dias alternados, sendo então corrigidas as doses administradas de corticóide e solução salina.

3.2 Sacrifício dos animais e obtenção dos músculos para estudos biomecânicos e análise histológica.

Após completado o período de tratamento os animais foram transportados para o Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, onde sofreram eutanásia pela administração de doses letais de anestésico (Tiopental®).

3.2.1 Preparo do diafragma

Imediatamente após a eutanásia, os animais foram submetidos a uma laparotomia transversal, com exposição, dissecação e retirada de todo o diafragma pela sua face abdominal, com técnica semelhante à utilizada nos estudos de Boriek ; Rodarte (1994) e Van Balkon (1999). A seguir o diafragma foi pesado em uma balança digital marca Precision PR 500 e posteriormente estendido sobre uma placa de cortiça e preso em suas bordas por alfinetes, de tal forma que a visualização fosse feita pela sua face abdominal. Em seguida retirava-se uma amostra em corte transversal do hemi-diafragma direito, na borda de sua porção costal, a qual era fixada em nitrogênio líquido e conservada num freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a realização de estudos histológicos posteriores.

O hemi-diafragma esquerdo, ainda fixado à placa de cortiça, foi conservado a fresco com o uso de solução salina (MENEZES, 1997), até a retirada dos corpos de prova, imediatamente antes da realização do ensaio de tração. Utilizando-se uma lâmina de bisturi e um paquímetro Mitutoyo® foram retirados da porção costal do hemi-diafragma esquerdo dois fragmentos de tamanho aproximado, os quais foram mensurados quanto ao seu comprimento, largura e espessura (FIGURA 1), com técnica semelhante aos estudos de Kelsen ; Ference ; Kapoor (1985).

Foi feito um esforço para que a largura dos fragmentos musculares a serem utilizados como corpo de prova no ensaio de tração fossem retirados com uma largura próxima a 5 mm.

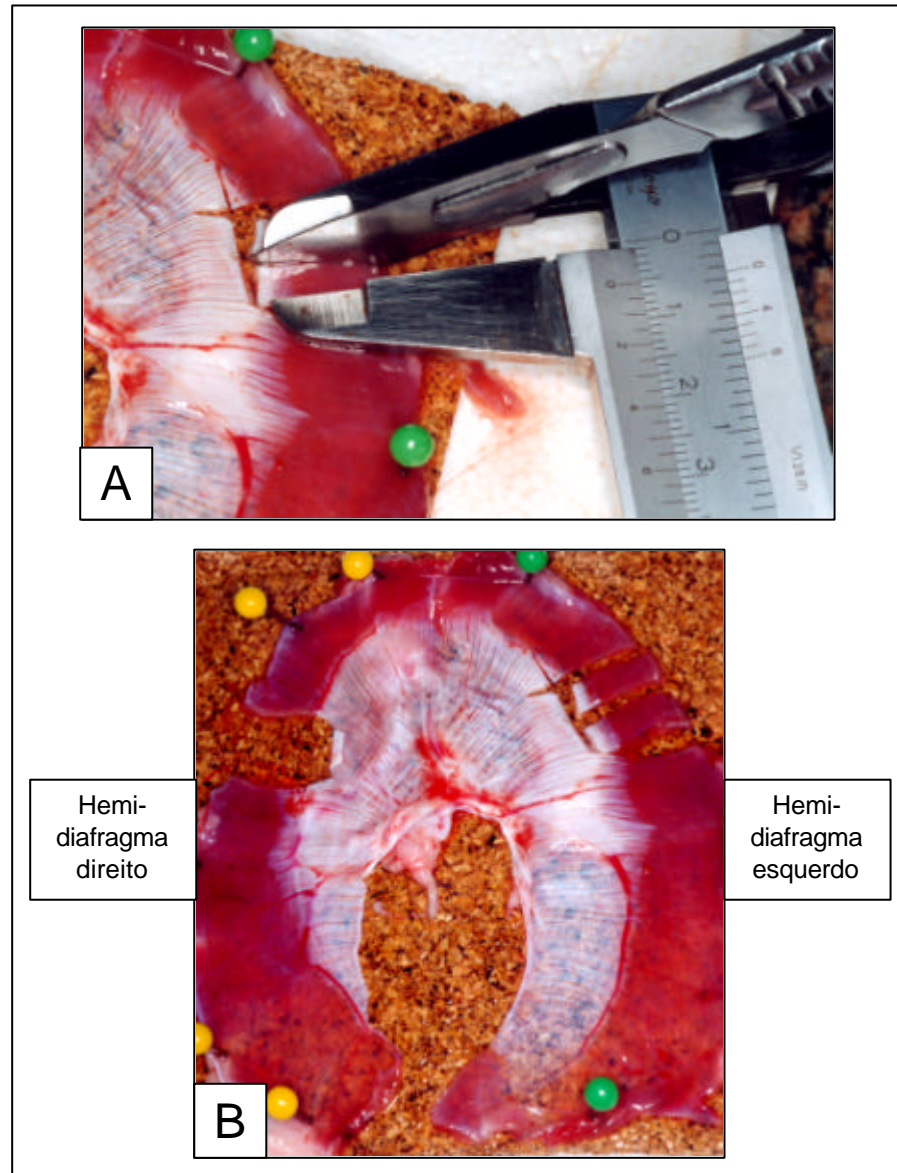


FIGURA 1 – Retirada dos corpos de prova e amostras para análise histológica. **A** - Obtenção de corpos de prova para ensaio de tração com auxílio de um paquímetro. **B** - Região de retirada das amostras no diafragma.

3.2.2 *Preparo do gastrocnêmio*

Concomitantemente à retirada do diafragma foi feita a retirada do gastrocnêmio, onde foram utilizadas técnicas do Laboratório de Bioengenharia. Foi feita uma incisão

cirúrgica longitudinal na pata direita do animal, com exposição do gastrocnêmio para a retirada de uma amostra de sua porção medial visando estudos histológicos. As biópsias obtidas foram imediatamente fixadas em nitrogênio líquido e conservadas num freezer a -70°C . Em seguida realizou-se uma incisão cirúrgica na pata contra-lateral para retirada da porção medial do gastrocnêmio esquerdo, a qual foi conservada a sua origem através da manutenção do terço distal do fêmur e terço proximal da tibia e fíbula, enquanto o tendão de Aquiles foi dissecado e retirado de sua inserção no calcâneo (FIGURA 2B), este modelo foi semelhante ao utilizado no estudo de CARVALHO (2001). O músculo gastrocnêmio medial foi igualmente conservado em solução salina a fresco até o instante do ensaio de tração (MENEZES, 1997). Precedendo ao ensaio de tração foi medido o comprimento circunferencial do ventre muscular através de um fio colocado circundando essa região. O comprimento e largura do ventre muscular foram igualmente medidos com o auxílio de um paquímetro Mitutoyo[®].

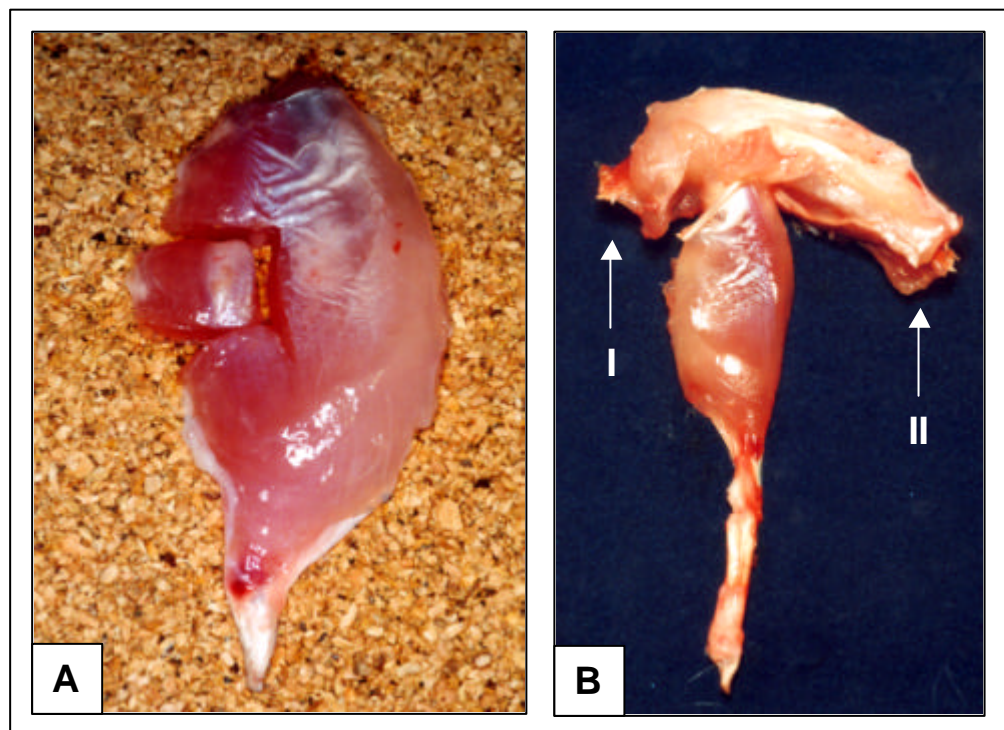


FIGURA 2 – Músculo gastrocnêmio medial. **A** - Retirada da amostra para análise histológica da porção medial do ventre medial do músculo gastrocnêmio. **B** - Corpo de prova para ensaio mecânico com o ventre medial do músculo gastrocnêmio, mantido em sua origem **I** o terço distal do fêmur e **II** o terço proximal de tibia e fíbula.

3.2.3 Ensaio mecânico de tração

Os ensaios mecânicos de tração foram realizados na Máquina Universal de Ensaio do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP em temperatura ambiente que foi mantida controlada em 25°C por sistema de ar condicionado. Nos ensaios foram utilizadas garras especiais para a fixação das amostras do diafragma e gastrocnêmio à máquina universal de ensaios (FIGURAS 3B e 5). Foi utilizada uma célula de carga (KRATOS®) com capacidade de medir cargas até 200 Kgf, associada a uma ponte de extensometria (SODMEX®). Para as medidas dos alongamentos foi utilizado um relógio comparador Mitutoyo® com precisão de 0,01 mm (FIGURA 3A e 5). Em cada animal foi realizado um único ensaio de tração para o músculo gastrocnêmio esquerdo e para cada um dos dois corpos de prova obtidos a partir do hemi-diafragma esquerdo. Na interpretação dos resultados referentes ao diafragma foram analisados os dados obtidos do ensaio de um único corpo de prova, aquele que havia se mostrado de melhor qualidade técnica.

3.2.3.1 Ensaio mecânico de tração dos corpos de prova do diafragma

Para o ensaio dos corpos de prova do diafragma, após a fixação e alinhamento do corpo de prova, foi estabelecida uma distância inicial entre as duas garras de 10 mm (FIGURA 3). Em seguida, foi dada uma pré-carga de 9 gramas durante um minuto, para acomodação do sistema, fazendo-se a leitura inicial da deformação e considerando-se a distância inicial a partir do valor da pré-carga estabelecida. Foi instituída uma velocidade constante de 5 mm/min para a realização do ensaio. Uma vez iniciada a realização do ensaio a carga aplicada foi registrada a intervalos de 0,5 mm de deformação, lendo-se simultaneamente no *display* sempre o valor da carga correspondente, até que se atingisse um valor máximo, ponto a partir do qual iniciava-se a queda nos valores de carga. A partir desse momento foram feitas, em média, 10 leituras adicionais.

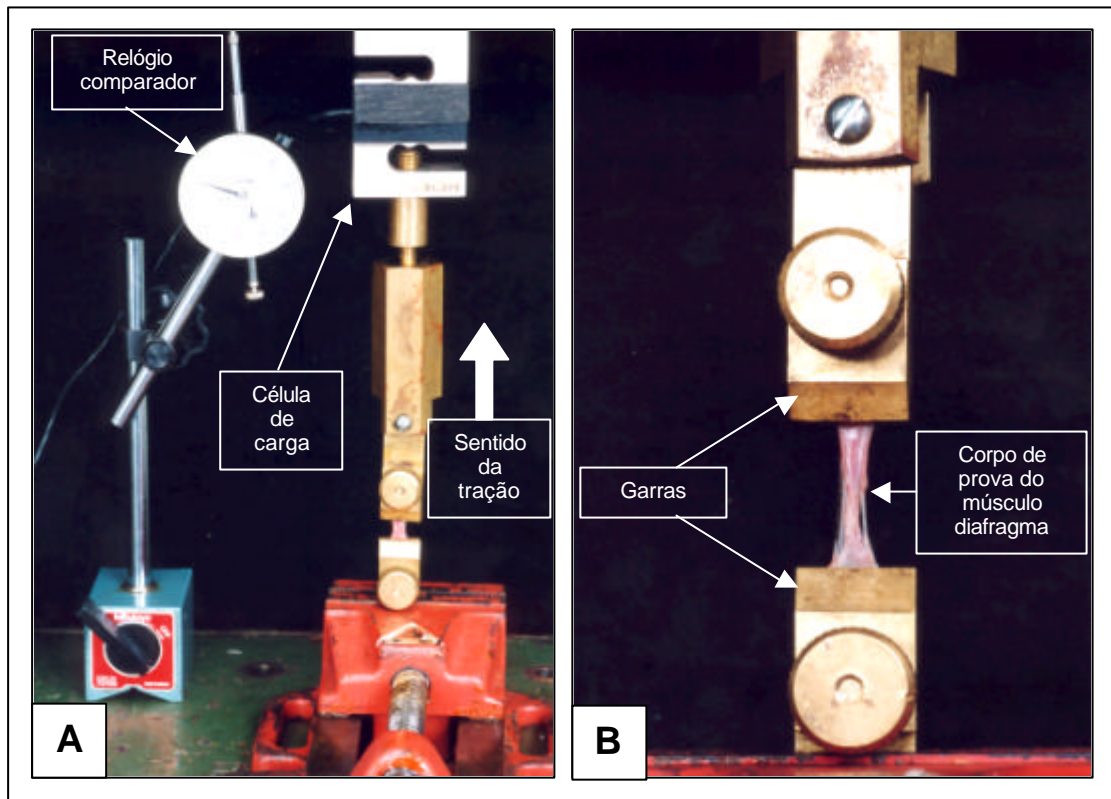


FIGURA 3 – Ensaio de tração do músculo diafragma. **A** - Sistema para o ensaio de tração do corpo de prova. Observe o relógio comparador para medida dos alongamentos, célula de carga e tração em sentido longitudinal **B** – Note o sistema de fixação e alinhamento do corpo de prova

A tensão aplicada foi calculada pela relação entre a força aplicada e a área dos corpos de prova. Assim, a partir dos valores das tensões e deformações obtidos de cada ensaio dos corpos de prova diafragmáticos foram confeccionados gráficos (Tensão \times Deformação) utilizando-se o programa EXCEL 7[®]. Nesses gráficos os seguintes parâmetros foram determinados: tensão e deformação do limite máximo, tensão e deformação do limite de proporcionalidade e módulo de elasticidade (FIGURA 4).

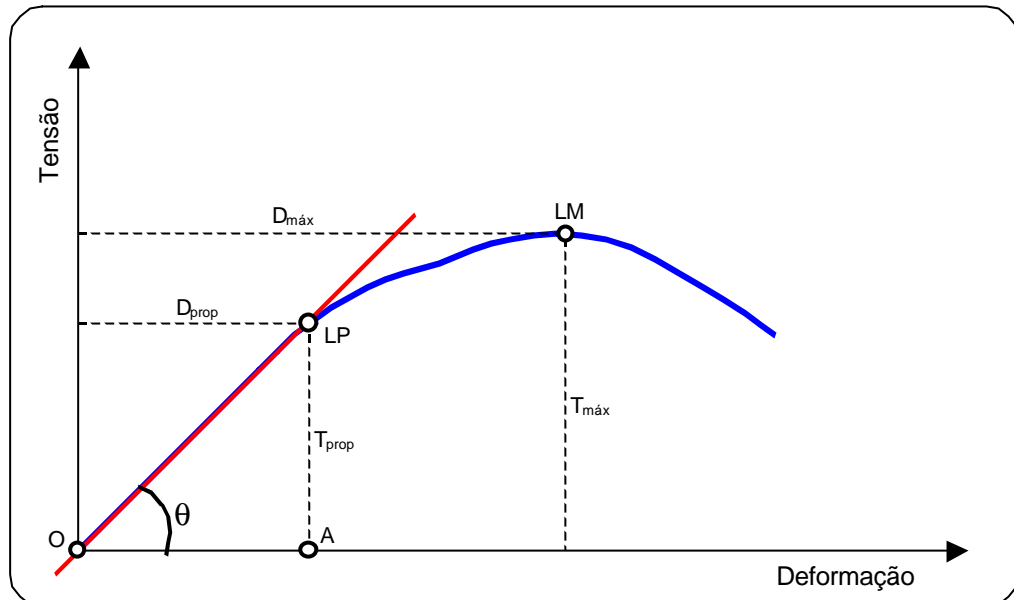


FIGURA 4 – Demonstração dos cálculos das propriedades mecânicas do músculo diafragma: Tensão do limite máximo ($T_{\text{máx}}$), Deformação do limite máximo ($D_{\text{máx}}$); Tensão do limite proporcional (T_{prop}), Deformação do limite proporcional (D_{prop}); Módulo de elasticidade (inclinação da curva no limite de proporcionalidade);

- Limite Máximo (LM)

É o ponto onde a curva tensão \times deformação apresentar o maior valor da tensão antes de ocorrer o rompimento.

- $T_{\text{máx}}$ – Tensão do limite máximo
- $D_{\text{máx}}$ – Deformação do limite máximo

- Limite de proporcionalidade (LP)

O limite de proporcionalidade de cada corpo de prova do diafragma, foi obtido tomando como referência o último ponto da reta de uma regressão linear do gráfico Tensão \times Deformação, caracterizando a fase elástica.

