

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

REGINA INÊS KUNZ

EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO E REMOBILIZAÇÃO POR NATAÇÃO E SALTO EM  
MEIO AQUÁTICO SOBRE A MORFOLOGIA DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL E  
DOS MÚSCULOS SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR DE RATOS

CASCADEL-PR  
Fevereiro/2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

REGINA INÊS KUNZ

EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO E REMOBILIZAÇÃO POR NATAÇÃO E SALTO EM  
MEIO AQUÁTICO SOBRE A MORFOLOGIA DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL E  
DOS MÚSCULOS SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de Concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini

---

Assinatura do Orientador(a):

CASCADEL-PR

Fevereiro/2014

1 DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO (CIP)

Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362

K98e Kunz, Regina Inês  
Efeitos da imobilização e remobilização por natação e salto em meio aquático sobre a morfologia da articulação talocrural e dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos / Regina Inês Kunz.— Cascavel, PR: UNIOESTE, 2014.  
30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro  
Co-orientador: Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.  
Bibliografia.

1. Terapia aquática. 2. Músculo esquelético. 3. Cartilagem. 4. Articulação do tornozelo. 5. Articulação sinovial. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 615.853

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

REGINA INÊS KUNZ

**Efeitos da imobilização e remobilização por natação e salto em meio aquático  
sobre a morfologia da articulação talocrural e dos músculos sóleo e tibial  
anterior de ratos**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

---

Prof. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE (Orientadora)

---

Prof. Dra. Sonia Maria Marques Gomes Bertolini  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof. Dra. Célia Cristina Leme Beu  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Aprovada em:

Local da defesa:

Ao meu lindo avô, Egidio, que em algum lugar está sorrindo!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela dádiva da vida e por ouvir todas as minhas orações.

Aos meus amados pais, Newton e Vera, que mesmo longe são o meu maior incentivo. Muito obrigada por me ensinarem a ser humilde e correta. É por vocês que eu vou vencendo e construindo um bom caminho! Amo vocês!

Aos meu irmão Vilson e à Cris, pelos almoços divertidos de domingo, quando a pausa se fazia necessária!

À minha querida avó Wilma, muito obrigada por todas as orações! E pelas “comidinhas” de vó nas rápidas visitas!

Ao meu namorado Vinícius, que tantas vezes pacientemente somente soube ouvir e dizer que “tudo vai dar certo”. Muito obrigada por ter acompanhado de perto esses dois anos, me apoiando incondicionalmente e torcendo por mim.

À minha querida orientadora, professora Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro. Muito obrigada pelos ensinamentos e orientações que muitas vezes transcenderam o aspecto científico. Obrigada por ter acreditado em mim e embarcado nesse “barco” comigo, sabendo que ele poderia encontrar marés um pouco mais tumultuadas do que o habitual. Agora, chegamos ao porto!

Ao meu co-orientador, professor Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini, muito obrigada pelos ensinamentos e pelas dúvidas sanadas entre um atendimento e outro!

À professora Dra. Rose Meire Costa Brancalhão, que tantas vezes me permitiu “roubar” alguns minutos do seu tempo com intermináveis dúvidas. Muito obrigada por todos os ensinamentos e por acreditar no meu potencial!

À professora Dra. Ednéia Fátima Brambilla Torquato e à Celeste da Rocha Paiva, muito obrigada por todos os ensinamentos, principalmente nos momentos de apuro!

Às professoras Dra. Célia Cristina Leme Beu e Dra. Sonia Maria Marques Gomes Bertolini, membros da banca, pela disponibilidade e ensinamentos!

Aos amigos da Fisioterapia: Josi, Lígia, Bruno, Camila, Ana, Thiago, Tati e Giovanni. Domingos e feriados passados na companhia dos “ratinhos” sempre foram mais divertidos com vocês. Muito obrigada por toda a ajuda!

Ao pessoal do Labef: Mayarha, Jéssica, Sóstenez, Marilúcia, Thiago, Wellington, Juliana, Bruno e Adriana, muito obrigada pelos ensinamentos nas rotinas laboratoriais, pelos favores prestados, e por encararem, junto comigo, as dificuldades encontradas pelo caminho. Mas, acima de tudo, obrigada pelos ótimos momentos de distração, regados a bolo da padaria e muitas risadas!

Ao programa de pós-graduação em Biociências e Saúde e Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que torceram e acreditaram,

Muito Obrigada!

“Aprendi que todas as formas de conhecimento são transitórias e que elas só têm real valor quando utilizadas em benefício dos seres e de tudo o que existe no campo universal. Todavia de nada vale todo o conhecimento do mundo se não houver AMOR”.