- T_{prop} – Tensão do limite de proporcionalidade
- $D_{\text{máx}}$ – Deformação do limite de proporcionalidade

- Módulo de elasticidade (E)

O módulo de elasticidade é determinado pela inclinação da curva tensão \times deformação, calculada pela tangente do ângulo \mathbf{q}

$$E = Tg\mathbf{q} = \frac{T_{\text{Prop}}}{D_{\text{Prop}}}$$

3.2.3.2 Ensaio mecânico de tração do gastrocnêmio

O músculo gastrocnêmio esquerdo foi fixado por um acessório especial, pela porção distal do fêmur, na sua extremidade superior, e pelo tendão de Aquiles na sua extremidade oposta (FIGURA 5). A distância inicial entre as garras foi estabelecida de acordo com o valor do comprimento de seu ventre. Em seguida foi dada uma pré-carga de 20 gramas durante 1 minuto para a acomodação do sistema, fazendo-se a leitura inicial da carga. A velocidade estabelecida, bem como os intervalos para o registro da carga aplicada e as leituras das deformações, do início ao término do ensaio, foram semelhantes ao ensaio do diafragma. Ao final do ensaio o ventre do gastrocnêmio ensaiado foi seccionado de sua origem e inserção e pesado em uma balança digital marca Precision[®] PR 500 (KELSEN ; FERENCE ; KAPOOR., 1985).

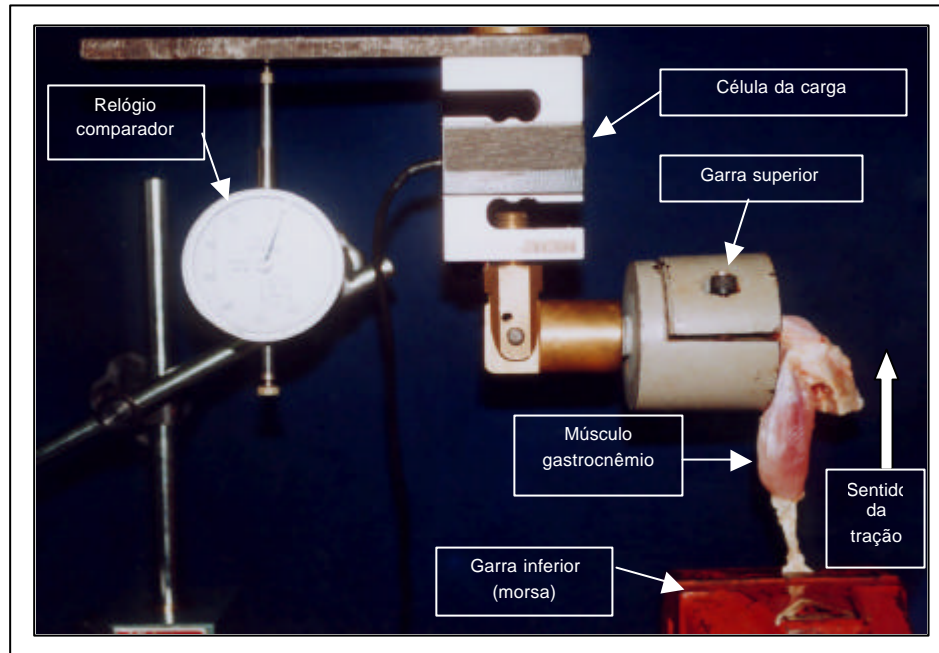


FIGURA 5 – Sistema para o ensaio de tração do músculo gastrocnêmio medial. Observe o relógio comparador para medida dos alongamentos, célula de carga, sistema de fixação (garras), alinhamento do corpo de prova e tração em sentido longitudinal.

A partir dos valores de cargas e deformações obtidos de cada ensaio do músculo gastrocnêmio, foram confeccionados gráficos (carga aplicada *versus* deformação) utilizando-se o programa EXCEL ⁷. Nestes gráficos, os seguintes parâmetros foram determinados: carga e deformação máximas, carga e deformação do limite de proporcionalidade e rigidez (FIGURA 6).

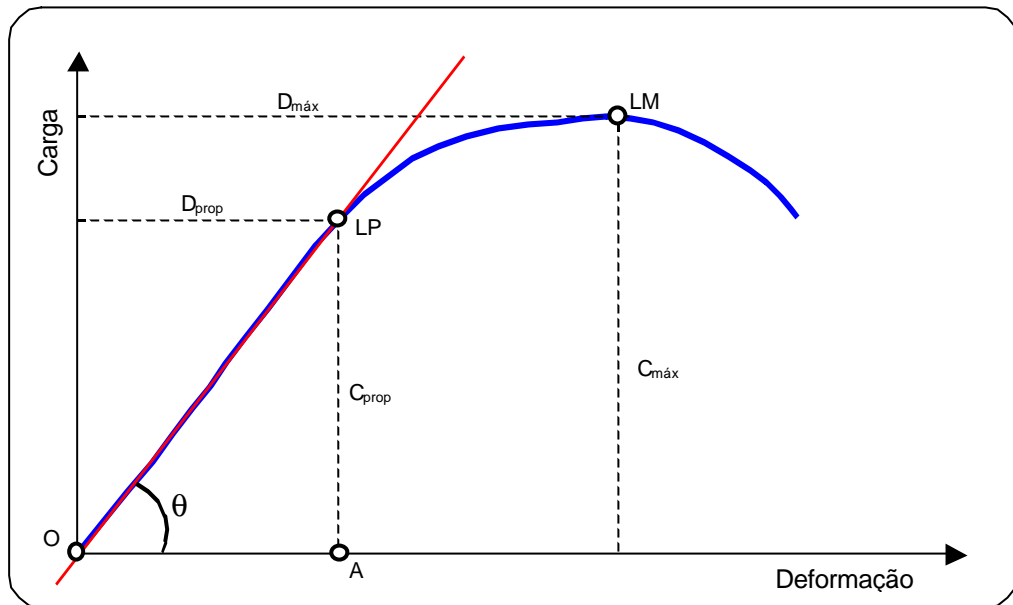


FIGURA 6 - Demonstração dos cálculos das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio medial: Carga máxima ($C_{máx}$), Deformação máxima ($D_{máx}$); Carga proporcional (C_{prop}), Deformação proporcional (D_{prop}); Rigidez (inclinação da curva no limite de proporcionalidade)

- Limite Máximo (LM)

É o ponto onde a curva carga \times deformação apresentar o maior valor da carga antes de ocorrer o rompimento.

- $C_{máx}$ – Carga do limite máximo
- $D_{máx}$ – Deformação do limite máximo

- Limite de proporcionalidade (LP)

O limite de proporcionalidade de cada amostra do gastrocnêmio, foi obtido tomando como referência o último ponto da reta de uma regressão linear do gráfico Carga \times Deformação, caracterizando a fase elástica.

- C_{prop} – Carga do limite de proporcionalidade
- D_{prop} – Deformação do limite de proporcionalidade

- Rigidez (R)

Determinada pela inclinação da curva carga \times deformação, calculada pela tangente do ângulo \mathbf{q} da reta que representa a inclinação da curva

$$R = \text{Tg } \mathbf{q} = \frac{C_{\text{Prop}}}{D_{\text{Prop}}}$$

3.3 Análise histológica

Todo o processamento e análise histoenzimológica dos músculos foi realizado no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob coordenação do Prof. Dr. Luciano Neder. Foram analisados os músculos diafragma e gastrocnêmio medial de 3 coelhos do grupo experimental (GE) e 3 do grupo controle (GC).

Os fragmentos dos músculos foram cortados em criótomo (Harris[®], mod. CTD da *International Equipment Company* – USA), sendo obtidos cortes com espessura de 5 µm. Os fragmentos dos músculos foram colocados sobre lâminas histológicas de 20x20 mm e expostos ao ar para desidratação. Em seguida, o material foi mantido em baixa temperatura (-70 °C) para a adesão dos cortes sobre lamínulas durante a noite. No dia seguinte foi iniciado o processamento das reações histoenzimológicas.

O processamento do material seguiu a rotina do laboratório, sendo utilizado a seguinte metodologia (IVERZUT, 1999): congelamento dos fragmentos em nitrogênio líquido e criotomia para as reações histoquímicas e histoenzimológicas (DEKHUIJZEN et al., 1993): Hematoxilina – Eosina (H&E), Tricrômico de Gomori modificado, Oil Red “O” em propileno glicol, ácido Periódico de Schiff (PAS), PAS + α-amilase salivar, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida Tetrazolium Redutase (NADH – TR), succinato de desidrogenase (SDH), Naftol AS-BI Fosfatase (NASBI-PA) e Adenosina Trifosfatase Miofibrilar (mATPase) nos pHs 9,4; 4,93 e 4,65.

3.3.1 Análise morfológica

Na coloração H&E foram avaliados os aspectos morfológicos genéricos do tecido muscular, procurando observar nas miofibras as seguintes alterações: diferença do tamanho e

da forma das fibras, presença de degeneração e regeneração, infiltrado inflamatório, alterações estruturais e fibrose endomisial dentre outras.

Pela coloração de Tricrômico de Gomori modificado foi avaliada a presença ou não de acúmulos de mitocôndrias, tanto na periferia, como no sarcoplasma. As colorações PAS com ou sem diastase (glicogênio) e Oil red "O" (gordura), foram avaliadas quantitativamente.

Pelas reações de SDH e NADH-TR, foram avaliadas acúmulos de mitocôndrias e a distribuição das miofibrilas ou irregularidades nesta distribuição, respectivamente.

Para cada caso, foi realizada uma descrição morfológica do músculo avaliado (diafragma e gastrocnêmio) e das alterações qualitativas presentes nas reações histoenzimológicas.

A caracterização das fibras musculares em tipo I e tipo II foi possível através da identificação da enzima ATPase miofibrilar (mATPase, E.C.3.6.1.3.) pré-incubada em meio ácido e alcalino. A análise qualitativa e quantitativa de cada grupo permitiu a distinção dos diferentes tipos de fibras. A intensidade de coloração foi subjetivamente classificada em forte (+++), fraca (+) ou ausente (-) para todos os casos, em função da possibilidade de variação da coloração com o tempo após o óbito do animal. Para a caracterização de grupamento de fibras, foi estabelecido um número mínimo de 20, desde que observados para ambos os tipos de fibras. Foi também avaliada a existência ou não do predomínio de um determinado tipo de fibra, sendo esta uma avaliação subjetiva e apenas considerada quando evidenciada claramente ao microscópio. Nos casos em que houve dúvidas quanto ao predomínio de um ou outro tipo de fibra, foi feita a contagem do número das fibras tipo I e II, sendo estabelecido o predomínio somente quando a contagem revelou mais de 60% de um ou outro tipo de fibra, nos campos analisados.

3.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos na forma de medianas, médias e erro-padrão. Em todas os testes foi estabelecido como nível para rejeição da hipótese de nulidade um valor igual ou inferior a 5% ($p \leq 0,05$).

As comparações que atingiram diferenças estatisticamente significantes foram assinaladas com um asterisco (*) quando o estudo dos dados foi efetuado pelo teste *t de Student* para dados pareados e com dois asteriscos (**) quando os dados foram analisados pelo teste de *Mann Whitney* para dados não pareados.

4 RESULTADOS

Os valores médios do peso inicial, final, variação percentual do peso e pesos do diafragma e do gastrocnêmio, dos animais dos grupos experimental (GE) e controle (GC) estão representados na TABELA 1.

TABELA 1 – Valores médios do peso dos animais, do diafragma e do gastrocnêmio.

<i>Grupo</i>		<i>Peso inicial (Kg)</i>	<i>Peso Final (Kg)</i>	<i>Varição Percentual (%)</i>	<i>Peso do Diafragma (g)</i>	<i>Peso do Gastrocnêmio (g)</i>
<i>Experimental</i>	<i>Média</i>	3,9	3,6*	-8,4**	6,3	5,6*
	<i>E.P.</i>	0,1	0,1	2,1	0,3	1,1
	<i>Mediana</i>	3,9	3,5	-6,5	6,0	5,5
<i>Controle</i>	<i>Média</i>	3,9	4,0	3,1	6,5	7,0
	<i>E.P.</i>	0,1	0,1	0,9	0,2	1,3
	<i>Mediana</i>	3,8	4,0	3,2	6,4	6,6

* significativamente diferente do Grupo Controle pelo teste *t de Student*

** significativamente diferente do Grupo Controle pelo Teste de *Mann Whitney*

A comparação do peso inicial entre os dois grupos mostrou que não houve diferença estatística significativa. Por outro lado, a análise comparativa do peso final mostrou que o GE apresentou um peso médio significativamente inferior ao do GC ($p=0,004$) (TABELA 1).

A variação média percentual de peso final em relação ao peso inicial foi de $(-8,4\% \pm 2,1)\%$ para o GE e de $(+3,1 \pm 0,9)\%$ para o GC. A comparação entre esses valores demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$).

O valor médio da ingesta diária de ração dos animais durante o período de tratamento no GE foi $(61,9 \pm 4,4)\text{Kg}$ e no GC foi $(59,3 \pm 3,0)\text{Kg}$, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

Os valores médios do peso do diafragma no momento do sacrifício não diferiram entre os grupos, porém o valor médio de peso do gastrocnêmio do GE foi significativamente inferior ao do GC ($p = 0,005$).

Os valores médios da área, comprimento, largura e espessura dos corpos de prova do diafragma e do gastrocnêmio encontram-se nas TABELAS 2 e 3.

TABELA 2 – Valores médios das dimensões dos corpos de prova do diafragma.

<i>Grupo</i>		<i>Área</i> ($\times 10^{-6} \text{ m}^2$)	<i>Comprimento</i> (mm)	<i>Largura</i> (mm)	<i>Espessura</i> (mm)
<i>Experimental</i>	<i>Média</i>	9,2	17,1	5,0	1,9
	<i>E.P.</i>	0,9	0,7	0,1	0,1
	<i>Mediana</i>	8,5	17,0	5,0	2,0
<i>Controle</i>	<i>Média</i>	7,1	16,0	4,8	1,5
	<i>E.P.</i>	0,6	0,4	0,2	0,1
	<i>Mediana</i>	7,0	16,0	5,0	1,5

TABELA 3 – Valores médios das dimensões do músculo gastrocnêmio.

<i>Grupo</i>		<i>Área</i> ($\times 10^{-4} \text{ m}^2$)	<i>Comprimento</i> (mm)	<i>Largura</i> (mm)	<i>Espessura</i> (mm)
<i>Experimental</i>	<i>Média</i>	2,4*	65,2	21,7*	5,4**
	<i>E.P.</i>	0,1	1,7	0,5	0,3
	<i>Mediana</i>	2,5	64,0	22,0	6,0
<i>Controle</i>	<i>Média</i>	2,8	63,3	24,1	6,7
	<i>E.P.</i>	0,2	0,9	0,6	0,2
	<i>Mediana</i>	2,7	64,5	24,0	7,0

* - significativamente diferente do Grupo Controle pelo Teste *t de Student*

** - significativamente diferente do Grupo Controle pelo Teste de *Mann Whitney*

Os valores médios da área, comprimento, largura e espessura dos corpos de prova do diafragma não diferiram entre os grupos.

Os valores médios de área, largura e espessura do gastrocnêmio do GE foram significativamente inferiores ao do GC, apresentando valores de $p=0,05$, $p=0,006$ e $p=0,002$

respectivamente. Os valores médios do comprimento do gastrocnêmio não diferiram entre os grupos.

4.1 Ensaio de tração do diafragma

Para o diafragma foram feitos 24 ensaios, sendo 12 do GE e 12 do GC. Devido a problemas técnicos foram excluídos 3 animais de cada grupo, sendo que destes, 3 corpos de prova apresentaram comprimento insuficiente para realização do ensaio e em outras 3 ocasiões ocorreu soltura das garras durante o ensaio.

As propriedades mecânicas do diafragma estão apresentadas na TABELA 4.

TABELA 4 – Valores médios das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração dos corpos de prova do diafragma.

<i>Grupo</i>		<i>Limite Máximo</i>		<i>Limite Proporcional</i>		<i>Módulo de elasticidade</i> ($\times 10^5$) N/m
		<i>Tensão</i> ($\times 10^5$) N/m ²	<i>Deformação</i> (m/m)	<i>Tensão</i> ($\times 10^5$) N/m ²	<i>Deformação</i> (m/m)	
<i>Experimental</i> (<i>n=12</i>)	<i>Média</i>	4,45	0,33	3,50	0,20	14,95
	<i>E.P.</i>	0,39	0,03	0,33	0,03	1,65
	<i>Mediana</i>	4,73	0,31	3,83	0,16	16,30
<i>Controle</i> (<i>n=12</i>)	<i>Média</i>	4,37	0,31	3,20	0,18	16,33
	<i>E.P.</i>	0,31	0,03	0,28	0,03	1,81
	<i>Mediana</i>	4,21	0,28	3,28	0,18	14,80

4.1.1 Tensão do Limite Máximo

O valor médio de tensão do limite máximo para o GE foi $(4,45 \pm 0,39) \times 10^5 \text{N/m}^2$ e para o GC foi $(4,37 \pm 0,31) \times 10^5 \text{N/m}^2$. A comparação entre os dois grupos mostrou que não houve diferença estatística significativa (FIGURA 7).

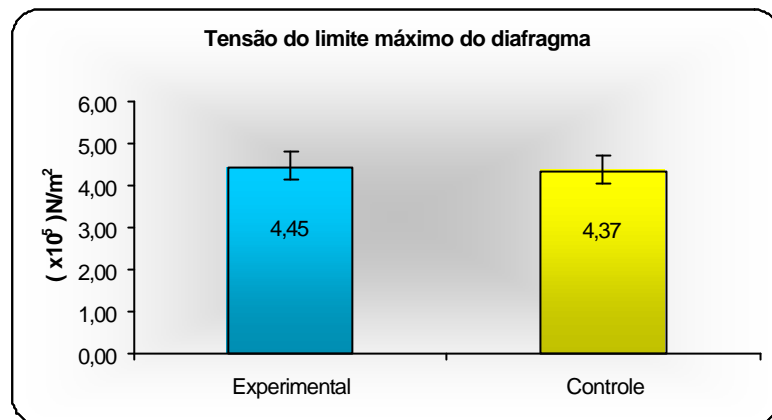


FIGURA 7 – Valores médios e erro padrão da tensão do limite máximo dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.

4.1.2 Deformação do Limite Máximo

O valor médio de deformação do limite máximo no diafragma para o GE foi $(0,33 \pm 0,03)\text{m/m}$ e para GC foi $(0,31 \pm 0,03)\text{m/m}$. A comparação entre os dois grupos mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa (FIGURA 8).

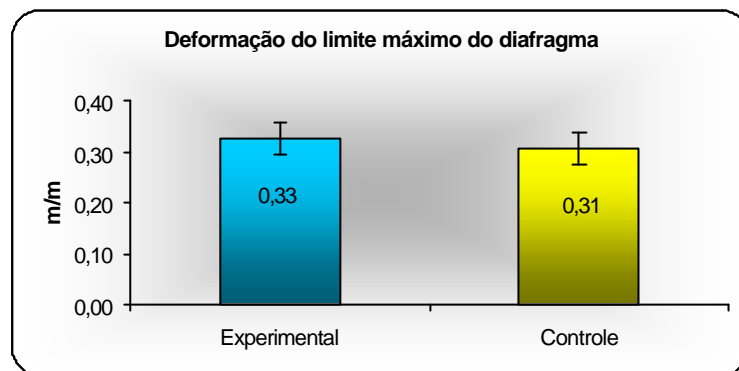


FIGURA 8 – Valores médios e erro padrão da deformação do limite máximo dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.

4.1.3 Tensão do Limite de Proporcionalidade

O valor médio de tensão aplicada do limite de proporcionalidade do diafragma para o GE foi $(3,50 \pm 0,33) \times 10^5 \text{N/m}^2$ e para o GC foi $(3,20 \pm 0,28) \times 10^5 \text{N/m}^2$. A comparação entre os dois grupos não mostrou diferença estatística significativa (FIGURA 9).

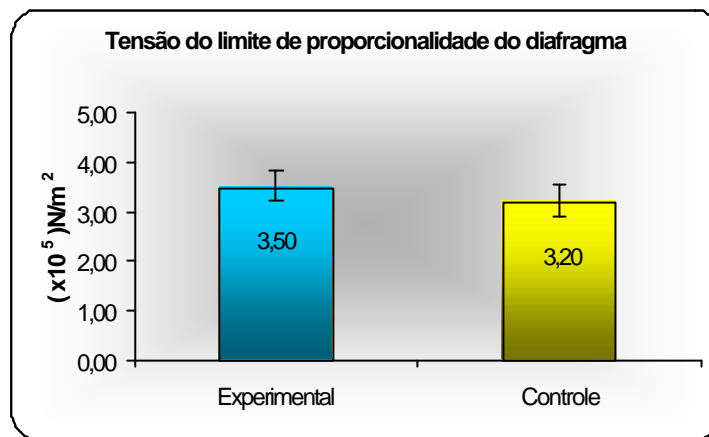


FIGURA 9 – Valores médios e erro padrão da tensão do limite de proporcionalidade dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.

4.1.4 Deformação do Limite de Proporcionalidade

O valor médio de deformação do limite de proporcionalidade do diafragma para o GE foi $(0,20 \pm 0,03)$ m/m e para o GC foi $(0,18 \pm 0,03)$ m/m. A comparação entre os dois grupos mostrou que não houve diferença estatística significativa entre eles (FIGURA 10).

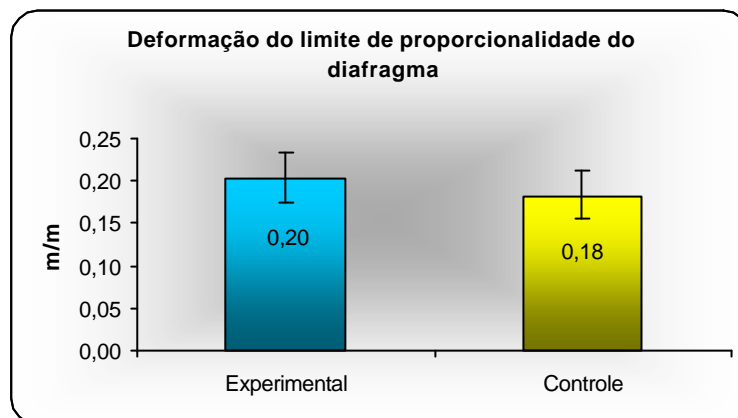


FIGURA 10 – Valores médios e erro padrão da deformação do limite de proporcionalidade dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.

4.1.5 Módulo de elasticidade

O valor médio do módulo de elasticidade do diafragma para o GE foi $(14,95 \pm 1,65) \times 10^5 \text{ N/m}$ e para o GC foi $(16,33 \pm 1,81) \times 10^5 \text{ N/m}$. O estudo estatístico demonstrou que não houve diferenças significantes entre os dois grupos (FIGURA 11).

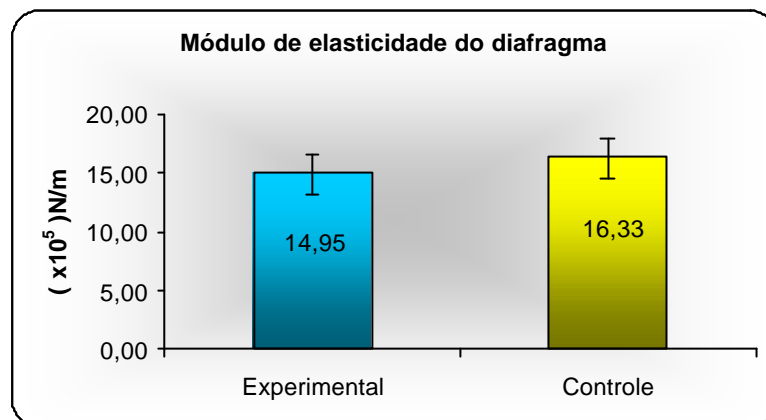


FIGURA 11 – Valores médios e erro padrão do módulo de elasticidade dos corpos de prova do diafragma dos grupos GE e GC.

4.2 Ensaio de tração do gastrocnêmio

Para o gastrocnêmio foram feitos 30 ensaios, sendo 15 do GE e 15 do GC. As propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio estão apresentadas na TABELA 5.

TABELA 5 – Valores médios das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração do músculo gastrocnêmio.

<i>Grupo</i>		<i>Limite Máximo</i>		<i>Limite Proporcional</i>		<i>Rigidez (x 10³) N/m</i>
		<i>Carga (N)</i>	<i>Deformação (x 10⁻³m)</i>	<i>Carga (N)</i>	<i>Deformação (x 10⁻³m)</i>	
<i>Experimental (n=15)</i>	<i>Média</i>	81,08	25,63*	67,30	17,19	5,52
	<i>E.P.</i>	3,61	1,69	3,06	1,01	0,28
	<i>Mediana</i>	78,80	24,50	63,00	17,8	5,51
<i>Controle (n=15)</i>	<i>Média</i>	87,13	32,33	68,69	19,58	5,56
	<i>E.P.</i>	3,64	1,85	3,08	1,34	0,33
	<i>Mediana</i>	86,20	34,50	69,40	17,6	5,86

* - significativamente diferente do Grupo Controle pelo Test t de Student

4.2.1 Carga do Limite Máximo

O valor de carga do limite máximo do músculo gastrocnêmio para o GE foi $(81,08 \pm 3,61)N$ e para o GC foi $(87,13 \pm 3,64)N$. A comparação entre os dois grupos mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa (FIGURA 12).

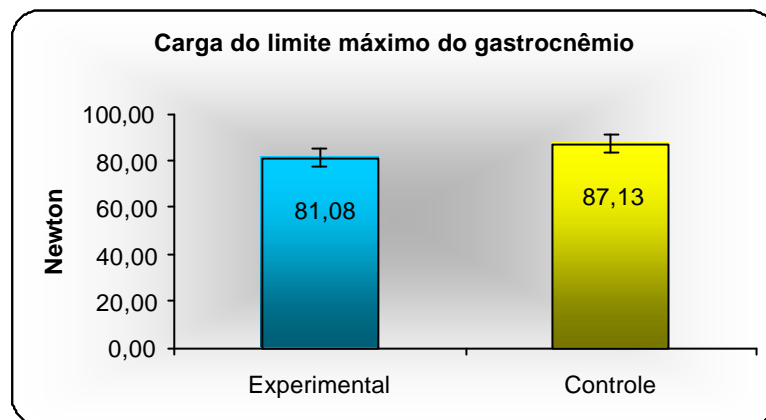


FIGURA 12 – Valores médios e erro padrão da carga do limite máximo dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.

4.2.2 Deformação do Limite Máximo

O valor médio de deformação do limite máximo do gastrocnêmio para o GE foi $(25,63 \pm 1,69) \times 10^{-3} \text{m}$ e para o GC foi $(32,33 \pm 1,85) \times 10^{-3} \text{m}$. A comparação entre os dois grupos mostrou que o limite máximo de deformação do gastrocnêmio foi significativamente inferior no GE em relação ao GC ($p=0,012$) (FIGURA 13).

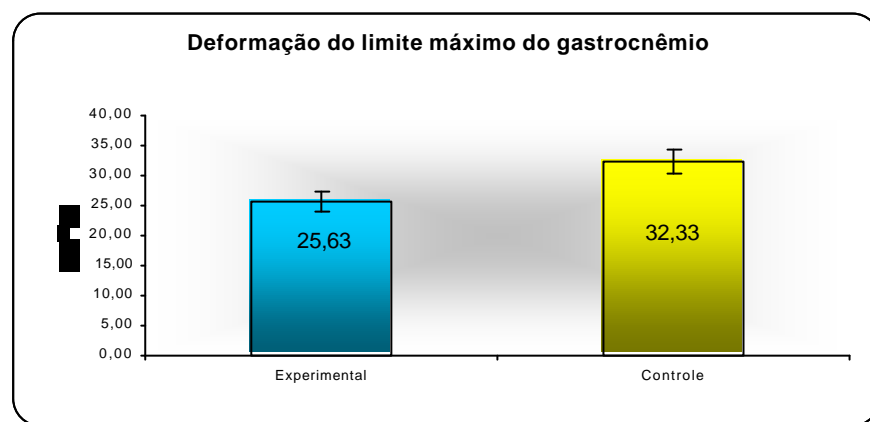


FIGURA 13 – Valores médios e erro padrão da deformação do limite máximo dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.

4.2.3 Carga do Limite de Proporcionalidade

O valor médio de carga do limite de proporcionalidade do gastrocnêmio para o GE foi $(67,30 \pm 3,06)$ N e para o GC foi $(68,69 \pm 3,08)$ N. A comparação entre os dois grupos mostrou que não houve diferença estatística significativa entre eles (FIGURA 14).

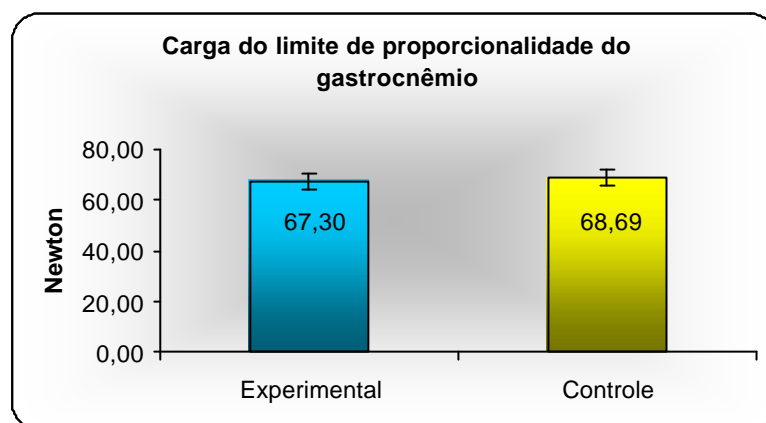


FIGURA 14 – Valores médios e erro padrão da carga do limite de proporcionalidade dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.

4.2.4 Deformação do Limite de Proporcionalidade

O valor médio de deformação do limite de proporcionalidade do gastrocnêmio para o GE foi $(17,19 \pm 1,01) \times 10^{-3} \text{m}$ e para o GC foi $(19,58 \pm 1,34) \times 10^{-3} \text{m}$. A comparação entre os dois grupos mostrou que não houve diferença estatística significativa entre eles (FIGURA 15)

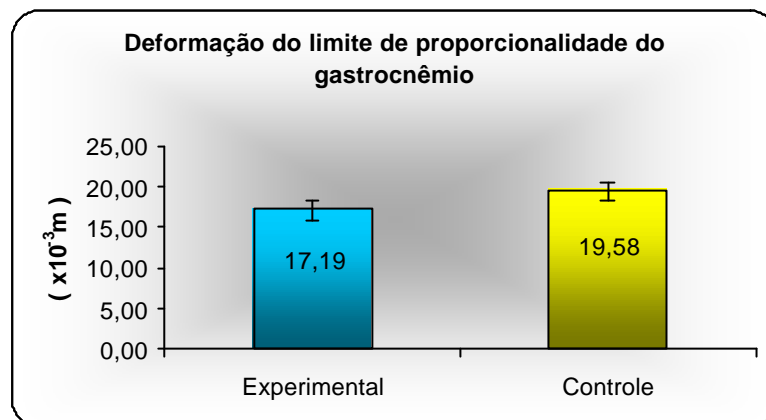


FIGURA 15 – Valores médios e erro padrão da deformação do limite de proporcionalidade dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.

4.2.5 Rigidez

O valor médio da rigidez do gastrocnêmio para o GE foi $(5,52 \pm 0,28) \times 10^3 \text{N/m}$ e para o GC foi $(5,56 \pm 0,33) \times 10^3 \text{N/m}$. A comparação entre os dois grupos mostrou que não houve diferença estatística significativa entre eles (FIGURA 16).

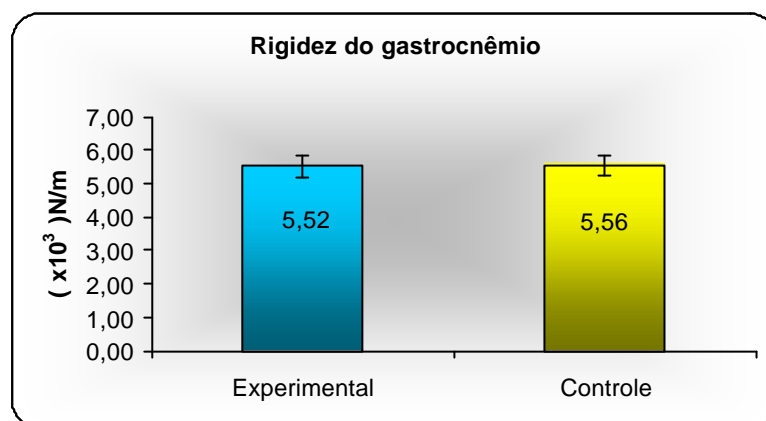


FIGURA 16 – Valores médios e erro padrão da rigidez do limite de proporcionalidade dos músculos gastrocnêmio dos grupos GE e GC.

4.2.6 Local de Ruptura

No GE ocorreu 9 rupturas no ventre, 2 na porção miotendínea distal e 4 na origem e no GC 8 rupturas no ventre, 5 na porção miotendínea distal e 2 na origem.

4.3 Análise Histológica

O estudo histoenzimológico dos músculos diafragma e gastrocnêmio provenientes de 3 animais do GE e 3 do GC foi realizado separadamente, sem o conhecimento da identidade de cada animal.

4.3.1 Músculo Diafragma

Os músculos diafragmas do GC não demonstraram alterações significativas, mas evidenciou-se conspícuo aumento da atividade nas reações de tricrômico de Gomori modificado mostrando acúmulo de mitocôndrias na região subssarcolemal (FIGURA 17) e da SDH. Não foram vistas miofagocitose, fibras em necrose ou aumento da atividade da fosfatase ácida lisossomal. Pelas reações das ATPases, observou-se padrão em mosaico (FIGURA 18).