Alcione Leite da Silva

## RESUMO GERAL

A imobilização é uma modalidade terapêutica utilizada no tratamento de distúrbios musculoesqueléticos que com frequência causa alterações morfológicas teciduais, as quais podem ser revertidas pela remobilização. Este estudo analisou o efeito da imobilização e da remobilização sobre parâmetros morfológicos da articulação talocrural e dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar*. Foram utilizados 18 ratos machos, que tiveram seu membro posterior direito imobilizado por 15 dias, e divididos em 3 grupos: G1, somente imobilizados; G2, remobilizados livremente por 14 dias; e G3, remobilizados em meio aquático por 14 dias, realizados em dias alternados com progressão de tempo e série dos exercícios. O membro contralateral foi utilizado como controle. Após o período experimental, as articulações talocrurais, direitas (imobilizadas/remobilizadas) e esquerdas (controle), e os músculos sóleo e tibial anterior foram processados para análises em microscopia de luz. Para a análise da articulação talocrural, nos cortes sagitais foram identificados três campos de interesse distintos, sendo: P1, extremidade articular anterior (próxima as falanges); P2, região média da articulação; P3, extremidade articular posterior. A histomorfometria não revelou diferenças significativas entre os grupos e os membros, controle e imobilizado/remobilizado, no número de condrócitos e na espessura da cartilagem articular da tibia e do tálus. A análise morfológica de G1 evidenciou lesões degenerativas mais significativas no tálus, como exposição do osso subcondral, floculações e fissuras, entre as regiões anterior e média da cartilagem articular; bem como na membrana sinovial. A remobilização por exercícios em meio aquático, apresentou efeitos positivos na recuperação da articulação do tornozelo, quando comparada com a remobilização livre. Nos músculos, a imobilização produziu alterações significativas sobre os parâmetros histomorfométricos do sóleo e, no tibial anterior, causou alteração somente na massa muscular. No entanto, verificou-se alterações na sua morfologia, que apresentou fibras polimórficas e em necrose, assim como alterações no tecido conjuntivo. A natação combinada com o salto em meio aquático aumentaram o menor diâmetro da fibra do músculo sóleo. Tanto a remobilização livre quanto por associação dos exercícios aumentaram a massa e o comprimento muscular do tibial anterior, bem como melhoraram seus aspectos morfológicos.

**Palavras-chave:** Terapia aquática, músculo esquelético, cartilagem, articulação do tornozelo, articulação sinovial.

## GENERAL ABSTRACT

Immobilization is a therapeutic modality that is used in the treatment of musculoskeletal disorders, which often cause tissue morphological changes, and which can be reversed by remobilization. This study examined the effects of immobilization and remobilization on morphological parameters of the ankle joint and the soleus and tibialis anterior muscles of Wistar rats. Eighteen male rats had their right hind limb immobilized for 15 days. They were divided into the following 3 groups: G1, simply immobilized; G2, remobilized freely for 14 days; and G3, remobilized by exercises in water, performed on alternate days with progression in terms of the time and number of exercises. The contralateral limb was used as control. After the experimental period, the ankle, right (immobilized/remobilized) and left (control) joints, and the soleus and tibialis anterior muscles were processed for analysis using light microscopy. For the analysis of the ankle, three fields of distinct interest were identified in the sagittal section as follows: P1, anterior articular extremity (near the phalanges); P2, middle region of the joint; P3, posterior articular extremity. Histomorphometry revealed no significant differences between the groups and members, control and immobilized/remobilized, in terms of the number of chondrocytes and the thickness of the articular cartilage of the tibia and the talus. The morphological analysis of G1 showed the most significant degenerative lesions in the talus, such as exposure of the subchondral bone, flocculation and cracks between the middle and anterior regions of the articular cartilage, as well as the synovial membrane. Remobilization by exercises in water showed positive effects on the recovery of the ankle joint, compared with free remobilization. In the muscles, immobilization produced significant changes in the morphometric parameters of the soleus; in the tibialis anterior it only caused a change in muscle mass. However, there were changes in the morphology of the tibialis anterior, which showed polymorphic fibers and necrosis, as well as changes in the connective tissue. Swimming, combined with jumping in water, increased the smallest diameter of the fiber of the soleus muscle. Both free remobilization, and remobilization using exercises, increased the mass and the length of the tibialis anterior muscle, as well as its morphology.

**Keywords:** Aquatic therapy, skeletal muscle, cartilage, ankle joint, synovial joint.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagem esquemática dos componentes da articulação sinovial.....	17
Figura 2: Zonas da cartilagem articular .....	20
Figura 3: Articulação talocrural humana.....	22
Figura 4: Articulação talocrural de rato.....	22
Figura 5: Organização do sarcômero .....	24
Figura 6: Esquema dos músculos tibial anterior e sóleo de rato. ....	26
Figura 7: Imobilização do membro posterior direito.....	33
Figura 8: Exercício de natação.....	34
Figura 9: Exercício de salto em meio aquático.....	35
Figura 10: Áreas de mensuração na articulação talocrural. ....	37
Figura 11: Mensuração da espessura da cartilagem articular. ....	37
Figura 12: Contagem de condrócitos da cartilagem articular. ....	38
Figura 13: Mensuração do menor diâmetro da fibra muscular. ....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm – Micrômetro