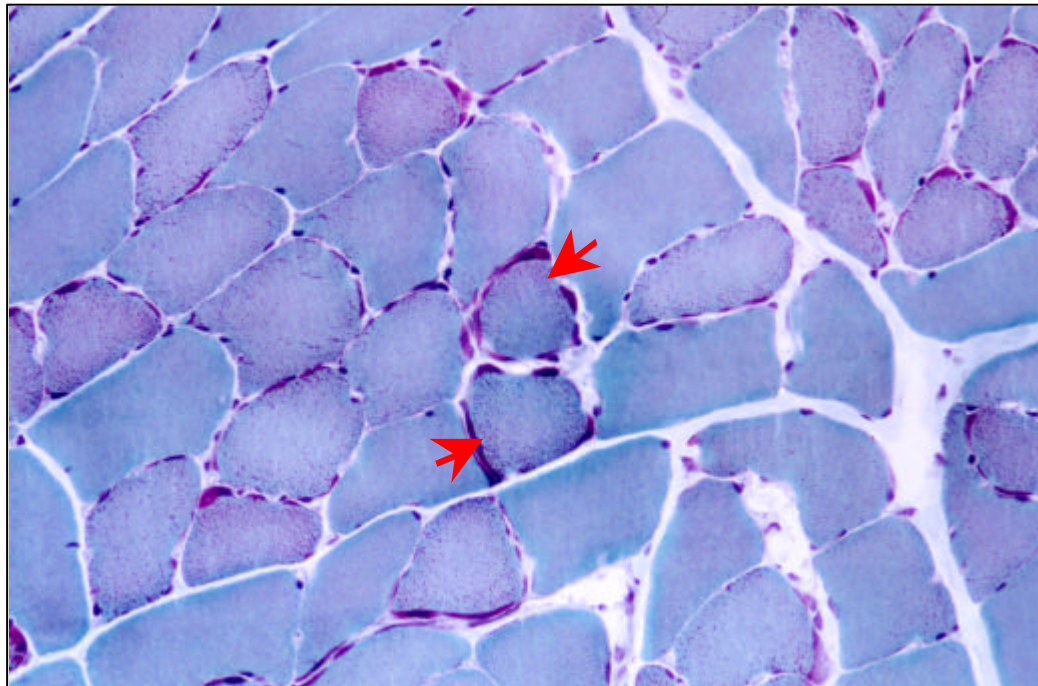


FIGURA 17 – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo controle na reação Tricrômico de Gomori modificado (200x). Note o aumento da atividade da reação, pela coloração mais acentuada mostrando acúmulo de mitocôndrias na região subssarcolemal (setas)

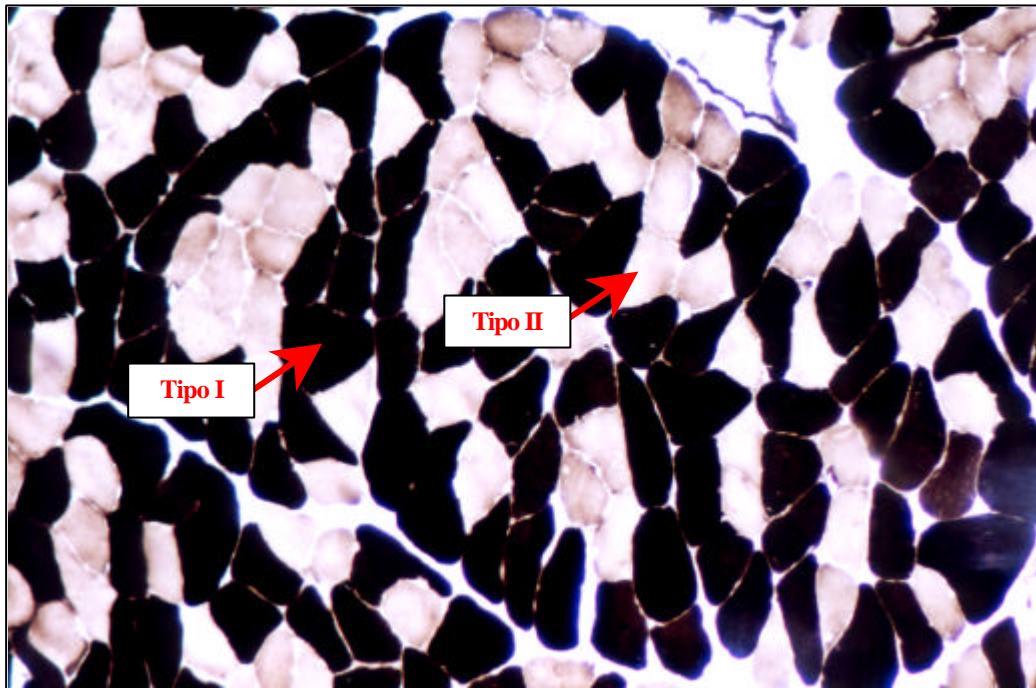


FIGURA 18 – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo controle na reação de ATPase (pH 9,4). (100x) Observe o padrão em mosaico a presença de fibras tipo I e tipo II (setas)

Em relação ao GE, as alterações estruturais vistas nos músculos diafragmas foram muito mais evidentes que as vistas nos gastrocnêmios. Pela coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E), evidenciou-se irregularidade moderada no diâmetro das miofibras, com diversas fibras em miofagocitose e várias em necrose hialina (FIGURAS 19A, 19B e 19C). Pela reação da NASBI, observou-se diversas miofibras com aumento da atividade da fosfatase ácida lisossomal (FIGURA 20). Várias miofibras exibiram aumento do conteúdo de glicogênio, evidenciado pela reação de PAS (FIGURA 21) e algumas fibras demonstraram importante aumento de lipídios no sarcoplasma (FIGURA 22). As reações de Tricrômico de Gomori modificado e da SDH evidenciaram-se algumas fibras com aumento da atividade na porção subsarcolemal – fibras “ragged red”. (FIGURA 23A e 23B). Nas reações das ATPases, manteve-se o padrão em mosaico.

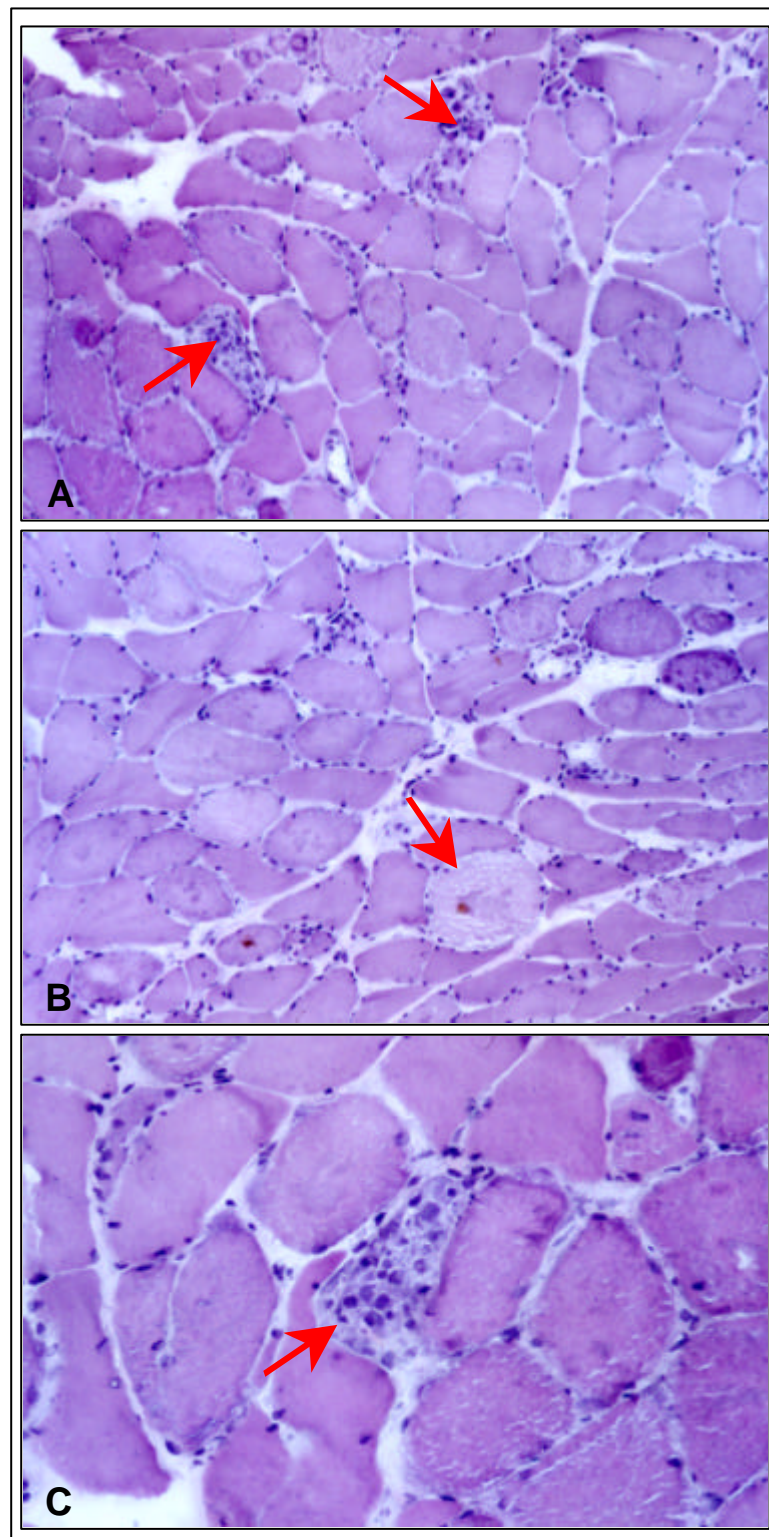


FIGURA 19 – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental pela coloração Hematoxilina-Eosina(H&E). **A-** fibras em miofagocitose (100 x). **B-** necrose hialina (100x). **C-** Fibras em miofagocitose (200x).

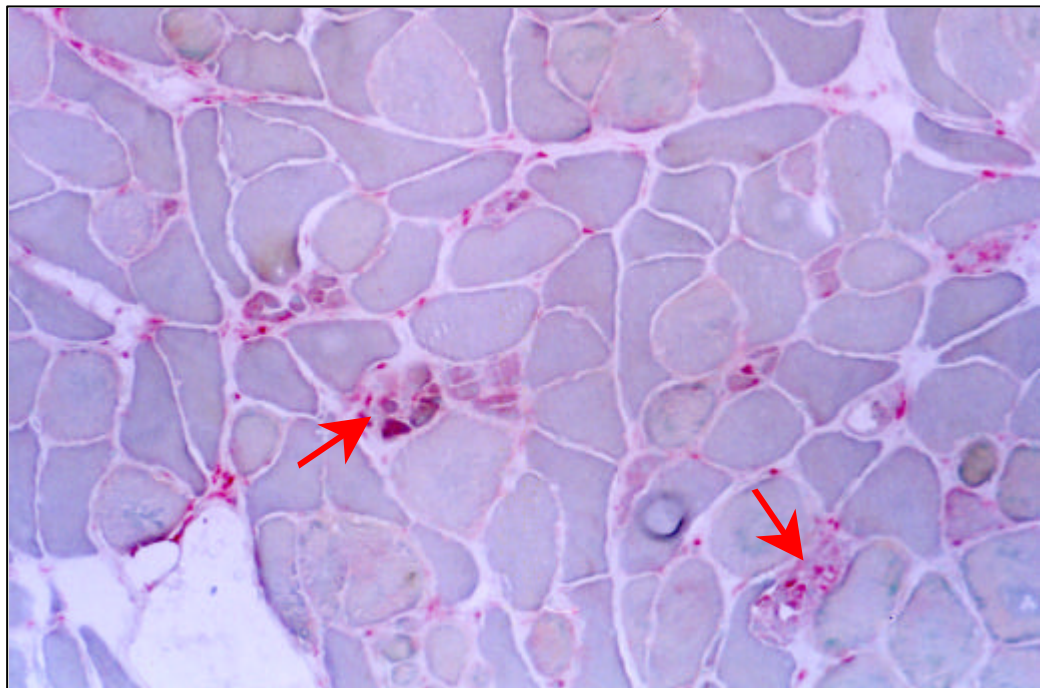


FIGURA 20 – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental pela reação da NASBI (100x). Note a presença de miofibras com coloração mais intensa mostrando aumento da atividade da fosfatase ácida lisossomal (setas)

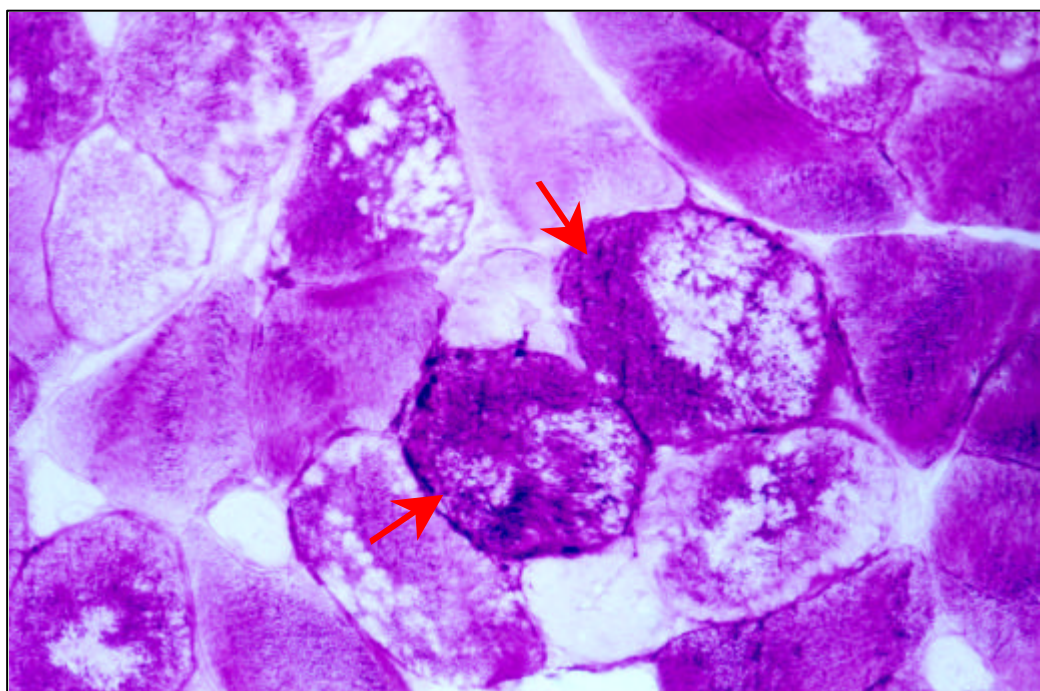


FIGURA 21 – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental (reação de PAS) (400x).. Observe nas miofibras pela intensa coloração, o aumento do conteúdo de glicogênio (setas)

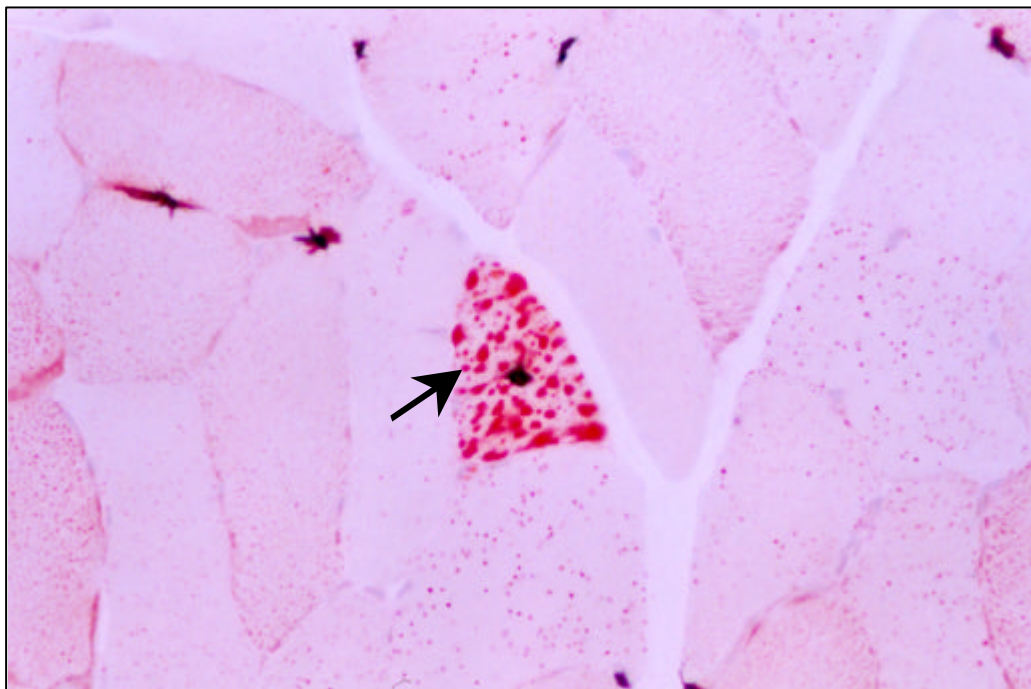


FIGURA 22 – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental (reação de Oil red “O”) (200x). Note fibra com aumento da quantidade de lipídeos no sarcoplasma (seta)

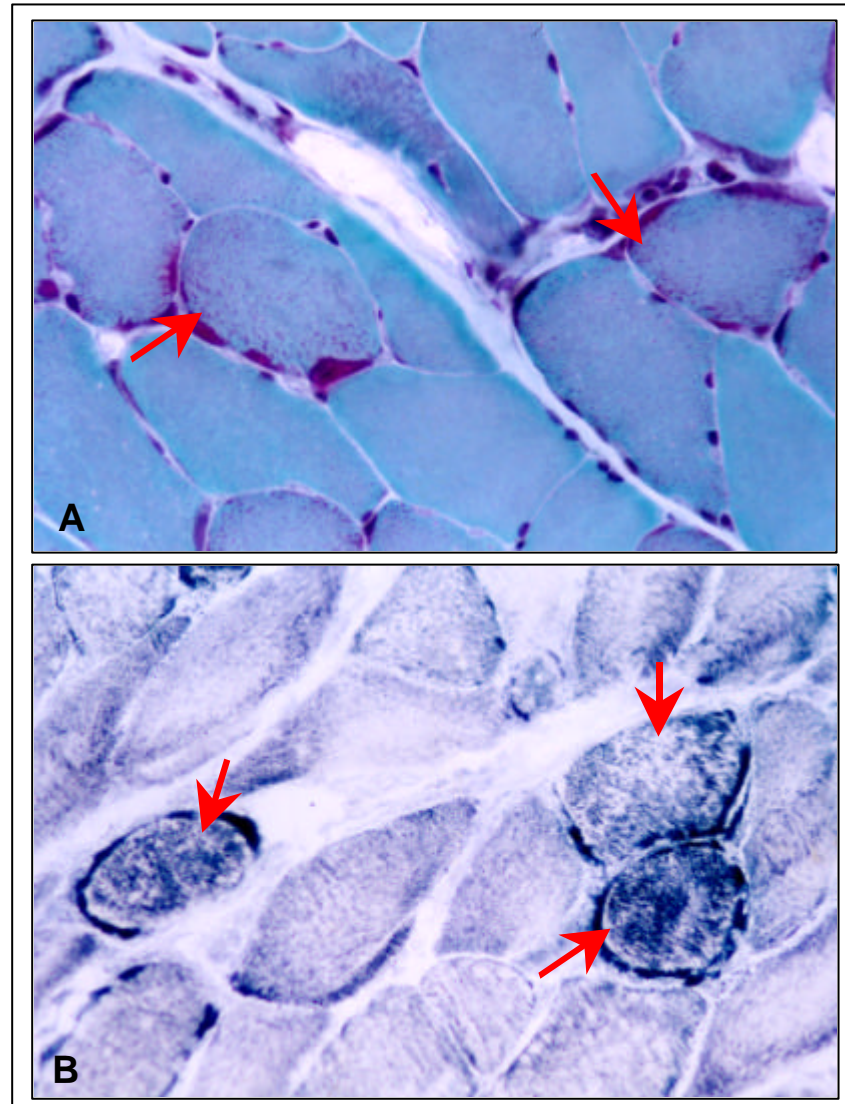


FIGURA 23 – Fotomicrografia do músculo diafragma de animal do grupo experimental. **A-** reação de Tricrômico de Gomori modificado (400x). Observe o aumento da atividade da reação, pela coloração mais acentuada mostrando acúmulo de mitocôndrias na região subsarcolemal (fibras “ragged red”) (setas). **B-** reação de SDH (200x). Note pela coloração mais intensa a presença de fibras com aumento subsarcolemal da atividade da succinato desidrogenase (SDH) (setas)

4.3.2 *Músculo Gastrocnêmio*

Os músculos gastrocnêmios do GC não demonstraram particularidades, notando-se preservação das miofibras, com discreta irregularidade no diâmetro das mesmas e sem afluxo de células inflamatórias (FIGURAS 25A e 25B). Não foi evidenciado acúmulo de glicogênio

na reação de PAS (FIGURA 26), sendo que as fibras predominantes foram as do tipo I (FIGURA 27).

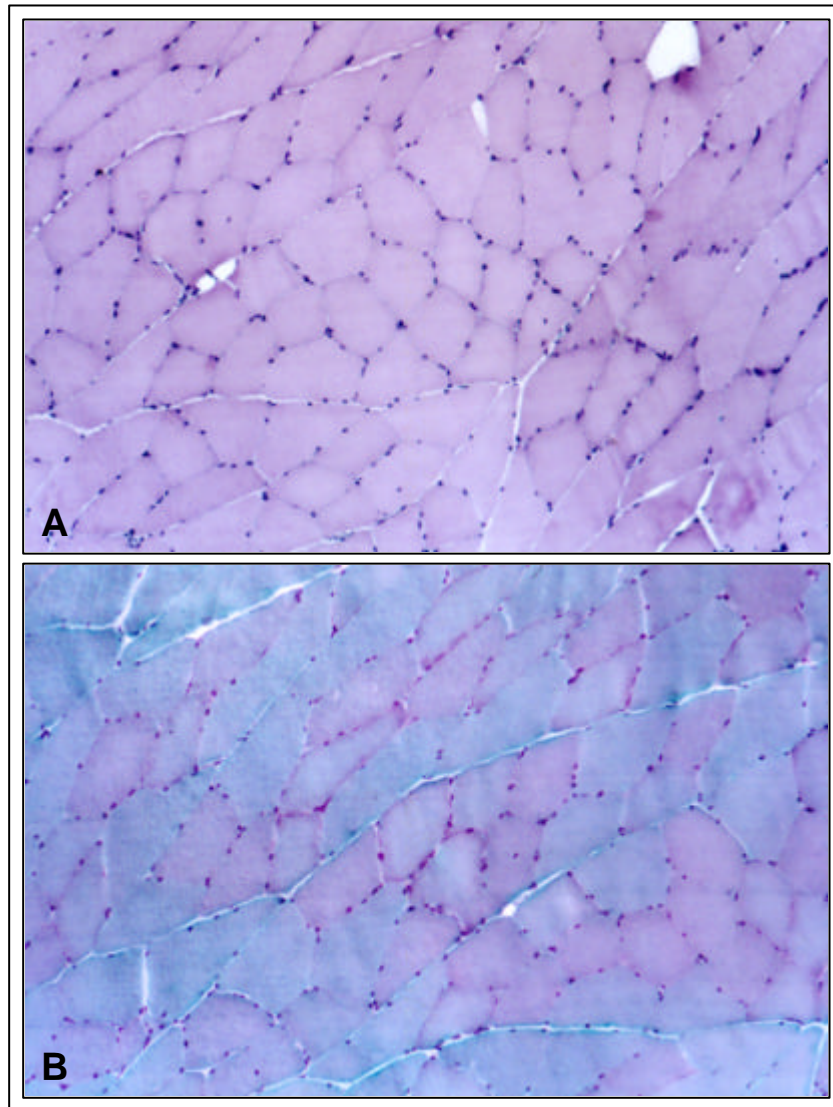


FIGURA 24 – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo controle. **A** – Hematoxilina & Eosina (H&E) (100x). **B** – Tricrômico de Gomori modificado (100x). Observe em **A** e **B** aspecto normal das fibras

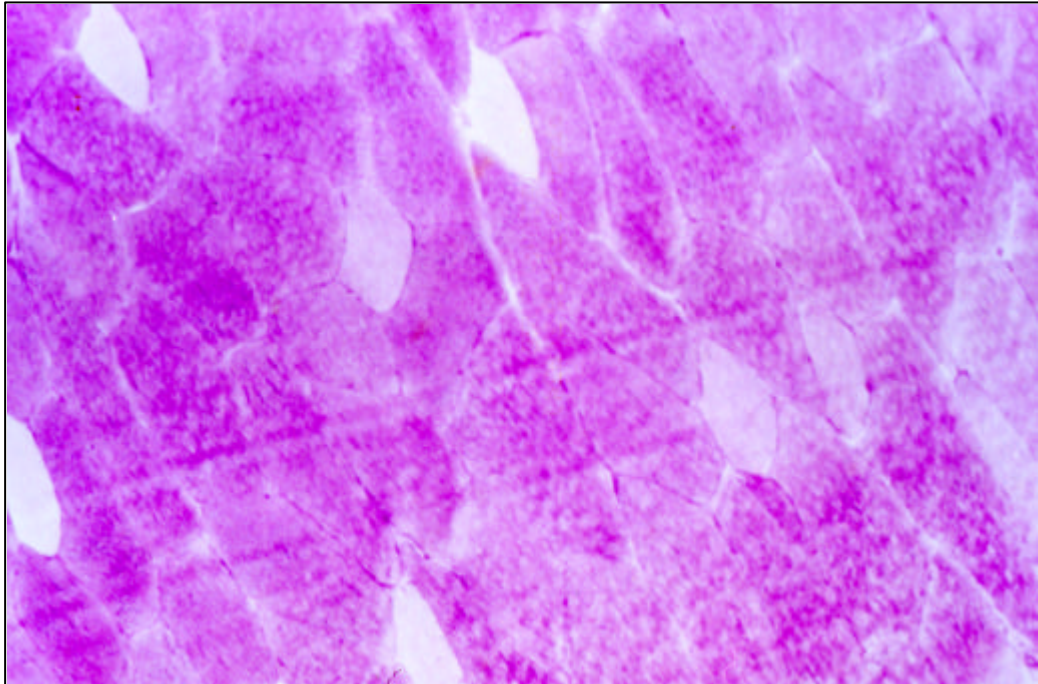


FIGURA 25 – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo controle GC (reação de PAS) (100x). Note fibras com conteúdo normal de glicogênio.

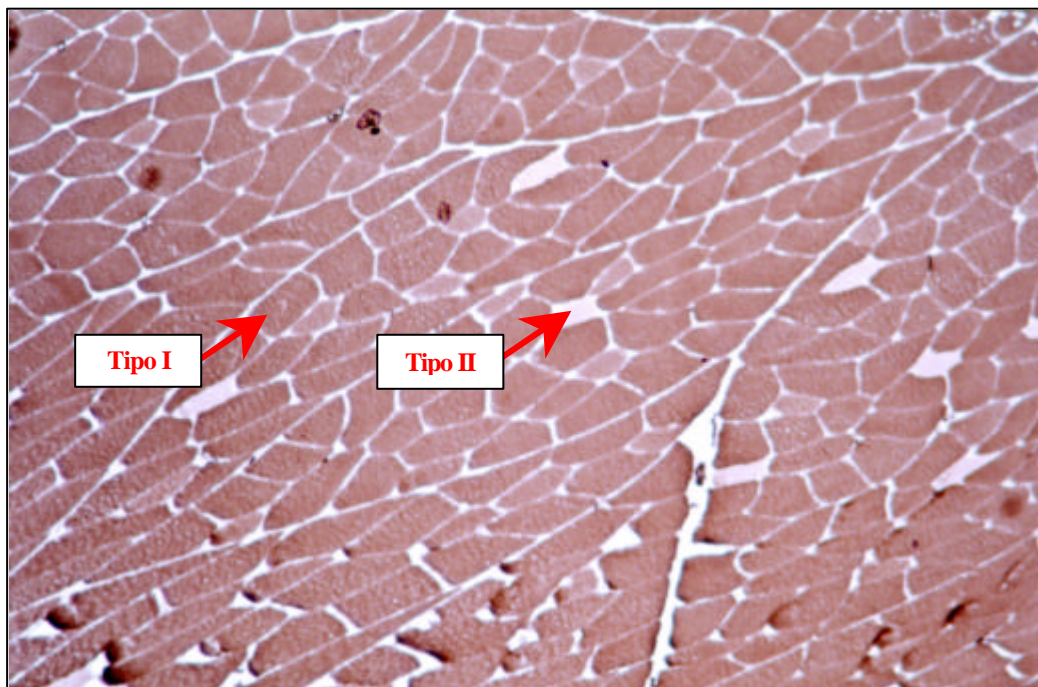


FIGURA 26 – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do GC na reação de ATPase (pH 4,65).(40x). Note o predomínio das fibras do tipo I (escuras) em relação às fibras do tipo II (claras).

Nos animais do GE, evidenciamos alterações sutis (FIGURAS 27A e 27B), porém significativas, a saber: algumas fibras com discreto aumento do conteúdo do glicogênio (FIGURA 28) e de lipídios (FIGURA 29) no sarcoplasma, além de raras fibras com aumento subsarcolemal da atividade da succinato desidrogenase – SDH (FIGURA 30). Não foi evidenciado miofagocitose ou necrose de miofibras. Não houve alteração quanto a predominância das fibras às reações das ATPases.

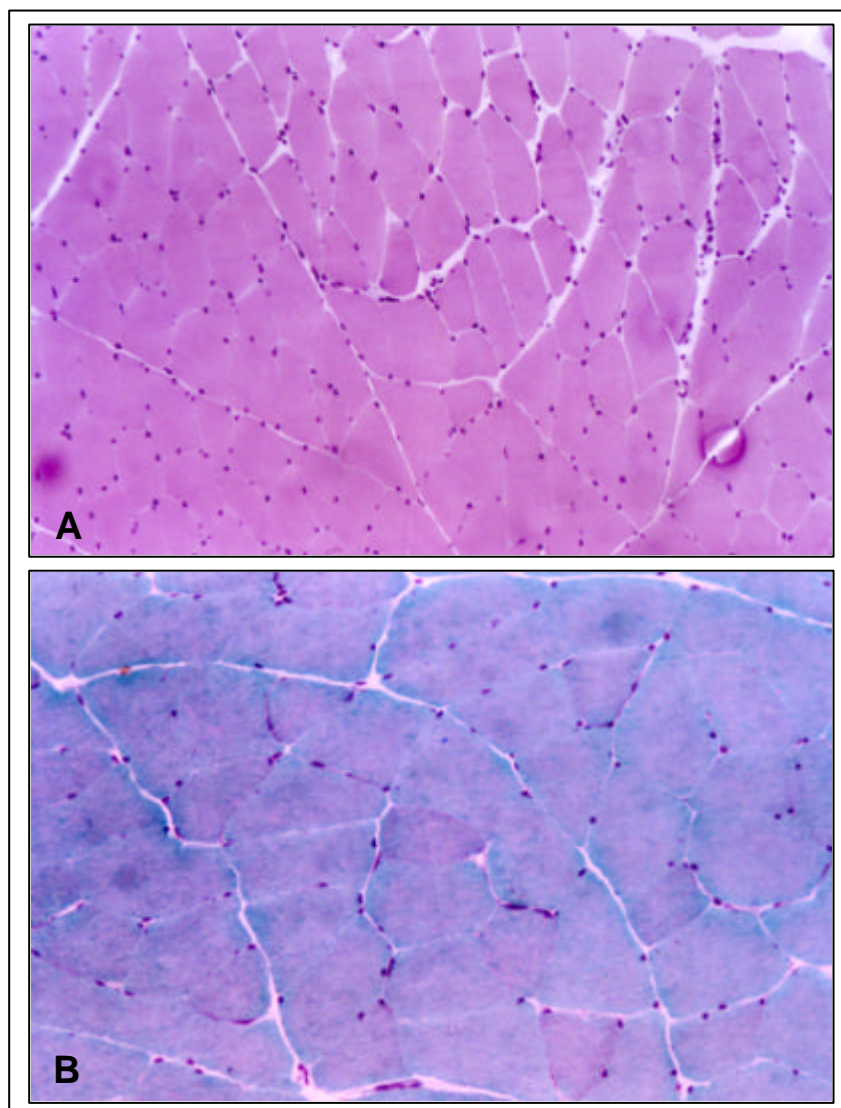


FIGURA 27 - Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo experimental. **A** – Hematoxilina & Eosina (H&E) (100x). **B** – Tricrômico de Gomori modificado (100x). Observe em **A** e **B** Aspecto normal das fibras

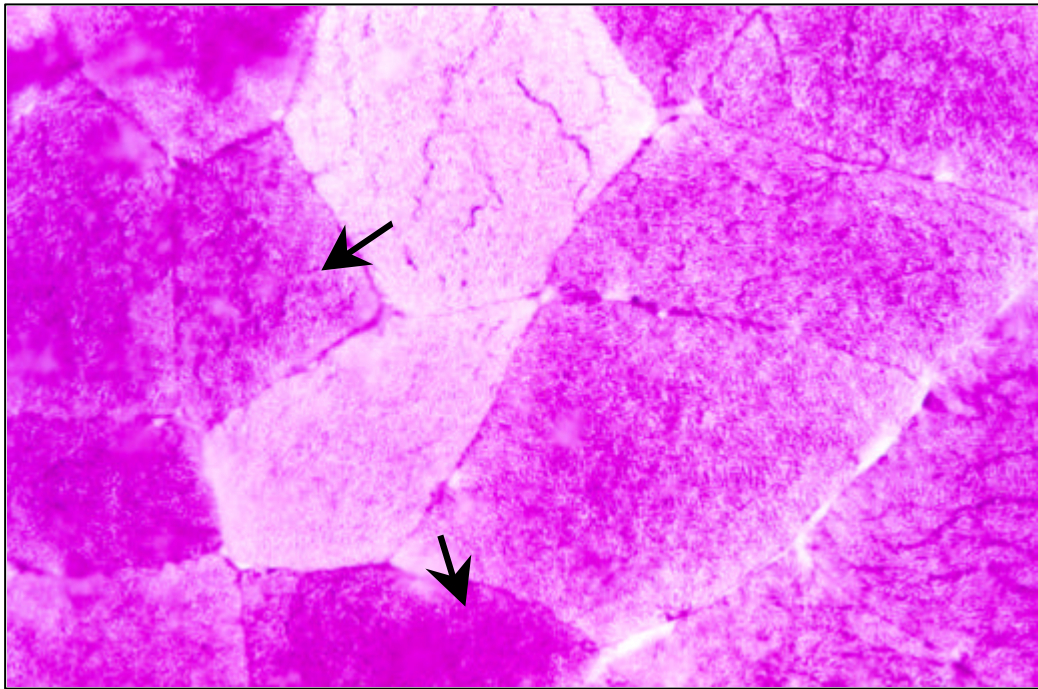


FIGURA 28 – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo experimental (reação de PAS) (400x). Note pela coloração mais intensa a presença de algumas fibras com discreto aumento do conteúdo de glicogênio no sarcoplasma (setas).

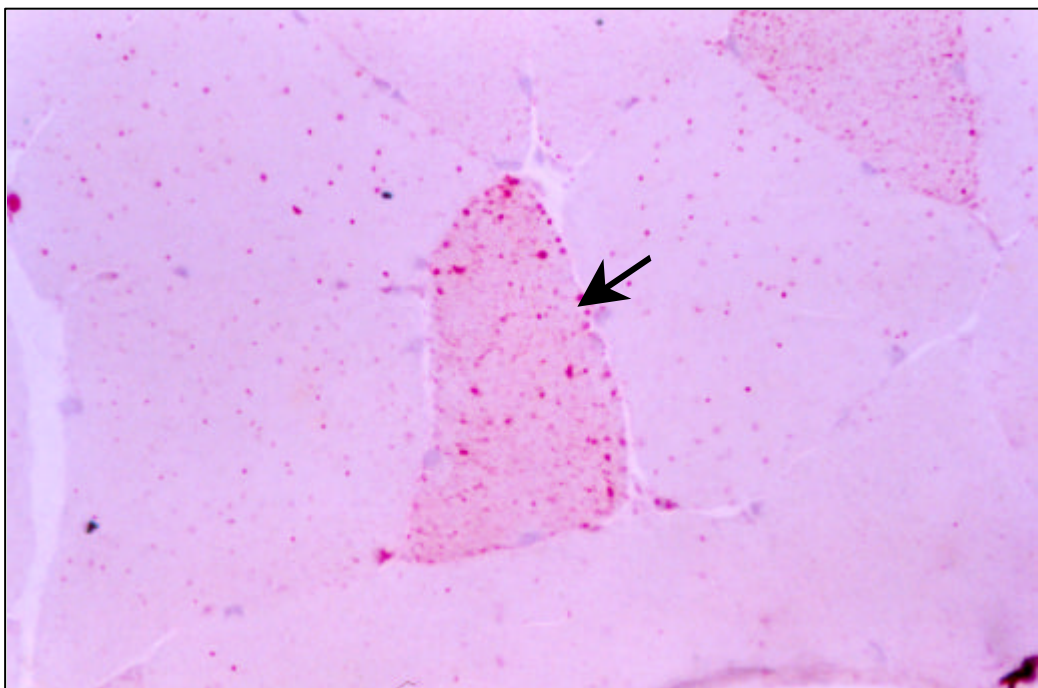


FIGURA 29 – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo experimental (reação de Oil red “O”) (200x). Observe fibra com discreto aumento quantitativo do conteúdo de lipídeo no sarcoplasma (seta)

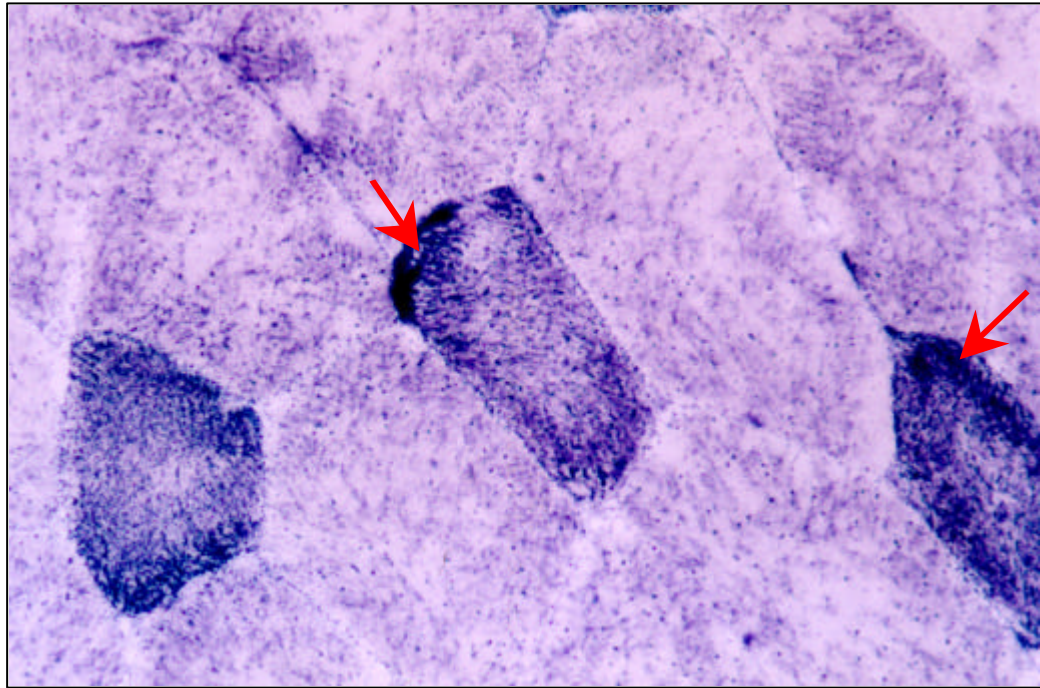


FIGURA 30 – Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animal do grupo experimental (reação de SDH) (200x). Note pela coloração mais intensa ,a presença de raras fibras com aumento subsarcolemal da atividade da succinato desidrogenase (SDH)

Do ponto de vista histopatológico pode-se concluir que:

- a miopatia metabólica apresentou-se mais evidente nos diafragmas do GE;
- houve alterações metabólicas leves nos gastrocnêmios do GE;
- ocorreu aumento da SDH e tricrômico de Gomori modificado nos diafragmas do GC.

5 DISCUSSÃO

Os corticosteróides constituem uma valiosa arma terapêutica sendo freqüentemente utilizados no tratamento de moléstias diversas tais como doenças colágeno-vasculares, artrites, vasculites, doenças intersticiais pulmonares, asma. No entanto, sua administração seja na forma oral, parenteral ou subcutânea, em grandes doses ou por períodos prolongados de tempo, associa-se a uma série de efeitos colaterais, dentre eles a atrofia e miopatia dos músculos estriados (COOMES, 1965; FALUDI ; GOTLIEB ; MEYERS, 1966; D'AGOSTINO ; CHIGA, 1966 ; AFIFI ; BERGMAN, 1969).

A ocorrência de processos metabólicos ao nível dos músculos esqueléticos secundariamente ao uso de corticosteróides, acompanhada ou não por atrofia da massa muscular, pode levar a graves prejuízos funcionais. Tais manifestações são mais evidentes naqueles casos incomuns em que a instalação do processo é aguda. Porém, mais freqüentemente a instalação do quadro é lenta e insidiosa e manifesta-se na forma de cansaço, fraqueza e astenia para realização de tarefas como caminhadas ou carregamento de pesos.

Se do ponto de vista clínico a existência de miopatia em músculos periféricos é bem reconhecida, a sua ocorrência no principal músculo da respiração, o diafragma, até recentemente era discutida. Admitia-se que devido à constante contração de suas fibras pela respiração, ele estivesse protegido do desenvolvimento da doença. Entretanto, nos últimos anos dados obtidos principalmente a partir de estudos experimentais em animais mostraram que esse músculo é igualmente susceptível ao problema (FERGUSON ; IRVIN ; CHERNIACK., 1990a ; FERGUSON ; IRVIN ; CHERNIACK, 1990b ; DEKHUIJZEN ; DECRAMER, 1992). O surgimento de miopatia diafragmática por corticosteróides em pacientes com pneumopatia crônica pode levar, pelo menos em tese, ao agravamento da

sensação de dispnéia e propensão para o desenvolvimento de fadiga muscular respiratória em situações de sobrecarga ventilatória como, por exemplo, num episódio de infecção respiratória (CASABURI, 2000).

Atualmente encontra-se disponível na literatura um grande volume de informações referentes aos aspectos morfológicos e funcionais da miopatia induzida pela administração de esteróides sistêmicos, tanto em músculos periféricos como no diafragma. Entretanto, ao efetuarmos uma revisão na literatura, não encontramos nenhum estudo voltado à investigação das propriedades biomecânicas de músculos de animais tratados com esteróides sistêmicos empregando-se ensaios de tração. Diante disso, procuramos desenvolver uma pesquisa direcionada à avaliação dos efeitos do uso de esteróides em altas doses sobre as propriedades biomecânicas do diafragma e do gastrocnêmio de coelhos.

Neste estudo foi feita uma opção pela utilização de coelhos porque, segundo Green *et al.* (1984), a composição das fibras musculares desse animal é muito semelhante a do homem. Além disso, para que pudessem ser realizados ensaios de tração com o diafragma eram necessários corpos de prova de dimensões adequadas, fato que só seria possível com a utilização no estudo de um animal, no mínimo, de porte médio.

Entre diferentes corticosteróides disponíveis, neste trabalho foi feita uma opção pela metilprednisolona devido a facilidade de seu uso por via parenteral, pelo seu longo período de ação e alta potência antiinflamatória, com apenas discretos efeitos hidro-eletrolíticos. (SCHIMMER ; PARKER, 1996). Além disso, é uma droga muito utilizada na prática clínica como, por exemplo, no tratamento de episódios de rejeição de órgãos transplantados ou em crises asmáticas graves. Essa droga também tem sido utilizada em estudos prévios em doses semelhantes às empregadas no tratamento de humanos (LIEU *et al.*, 1993).

Após alguns experimentos pilotos, acabamos por utilizar neste estudo doses de metilprednisolona de 2 mg/kg/dia ao longo de 21 dias. Essa decisão baseou-se inicialmente em alguns estudos previamente publicados (LIEU *et al.*, 1993; FALUDI ; GOTLIEB ;

MEYERS, 1966 ; VAN BALKON *et al.*, 1999), mas também na experiência adquirida com os experimentos pilotos.

Muito embora os ensaios de tração pudessem ser realizados com qualquer grupo muscular periférico, foi feita uma opção pelo emprego do gastrocnêmio medial devido a maior facilidade técnica para sua retirada e fixação nos acessórios da máquina de ensaios. Ainda que o diafragma, principal músculo da respiração e o gastrocnêmio tenham ações cinéticas diferentes, suas fibras musculares possuem composição semelhante, ou seja, ambos são compostos por fibras musculares tipo I, IIa e IIb (GAUTHIER ; PADYKULA., 1966 ; SRÉTER ; WOO, 1963 ; HICKSON *et al.*, 1986).

O peso médio dos animais ao início do estudo não diferiu entre os dois grupos estudados indicando que eles eram comparáveis. No momento do sacrifício o Grupo Experimental (GE) apresentou um peso médio significativamente inferior ao do Grupo Controle (GC). Além disso, quando observamos o comportamento do peso médio dos grupos notamos que enquanto o GC apresentou discreto ganho ponderal, o GE apresentou perda. Tais achados já foram descritos previamente em estudos experimentais com a administração de esteróides em altas doses e podem ser explicados pela ação catabólica da droga, particularmente sobre os grupos musculares (CAPACCIO ; GALASSI ; HICKSON, 1985 ; CZERWINSKI *et al.*, 1987; FERGUSON ; IRVIN ; CHERNIACK 1990a ; FERGUSON ; IRVIN ; CHERNIACK., 1990b ; DEKHUIJZEN ; DECRAMER, 1992 ; NAVA *et al.*, 1996). Uma explicação adicional poderia ser relacionada com alterações da ingestão de alimentos secundárias a modificações do apetite do animal. O uso de esteróides costuma levar a elevações do apetite porém, quando usados em altas doses, um efeito oposto pode ser observado igualmente. Além disso, o surgimento de potenciais complicações digestivas tais como gastrites ou úlceras, poderia também influenciar na absorção de nutrientes. Não acreditamos que esses tenham sido fatores relevantes para os achados deste estudo porque o nível de ingestão média entre os dois grupos de animais não diferiu de maneira significativa.

Também não foram observados episódios de vômitos ou evidências de hemorragias digestivas em nenhum dos grupos de animais.

No presente estudo o peso médio do diafragma não diferiu de maneira significativa entre os grupos ao final do estudo. Tal achado se assemelha ao que foi encontrado por Van Balkon *et al.* (1996) que utilizaram metilprednisolona nas doses de 0,2 mg/Kg por 9 meses em ratos. Entretanto ele se contrapõe ao de Ferguson ; Irvin ; Cherniack (1990b) que mostraram redução significativa do peso do diafragma após o uso de 10 mg/Kg/dia de acetato de cortisona por 3 semanas em coelhos. Em ambos os trabalhos citados, entretanto, foram encontradas alterações histológicas de miopatia metabólica induzida pelo esteróide, o que também aconteceu no nosso estudo.

As alterações estruturais dos diafragmas presentes na análise histológica dos animais do GE foram semelhantes às observadas por Ellis (1956) e Afifi ; Bergman (1969). Portanto, acreditamos que no nosso modelo experimental o uso de metilprednisolona levou a importantes repercussões ao nível do músculo diafragmático. A não redução de peso nos diafragmas do GE neste estudo, que seria esperada frente à perda de peso global dos animais, poderia ser explicada, pelo menos em parte, por deposição de gordura em torno do músculo, fato que foi observado macroscopicamente no momento da retirada da peça em diversas ocasiões. Achados semelhantes foram descritos por Crisco *et al.* (1994) , embora tenham sido atribuídos a presença de edema e hemorragia provocados pela lesão muscular por impacto no meio do ventre do complexo muscular gastrocnêmio (gastrocnêmio, solear e plantar)

No nosso estudo as alterações histológicas no GE foram mais marcantes nos diafragmas comparados aos gastrocnêmios, tal como no experimento de D`Agostino ; Chiga (1966). Nesse trabalho as alterações observadas em coelhos tratados com acetato de cortisona por 12 a 14 dias foram mais proeminentes no diafragma comparadas ao quadríceps, solear e gastrocnêmio. Para aquele autor seus achados poderiam ser explicados pelo tipo de esteróide usado, pela duração da exposição à droga, e pela hipotética possibilidade da

presença de um alto fluxo sanguíneo pudesse levar o diafragma a sofrer uma maior exposição ao corticóide.

Nos diafragmas do GC as reações Tricrômico de Gomori modificado e succinato de desidrogenase (SDH) indicaram acúmulo constante de mitocôndrias na periferia das miofibras. Embora este achado seja insuficiente para caracterizar algum tipo de miopatia, ele difere do habitualmente visto em biópsias musculares pelo especialista em patologia neuromuscular. O real significado deste achado ainda permanece a ser definido.

Os valores médios de tensão e deformação dos limites máximo e de proporcionalidade dos diafragmas, parâmetros obtidos na fase plástica e elástica respectivamente, foram semelhantes. No entanto, é mais interessante analisarmos os dados obtidos dos diafragmas na fase elástica pois, reflete a etapa de deformação reversível, estando mais próximo das condições normais de funcionamento muscular. Diante disto, observamos que nesta fase os diafragmas dos animais que fizeram uso de metilprednisolona apresentaram a mesma capacidade de alongamento em relação aos animais controle.

Os valores médios do módulo de elasticidade foram semelhantes no diafragma de ambos grupos, refletindo que o uso de altas doses de metilprednisolona não alterou as características do material em estudo. Embora, pela análise histológica foi demonstrado alterações miopáticas nos diafragmas do GE comparado ao GC.

Ao final do período de 21 dias o peso médio do músculo gastrocnêmio do GE foi significativamente inferior ao do GC. Outras alterações significantes encontradas no GE foram reduções da largura e espessura do ventre muscular. Reduções de peso do gastrocnêmio associadas ao uso de corticosteróides já foram descritas em inúmeros trabalhos prévios tais como os de Ellis (1956); Goldberg; Goodman (1969), Hickson *et al.* (1986) e Moore *et al.* (1989). Tais achados sempre foram interpretados como indicação de miopatia metabólica e via de regra foram acompanhados por alterações anatomopatológicas compatíveis. Assim, por exemplo, Ellis (1956), administrou injeções de acetato de cortisona em coelhos nas doses diárias de 10 mg/Kg, por períodos de 7 a 25 dias. Após 21 ou mais dias

de uso do corticóide foi observado que o diafragma e músculos da pata dianteira, peitoral maior, grupos anterior e posterior da coxa, psoas maior e sacroespinhais, apresentavam-se pálidos, leves e atróficos e ao exame microscópico havia necrose espalhada, fagocitose de resíduos e áreas de regeneração de fibras musculares.

No nosso estudo, embora as alterações histológicas nos gastrocnêmios do GE tenham sido sutis, acreditamos que a administração de metilprednisolona cursou com efeitos musculares. Tal afirmação baseia-se nos achados macroscópicos de atrofia, traduzida por menor área, largura, espessura e peso. A pobreza das alterações histológicas encontrada nos gastrocnêmios do GE, poderia ser explicada pelo fato de termos efetuado estudos anatomopatológicos em coelhos selecionados aleatoriamente e assim, podemos ter acabado por estudar justamente animais com comprometimento muscular mais discreto. Uma outra explicação possível, reside no fato das amostras terem sido retiradas apenas da porção medial do ventre muscular, zona que não obrigatoriamente refletiria os distúrbios metabólicos ocorridos em outras áreas do músculo.

Para a análise das propriedades mecânicas do gastrocnêmio, foi usado o gráfico carga X deformação. O ideal seria correlacionar a deformação com a tensão. No entanto, tal abordagem não foi possível, pois o formato de seu ventre muscular não é uniforme, o que impossibilita medir de maneira precisa a área de secção transversal. Diante desta limitação o cálculo do módulo de elasticidade foi substituído pela rigidez.

Analisando a fase plástica, observamos que o valor médio de carga máxima suportada pelos gastrocnêmios, não diferiu entre os grupos. Por outro lado, o valor médio da deformação máxima foi significativamente menor no GE em relação ao GC. Estes resultados sugerem que os gastrocnêmios, sob efeito de altas doses de metilprednisolona por via sistêmica, acabaram por apresentar uma menor capacidade de alongamento em condições de extrema tração, embora suportassem a mesma carga máxima do controle.

Todavia, os valores médios de carga e deformação do limite de proporcionalidade, etapa reversível da deformação, não foram significativamente diferentes no GE e GC. Além

disso, os valores médios da rigidez também não foram significativamente diferentes entre os grupos. Diante disto, os resultados do estudo biomecânico encontrados nos gastrocnêmios, foram semelhantes aos achados para os músculos diafragmas. Isto sugere que o uso de metilprednisolona não alterou a capacidade de alongamento, tampouco a característica dos gastrocnêmios de ambos os grupos.

Devido a necessidades técnicas relacionadas com a melhor maneira de inserção da peça anatômica na máquina de ensaios, o gastrocnêmio acabou sendo estudado com seus componentes tendíneos. Desse modo os resultados obtidos e as conclusões deles retirados, se aplicam, na realidade, para o conjunto músculo-tendão.

Alguns trabalhos avaliaram as propriedades biomecânicas dos tendões após a administração de esteróides por via local e sistêmica.

Balasubramaniam et al (1972) estudaram, em coelhos, os efeitos da hidrocortisona na dose de 5mg/kg em 0,2 ml de suspensão. A droga foi injetada dentro do tendão calcâneo, no lado direito, e no lado esquerdo foi injetado solução salina em dose semelhante. Foi observado no local da injeção presença de necrose e reparo incompleto das lesões musculares, mesmo após oito semanas de interrompido o uso de corticóide. Este reparo incompleto pode freqüentemente complicar-se por calcificação distrófica e rupturas espontâneas podem ocorrer em pacientes que receberam infiltração de esteróides devido mudanças morfológicas semelhantes às descritas neste estudo.

Carazzato et al, (1980) em experimentos em ratos que receberam na junção miotendínea do tríceps sural injeções de 0,2 ml metilprednisolona e xilocaína, observaram a presença de necrose na junção músculo-tendínea Além disso, no grupo que recebeu metilprednisolona houve diminuição significativa da resistência tecidual

Já Oxlund ; Manthorpe (1982) investigaram, igualmente em coelhos, as propriedades dos tendões dos músculos fibulares longo e curto após a administração intramuscular de prednisolona nas doses de 0,6 mg/Kg por 63 dias. Os autores observaram no grupo tratado com esteróides redução do peso seco dos tendões, sem alterações do conteúdo de colágeno

ou parâmetros de tensão e deformação. A ocorrência de alterações biomecânicas foi muito mais evidente no tecido cutâneo.

Neste estudo as rupturas ocorridas próximas à inserção miotendínea, embora não tenham apresentado diferença estatística significativa entre os grupos experimental e controle mostraram que não houve correlação com o uso da droga, pois 2 animais no GE tiveram ruptura na inserção miotendínea e 5 animais no GC . Diante disto podemos correlacionar este resultado com o estudo de Phelps ; Sonstegard ; Matthews (1974) pois, não encontraram alterações deletérias nas propriedades biomecânicas (carga máxima, rigidez ou local de ruptura) de tendões patelares infiltrados com metilprednisolona em coelhos normais e sugeriram que, em atletas as rupturas ocorridas em tendões que receberam infiltração podem estar associadas a um processo patológico de base como uma ruptura parcial ou um processo inflamatório. E Oxlund ; Manthorpe (1980) observaram que injeção local de cortisol ao redor de tendões fibulares aumentou sua força e rigidez , porém, diminuiu a força de união ósteo-ligamentar.

Nossos resultados apontam na mesma direção dos estudos previamente citados, de que o uso sistêmico de corticóide não guarda relação com o local de rupturas da unidade músculo-tendínea, o qual mais provavelmente está na dependência da patologia de base.

6 CONCLUSÕES

A realização dos ensaios de tração em músculos de coelhos submetidos à administração sistêmica prolongada de metilprednisolona em altas doses, permitiu-nos concluir que:

1. O uso de metilprednisolona em dose única diária por 3 semanas não levou a alterações das propriedades biomecânicas diafragmáticas, tanto na fase plástica como da fase elástica.
2. O músculo gastrocnêmio medial, sob ação de esteróide sistêmico, manteve suas propriedades biomecânicas da fase elástica.
3. O tratamento com esteróide sistêmico levou os músculos gastrocnêmios a significativa redução do limite máximo de deformação e menor capacidade de alongamento, embora tenham suportado cargas máximas semelhantes às do grupo controle.
4. Não houve relação entre evidências histológicas de miopatia metabólica e alterações das propriedades biomecânicas nos músculos estudados.

ANEXOS

I – A₁ e A₂ – Técnicas Histoenzimológicas

II – Gráficos B₁ e B₂ – Curvas tensão \times deformação dos ensaios mecânicos de tração dos diafragmas.

III – Tabelas C₁ e C₂ – Valores das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração dos corpos de prova dos diafragmas.

IV – Gráficos D₁ e D₂ – Curvas carga \times deformação dos ensaios mecânicos de tração dos músculos gastrocnêmio.

V – Tabelas E₁ e E₂ – Valores das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração dos corpos de prova do músculo gastrocnêmio.

A₁ - Técnica de Coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) em tecido congelado em nitrogênio líquido

Foram utilizados os seguintes reagentes: ácido clorídrico, ácido acético glacial, álcool absoluto, *alúmen* de potássio ou de amônio, hematoxilina cristal, óxido vermelho de mercúrio e eosina aquosa a 1%.

Os cortes congelados obtidos passaram pelo processamento técnico através da seguinte seqüência:

- 1- coloração dos cortes por 4 minutos em solução de Hematoxilina de Harris.
- 2- lavagem em água filtrada por 10 minutos,
- 3- contra coloração em solução de eosina a 1% por 45 segundos,
- 4- lavagem em água destilada, passagem em álcool 95°,
- 5- passagem em álcoois absolutos,
- 6- Xilol
- 7- montagem em Entelan[®].

A₂ - Técnica Histoenzimológica de Caracterização da Enzima mATPase

Foram utilizados os seguintes reagentes: ATP (Sigma[®]), acetato de sódio 0,5 M, sulfeto de amônio 2%, veronal sódico 0,1 M, ácido acético glacial 0,5 M, cloreto de cálcio 0,18 M e acetato de cobalto 2%.

As composições das soluções de pré-incubação para o pH 9,4, foram as seguintes:

Solução A: água destilada (28 ml), cloreto de cálcio (0,18 M – 4 ml) e veronal sódico (0,1 M - 8 ml).

Solução B ácido acético 0,5 M, ácido acético glacial (7,166 ml) e água destilada (250 ml)

Solução C: acetato de sódio (0,5 M - 17,106 g) e água destilada (250 ml)

Para o pH 4,93 a solução de pré-incubação foi composta de ácido acético 0,5 M (75ml) e acetato de sódio 0,5M (75 ml).

Quanto ao pH 4,65, a composição da solução pré-incubação foi o ácido acético 0,5M (9,0ml) e acetato de sódio 0,5M (4,5ml).

A técnica histoenzimológica foi realizada na seguinte sequência:

1- cortes Testemunho (T) e Reação (R) voltados para baixo nas câmaras dos incubadores e identificados com seus respectivos valores de pH (9,4; 4,93 e 4,65)

* os cortes (“blanck”) T foram incubados, no meio de incubação sem a presença de substrato (ATP)

* os cortes R foram incubados com a presença de substrato (ATP) no meio de incubação

2- pré-incubação dos cortes T e R por 15 minutos

3- lavagem rápida em água destilada,

4- incubação dos cortes nos respectivos meios de incubação T e R, filtrados

- para o pH9,4 (30 minutos – 36° C)

- para o pH4,93 (40 minutos – 36° C)

- para o pH4,65 (40 minutos – 36° C)

5- lavagem em água destilada

6- colocação de acetato de cobalto 2% filtrado por 7 minutos

7- lavagem em água corrente por 5 minutos

8- revelação da reação em sulfeto de amônio 2% por 2 minutos

9- lavagem em água corrente por 5 minutos

10- montagem das lâminas em xarope de Apathy®

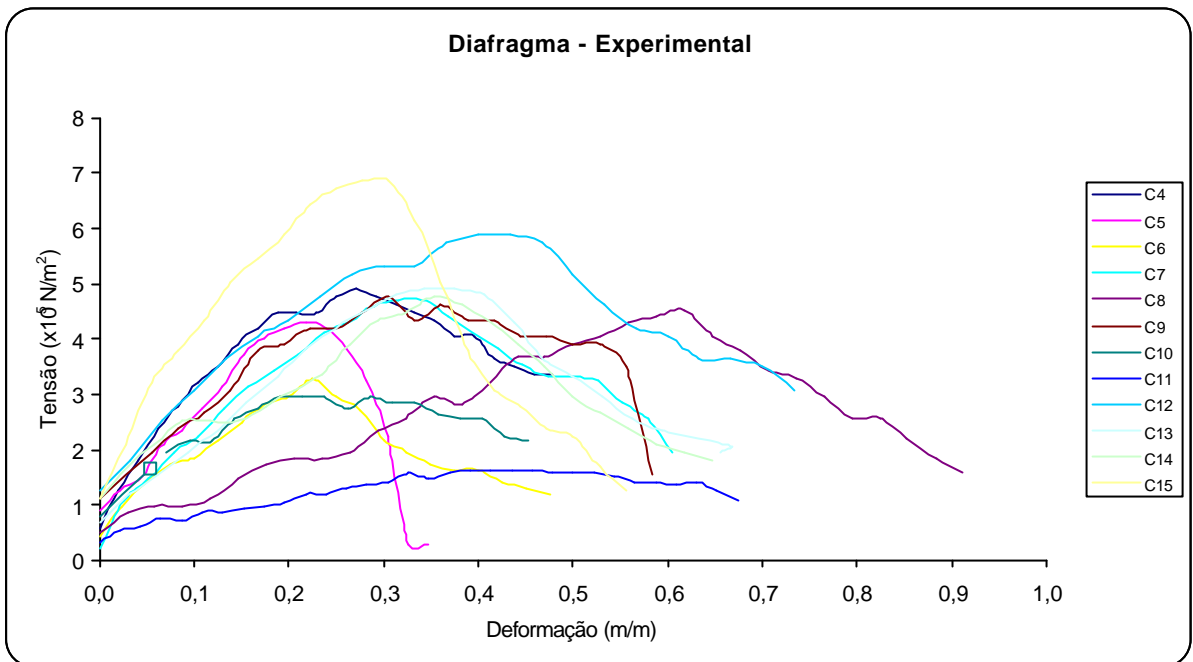


GRÁFICO B₁ – Curvas tensão \times deformação dos ensaios mecânicos de tração dos diafragmas do grupo experimental

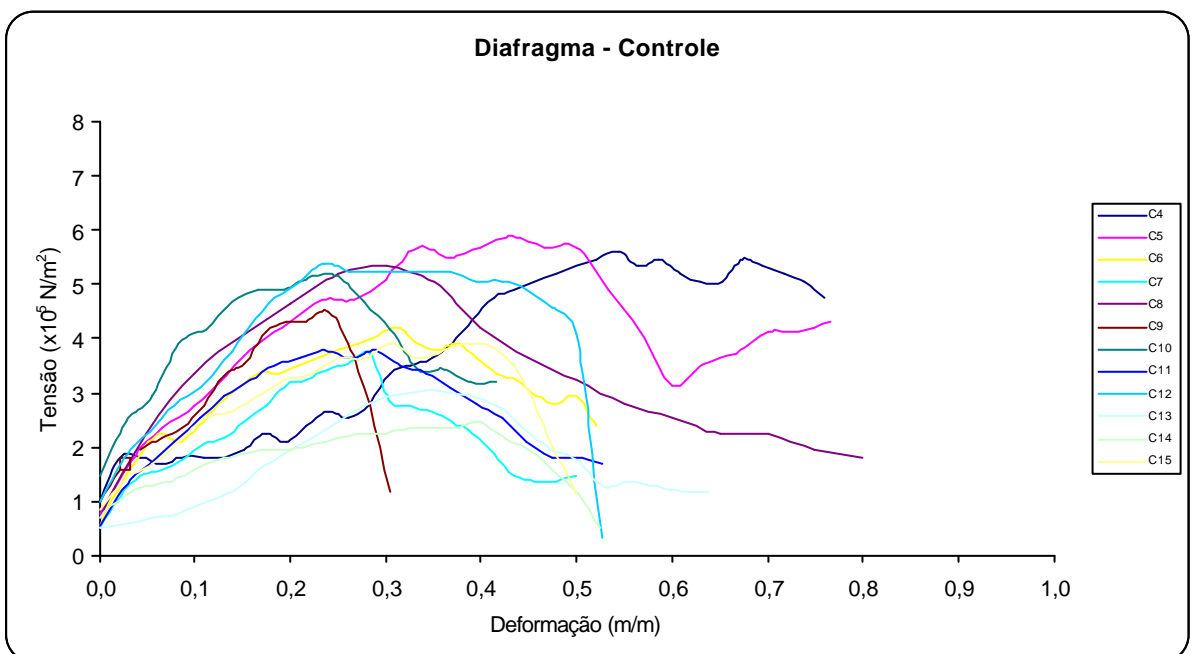


GRÁFICO B₂ – Curvas tensão \times deformação dos ensaios mecânicos de tração dos diafragmas do grupo controle.

TABELA C₁ – Valores das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração dos corpos de prova dos diafragmas do grupo experimental.

<i>Animais</i>	<i>Limite Máximo</i>		<i>Limite Proporcional</i>		<i>Módulo de elasticidade (x 10⁵) N/m</i>
	<i>Tensão (x 10⁵) N/m²</i>	<i>Deformação (m/m)</i>	<i>Tensão (x 10⁵) N/m²</i>	<i>Deformação (m/m)</i>	
04	4,90	0,27	3,91	0,15	19,13
05	4,31	0,22	3,74	0,15	17,39
06	3,27	0,22	1,78	0,08	16,30
07	4,70	0,32	4,17	0,24	13,59
08	4,53	0,62	3,30	0,44	8,33
09	4,76	0,30	3,71	0,17	16,25
10	2,94	0,19	1,90	0,07	16,33
11	1,63	0,39	1,52	0,30	3,78
12	5,88	0,40	4,09	0,16	17,58
13	4,90	0,34	4,29	0,25	14,03
14	4,76	0,35	4,38	0,29	10,32
15	6,86	0,28	5,14	0,12	26,41
<i>Média</i>	<i>4,45</i>	<i>0,33</i>	<i>3,50</i>	<i>0,20</i>	<i>14,95</i>
<i>E. P.</i>	<i>0,39</i>	<i>0,03</i>	<i>0,33</i>	<i>0,03</i>	<i>1,65</i>

TABELA C₂ – Valores das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração dos corpos de prova dos diafragmas do grupo controle.

<i>Animais</i>	<i>Limite Máximo</i>		<i>Limite Proporcional</i>		<i>Módulo de elasticidade (x 10⁵) N/m</i>
	<i>Tensão (x 10⁵) N/m²</i>	<i>Deformação (m/m)</i>	<i>Tensão (x 10⁵) N/m²</i>	<i>Deformação (m/m)</i>	
04	5,32	0,60	4,76	0,40	13,81
05	5,88	0,26	4,35	0,20	17,73
06	3,92	0,27	2,26	0,07	24,64
07	3,72	0,28	3,22	0,20	11,30
08	5,32	0,30	3,33	0,10	25,71
09	4,51	0,24	4,00	0,18	10,99
10	5,14	0,22	3,90	0,10	24,76
11	3,78	0,24	2,95	0,13	15,87
12	5,39	0,24	1,82	0,18	20,32
13	3,04	0,33	2,76	0,29	11,34
14	2,45	0,40	1,76	0,13	6,99
15	3,92	0,31	3,33	0,19	12,45
<i>Média</i>	<i>4,37</i>	<i>0,31</i>	<i>3,20</i>	<i>0,18</i>	<i>16,33</i>
<i>E. P.</i>	<i>0,31</i>	<i>0,03</i>	<i>0,28</i>	<i>0,03</i>	<i>1,81</i>

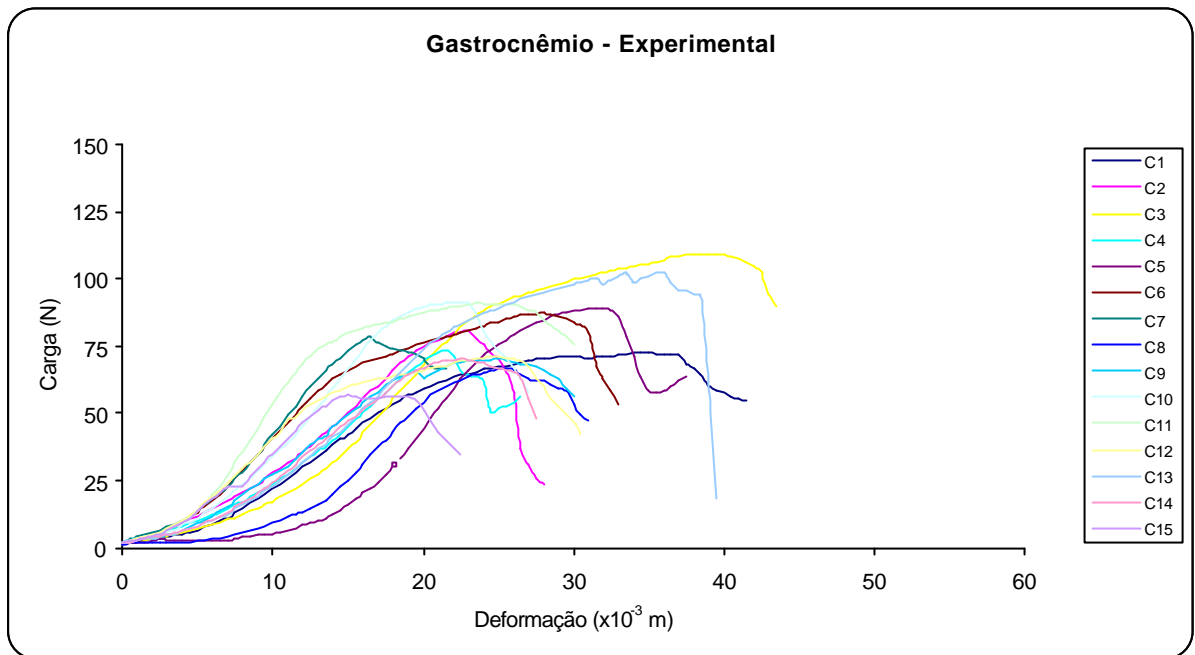


GRÁFICO D₁ – Curvas carga \times deformação dos ensaios mecânicos de tração dos músculos gastrocnêmio do grupo experimental.

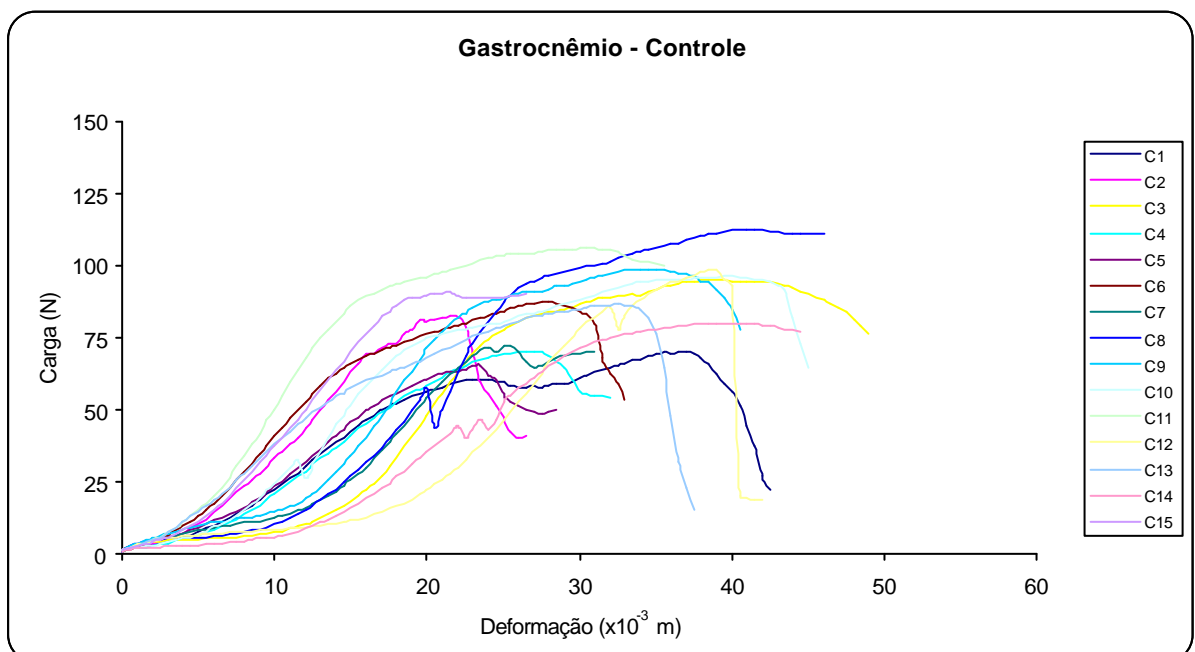


GRÁFICO D₂ – Curvas carga \times deformação dos ensaios mecânicos de tração dos músculos gastrocnêmio do grupo controle.

TABELA E₁ – Valores das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração dos corpos de prova do músculo gastrocnêmio do grupo experimental.

<i>Animais</i>	<i>Limite Máximo</i>		<i>Limite Proporcional</i>		<i>Rigidez</i> (x 10 ³ N/m)
	<i>Carga</i> (N)	<i>Deformação</i> (x 10 ⁻³ m)	<i>Carga</i> (N)	<i>Deformação</i> (x 10 ⁻³ m)	
01	78,81	35,00	53,60	18,00	3,77
02	80,65	23,00	74,10	19,60	5,29
03	109,47	38,50	83,30	22,80	5,79
04	73,40	21,50	72,20	20,60	4,73
05	89,38	31,50	65,70	23,10	6,91
06	87,32	28,00	62,00	13,50	5,82
07	78,40	16,50	63,00	13,10	6,17
08	66,64	25,00	53,60	20,00	5,51
09	70,27	25,00	63,00	17,80	4,26
10	91,34	22,00	81,50	17,20	6,67
11	91,04	23,50	63,00	11,20	7,96
12	71,25	24,50	54,50	12,67	4,85
13	101,36	33,00	78,20	20,59	5,64
14	70,07	22,50	89,10	14,60	4,71
15	56,74	15,00	52,70	13,07	4,77
<i>Média</i>	<i>81,08</i>	<i>25,63</i>	<i>67,30</i>	<i>17,19</i>	<i>5,52</i>
<i>E. P.</i>	<i>3,61</i>	<i>1,69</i>	<i>3,06</i>	<i>1,01</i>	<i>0,28</i>

TABELA E₂ – Valores das propriedades mecânicas obtidas do ensaio de tração dos corpos de prova do músculo gastrocnêmio do grupo controle.

<i>Animais</i>	<i>Limite Máximo</i>		<i>Limite Proporcional</i>		<i>Rigidez</i> (x 10 ³ N/m)
	<i>Carga</i> (N)	<i>Deformação</i> (x 10 ⁻³ m)	<i>Carga</i> (N)	<i>Deformação</i> (x 10 ⁻³ m)	
01	69,97	36,50	53,70	17,60	4,32
02	82,32	21,50	70,40	16,00	5,86
03	94,70	39,50	69,40	23,10	6,76
04	70,50	27,00	55,50	18,40	4,11
05	65,60	23,50	50,00	16,50	3,95
06	82,91	34,50	61,10	13,30	5,68
07	71,74	24,00	64,80	21,60	5,88
08	112,50	41,00	90,70	25,10	6,30
09	98,80	34,50	76,00	20,40	7,00
10	96,33	39,50	66,70	17,60	5,51
11	106,23	30,50	78,70	13,50	7,98
12	98,20	39,00	78,20	28,50	6,46
13	86,24	33,00	57,10	14,60	4,06
14	80,16	39,50	72,70	30,10	3,64
15	90,85	21,50	85,40	17,40	5,95
<i>Média</i>	<i>87,13</i>	<i>32,33</i>	<i>68,69</i>	<i>19,58</i>	<i>5,56</i>
<i>E. P.</i>	<i>3,64</i>	<i>1,85</i>	<i>3,08</i>	<i>1,34</i>	<i>0,33</i>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTONI, E ; SANT'AMBROGIO. The diaphragm – In: **The respiratory muscles – mechanics and neural control**, Philadelphia and London, W.B. Saunders Company, 1970, cap. 6, p. 145
- AFIFI, A.K. ; BERGMAN, R.A. Steroid myopathy : a study of the evolution of the muscle lesion in rabbits. **Johns Hopkins Med J** , Baltimore, v.124, n.6, p.66-86, 1969.
- ASKARI, A.; VIGNOS, P.J.; MOSKOWITZ, R.W. Steroid myopathy in connective tissue disease. **Am J Med**, New York, v.61, OCTOBER, p.485-492, 1976.
- BALASUBRAMANIAM, P.; PRATHAP, K.; LUMPUR, K.; MALAYA. The effect of injection of hydrocortisone into rabbit calcaneal tendons. **J Bone Joint Surg**, Boston, v. 54B, n4, p. 729-34, 1972.
- BORIEK, A.M. ; RODARTE, J.R. Inferences on passive diaphragm mechanics from gross anatomy. **J Appl Physiol**, Washington, v.77 , n 5, p.2065-2070, 1994.
- CAPACCIO, J.D.; GALASSI, T.M.; HICKSON, C.H. Unaltered power and endurance following glucocorticoid-induced muscle atrophy. **Med Sci Sports Exerc**, Madison, v.17, n 3, p. 380-384, 1985.
- CARAZZATO, J.G.; CAMARGO, O.P.; BARROS Fo , T.E.P.; RODRIGUES, C.J. Estudo experimental das alterações histológicas e biomecânicas induzidas pela infiltração local de corticóide e anestésico. **Rev Bras Ortop**, Belo Horizonte, v.15, n 2, p. 61-65, 1980.
- CASABURI, R. Skeletal muscle function in COPD. **Chest**, Chicago, v. 117, n 5, p. 2678-2718, 2000, Suppl.
- CARVALHO, C.M.M. **Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético**. 2001.p.54 Dissertação de Mestrado em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- COOMES, E.N. Corticosteroid myopathy. **Ann Rheum Dis**, London, v.24,p. 465-472, 1965.
- CHIAVERINI, V.. **Tecnologia mecânica – Estrutura e propriedades: processos de fabricação**, São Paulo, MacGraw-Hill do Brasil, v. 1, p.67-88,.1979.
- CRONKITE, A.E. The tensile strength of human tendons. **Anat Rec**, New York, v. 64, n 2, p. 173-86, Suppl., 1936.
- CRISCO, J.J.; JOKL, P.; HEINEN, G.T.; CONNELL, M.D.; PANJABI, M.M. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology and histology. **Am J Sports Med**; Baltimore, v. 22, n. 5, p. 702-709, 1994.

CZERWINSKI, S.M.; KUROWSKI, T.G.; O'NEILL, T.M.; HICKSON, R.C. Initiating regular exercise protects against muscle atrophy from glucocorticoids. **J Appl Physiol**, Washington, v. 63, n. 4, p.1504-1510, 1987.

D'AGOSTINO, A.N. ; CHIGA, M. Cortisone myopathy in rabbits, a light and electron microscopic study. **Neurology**, Minneapolis, v. 16, p. 257-263, 1966.

DAVIDSSON, L. Tensile strength, rupture and regeneration of tendons. **Ann Chri Gynaec Fenn**, Helsinki, v.43, p. 61-6, 1954.

DEKHUIJZEN, P.N.R. ; DECRAMER, M. Steroid-induced myopathy and its significance to respiratory disease: a known disease rediscovered. **Eur Respir J**, Copenhagen, v. 5, p. 997-1003, 1992.

DEKHUIJZEN, P.N.R.; GAYAN-RAMIREZ, G.; de BOCK, V.; DOM, R.; DECRAMER, M. Triamcinolone and Prednisolone affect contractile properties and histopathology of the rat diaphragm differently. **J Clin Invest**, New Heaven, v. 92, p. 1534-1542, 1993.

ELLIS, J.T. Necrosis and regeneration of skeletal muscles in cortisone treated rabbits. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 32, p. 993-1013, 1956.

ENGEL, W.K.. The essentiality of histo and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. **Neurology**, Minneapolis, v. 12, p. 778-793, 1962

FALUDI, G; GOTLIEB. J.; MEYERS, J. Factors influencing the development of steroid-induced myopathies. **Ann NY Acad Sci**, New York, v. 138, p. 61-72, 1966.

FERGUSON, G.T.; IRVIN, C.G.; CHERNIACK, M. Effect of corticosteroids on diaphragm function and biochemistry in the rabbit. **Am Rev Respir Dis**, Baltimore, v. 141, p.156-163, 1990a

FERGUSON, G.T.; IRVIN, C.G.; CHERNIACK, M. (1990b). Effect of corticosteroids on respiratory muscle histopatology. **Am Rev Respir Dis**, Baltimore, v. 142, p. 1047-1052, 1990b.

FISHER, B.D.; BARACOS, V.E.; SHNITKA, T.K.; MENDRYK, S.W.; REID, D.C. Ultrastructural events following acute muscle trauma. **Med Sci Sports Exerc**, Madison, v. 22, p. 185-193, 1990

GARRET Jr., W.E.; SANFRAM, M.R.; SEABER, AV.; GLISSON, R.R.; RIBBECK, B.M. Biomechanical comparison of stimulated and nonstimulated skeletal muscle pulled to failure. **Am J Sports Med**, Baltimore, v. 15, p. 448-454, 1987

GARDINER, P.F. & EDGERTON, V.R. Contractile responses of rat fast twitch and slow-twitch muscles to glicocorticoid treatment. **Muscle Nerve**, New York, v. 2, p. 274-281, 1979.

GAUTHIER, G.F. ; PADYKULA, H.A. Cytological studies of fibers type in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm. **J Cell Biol**, New York, v. 28, p. 333-354, 1966.

GOLDBERG, AL. ; GOODMAN, H.M. Relationship between cortisone and muscle work in determining muscle size. **J Physiol**, London, v. 200, p. 667-675, 1969.

GREEN, H.J., REICHMANN, H. PETTE, D. Inter and intra – species comparisons of fiber type distribution and of succinate dehydrogenase activity in type I, IIa, and IIb fibers of mammalian diaphragm. **Histochemistry**; Berlin, New York, Springer-Verlag, v. 81, p. 67-73, 1984.

HICKSON, R.C.; KUROWSKI, T.T.; ANDREWS, G.H.; CAPACCIO, J.A.; CHATTERTON Jr., T. Glucocorticoid cytosol binding in exercise-induced sparing of muscle atrophy. **J Appl Physiol**, Washington, v. 60, n 4, p. 1413-1419, 1986.

IVERZUT, A.C.M. (1999). **Estudo morfológico e morfométrico de músculo bíceps braquial em indivíduos adultos**. Tese de Doutorado em Ciências, área de concentração: Patologia – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido muscular In: **Histologia Básica**: Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999, cap. 10, p. 159-178.

KELLY, M. ; RUBISTEIN, N.A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In ENGEL, A.G. ; FRANZINI-ARMOSTRONG, C.. **Myology – Basic and Clinical**. United States of America:MacGraw – Hill, Inc., 1994, cap. 4, p. 119-133.

KELSEN, S.G.; FERENGE, M.; KAPOOR, S. **J Appl Physiol**, Washington, v. 58, n. 4, p. 1354-1359, 1985.

KNOX, AJ.; MASCIE-TAYLOR, B.H.; MUERS, M.F. Acute hydrocortisone myopathy in acute severe asthma. **Thorax**, London, v. 41, p. 411-412, 1986.

LEVY, J.A.. **Doenças Musculares** – estudo clínico e diagnóstico. 1ª reimpressão Rio de Janeiro – São Paulo, Livraria Atheneu, 1984.

LIEU, F.K; POWERS, S.K.; HERB, R.A.; CRISWELL, D.; MARTIN, D.; WOOD, C.; STAINSBY, Chen, C.L. (1993). Exercise and glucocorticoid-induced diaphragmatic myopathy. **J Appl Physiol**, Washington, v. 75, n. 2, p. 763-771, 1993.

MacARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. Músculo Esquelético: Estrutura e Função . In. **Fisiologia do Exercício – Energia, Nutrição e Desempenho Humano**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,1998, cap. 18, p. 299-319.

MacFARLANE, I.A & ROSENTHAL, F.D. Severe myopathy after status asthmaticus. **The Lancet**, Boston, v. 17, SEPT. , p. 615, 1977.

MacLEAN, K. ; SCHURR, P.H. Reversible amyotrophy complicating treatment with fluocortisone. **The Lancet**, Boston, v. 1, p 701-703.,1959.

MacMASTER, P.E. Tendon and muscle ruptures. **J Bone Joint Surg**, Boston, v. 15, p. 705-22, 1933

MENEZES, D.F. . **Aplicação do ultra-som na lesão muscular aguda**. 1997.p. 41 Dissertação de Mestrado em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MOORE, B.J.; MILLER, M.J.; FELDMAN, H.A.; REID, M.B. Diaphragm atrophy and weakness in cortisone-treated rats. **J Appl Physiol**, Washington, v 67, n. 6, p. 2420-2426, 1989.

NAVA, S; GAYAN-RAMIREZ, G.; ROLLIER, H.; BISSCHOP, A.; DOM, R. de BOCK, V.; DECRAMER, M Effects of acute steroid administration on ventilatory and peripheral muscles in rats. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v 153, p 1888-1896, 1996.

NIKOLAOU, P.K.; MacDONALD, B.L. ; GLISSON, R.R.; SEABER A.V.; GARRET Jr., W.E. Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury. **Am J Sports Med**, Baltimore, v. 15, p. 9-14, 1987.

NOONAN, T.J. BEST, T.M.; SEABER, A.N.; GARRET Jr., W.E. Identification of a threshold for skeletal muscle. **Am J Sports Med**, Baltimore, v. 22, p. 257-261, 1994.

OXLUND, H. The influence of a local injection of cortisol of the mechanical properties of tendons and ligaments and the indirect effect on skin. **Acta Orthop Scand**, Kobenhavn, v. 51, p. 231-238., 1980.

OXLUND, H. ; MANTHORPE, R The biomechanical properties of tendon and skin as influenced by long term glucorticoid treatment and food restriction. **Biorheology**, Oxford, v. 19, p. 631-646, 1982.

PHELPS, D.; SONSTEGARD, D.A.; MATTHEWS, L.S. Corticosteroid injection effects on the biomechanical properties of rabbit patellar tendons. **Clin Orthop**, Philadelphia, v. 100, p 345-378. 1974.

RAMOS, R.S. Biomecânica: conceito atual. **Rev Bras Ortop**, São Paulo, v. 14, n. 4, p.141-143, 1979.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. O Sistema Endócrino. In: **Farmacologia, Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2001**, cap. 20, p.311-318.

ROSE, S.J.; ROTHSTEIN, J.M. Muscle biology and physical therapy. **Phys Ther**, Albany, v. 62, n. 12, p. 1754-1756, 1982

RUPPEL, G O Sistema Respiratório in : SCANLAN, C.L.; WILKINS, R.L.; STOLLER, J.K. **Fundamentos da Terapia Respiratória de Egan**. São Paulo: Editora , 2000 cap. 7, P. 155-157.

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Hormônio adrenocorticotrófico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: Goodman e Gilman - **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9ª ed.; México , MacGraw-Hill Interamericana Editores, AS de C.V.;1996, cap. 59, p.1092-93

SHEE, C.D. Risk factors for hydrocortisone myopathy in acute severe asthma. **Respir Med**, London, v. 84, p. 229-233, 1990.

SMITH, B. Histological and histochemical changes in the muscles of rabbits given the corticosteroid triamcinolone. **Neurology**, Minneappolis, v. 14, p.857-863, 1964

SOUZA, S.A. Ensaio de tração. In **Ensaio mecânicos de materiais metálicos**. 3ª ed. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, 1982, cap. 1, p. 3-58.

SRÉTER, F.A. & WOO, G. Cell water, sodium and potassium in red and white mammalian muscle. **Am J Physiol**, Washington, v 205 , n .6, p. 1290-1294, 1963.

STEIN, J.M. ; PADYKULA, H.A. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. **Amer J Anat**, Philadelphia, v 110, p. 103-115, 1962.

VAN MARLE, W ; WOODS, K.L.. Acute hydrocortisone myopathy. **Br Med.J**, London, v 281, p. 271-272, 1980

VAN BALKON, R.H.H.; VAN DER HEIJDEN, H.F.M.; van MOERKERK, H.T.B.; VEERKAMP, J.H.; FRANSEN, J.A.M.; GINSEL, L.A.; FOLGERING, H.T.M; van HERDWAARDEN, C.L.A.; DEKHUIJZEN, P.N.R. Effects of different treatment regimens of methylprednisolone on rat diaphragm contractility, immunohistochemistry and biochemistry. **Eur Respir J**, Copenhagen, v 9; p 1217-1223, 1996.

VAN BALKON, R.H.H.; DEKHUIJZEN, P.N.R.; VAN DER HEIJDEN, H.F.M.; FOLGERING, H.T.M.; FRANSEN. J.A.M.; van HERWAARDEN, C.L.A. Effects of anabolic steroids on diaphragm impairment induced by methylprednisolone in emphysematous hamsters. **Eur Respir J**, Copenhagen, v 13, p 1062-1069, 1999.

VIGNOS, P.J. ; GREENE, R. Oxidative respiration of skeletal muscle in experimental corticosteroid myopathy. **J Lab Clin Med**, St. Louis, v 81, p 365-378, 1973.

WELSH, R.P.; MACNAB, I.; F.R.C.S.; F.R.C.S. (C); RILEY, V.; ENG, P.; CANTAB. Biomechanical studies of rabbit tendon. **Clin Orthop**; Philadelphia, v 81, p. 171-177, 1971.

WILLIAMS, T.J.; O'HEHIR, R.E.; CZURUY, D.; HORNE, M.; BOWES, G. Acute myopathy in severe acute asthma treated with intravenously administered corticosteroids. **Am Rev Respir Dis**; Baltimore, v 137, p. 460-463. 1988.