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA – Analysis of Variance

Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetro

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

g – Grama

G1 – Grupo Imobilizado

G2 – Grupo Imobilizado e remobilizado livremente

G3 – Grupo Imobilizado e remobilizado por exercícios terapêuticos

GAGs – Glicosaminoglicanas

H/E – Hematoxilina e eosina

Kg – quilogramas

LABEF – Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional

LELRF – Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos

mg – Miligramas

mm – Milímetro

P1 – Extremidade articular anterior

P2 – Região média da articulação

P3 – Extremidade articular posterior

PGs – Proteoglicanas

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

TCA – Ácido Tricloroacético

UEM – Universidade Estadual de Maringá

UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

USA – Estados Unidos da América

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Geral.....	14
2.2	Específicos.....	14
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	Interdisciplinaridade.....	15
3.2	Articulações Sinoviais.....	16
3.3	Articulação Talocrural.....	21
3.4	Músculo Estriado Esquelético.....	23
3.5	Imobilização e remobilização.....	26
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	Caracterização da amostra.....	31
4.2	Protocolo de imobilização.....	32
4.3	Protocolo de remobilização.....	33
4.4	Eutanásia dos animais e coleta das amostras.....	35
4.5	Preparo das lâminas e análise histológica.....	36
4.6	Análise estatística.....	39
5	REFERÊNCIAS.....	40
6	ARTIGO 1.....	49
7	ARTIGO 2.....	67
8	ARTIGO 3.....	89
9	ANEXOS.....	103
9.1	Normas para publicação da Brazilian Journal of Medical and Biological Research.....	103
9.2	Normas para publicação da Revista Brasileira de Medicina do Esporte.....	112
9.3	Normas para publicação na Publicatio UEPG – Ciências Biológicas e da Saúde.....	115
9.4	Parecer de aprovação do projeto.....	118

## **EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO E REMOBILIZAÇÃO POR NATAÇÃO E SALTO EM MEIO AQUÁTICO SOBRE A MORFOLOGIA DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL E DOS MÚSCULOS SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR DE RATOS**

### **2 INTRODUÇÃO GERAL**

Na realização de movimentos corporais é necessário que haja uma relação harmônica entre os segmentos do corpo e, neste sentido, as articulações que unem o esqueleto, associadas aos músculos atuantes sobre essa junta, permitem a ampla capacidade de movimento em diferentes velocidades e direções. Dessa forma, a ocorrência de lesões ou doenças que atingem as articulações e os músculos envolvidos no movimento, se traduzem em algum grau de incapacidade funcional, caracterizada por: dificuldades no autocuidado (vestir-se, alimentar-se, banhar-se); maior risco de acidentes e lesões do aparelho locomotor (pela instabilidade articular e declínio da força muscular); descondicionamento cardiovascular e respiratório; e diminuição do metabolismo (DEL DUCA; SILVA; HALLAL, 2009; FIMS, 1998).

Os distúrbios musculoesqueléticos atingem indivíduos de todas as faixas etárias. Idosos e pessoas de meia idade, muitas vezes, têm sua capacidade funcional afetada por episódios de osteoartrose e osteoartrite, que levam à dor e perda da mobilidade. O avanço da idade é acompanhado por uma diminuição da eficiência dos sistemas sensoriais, que associado à redução da força e elasticidade muscular, bem como com a fragilidade óssea, podem tornar o indivíduo susceptível a fraturas (CRUZ et al., 2012; MATOS; ARAUJO, 2009; VANWANSEELE; LUCCHINETTI; STUSSI, 2002).

Já na população de 15 a 35 anos, a entorse da articulação talocrural ou do tornozelo, principalmente em inversão, é uma lesão de alta incidência que afeta a mobilidade do indivíduo (RENSTRÖM; LYNCH, 1999). Essa faixa etária, considerada economicamente ativa, é também aquela que mais sofre fraturas por acidentes automobilísticos, das quais aproximadamente 65% acometem os membros inferiores (ARRUDA et al., 2009).

Muitos desses distúrbios musculoesqueléticos são, comumente, tratados por períodos de imobilização, seja como forma de tratamento conservador ou pós procedimento cirúrgico. Essa medida terapêutica pode, porém, levar a adaptações

estruturais e funcionais dos ligamentos, tendões, estruturas capsulares, cartilagem articular e músculos envolvidos (BARONI et al., 2010).

Por possuir uma elevada capacidade de adaptação estrutural e funcional, a chamada plasticidade neuromuscular, a massa e a composição muscular são diretamente relacionadas com a função muscular, podendo ser reguladas de acordo com a carga de trabalho, a atividade ou condições patológicas (HOOD et al., 2006; LIMA et al., 2007; ZHANG; CHEN; FAN, 2007). Com base na literatura, a imobilização pode levar a adaptações nos músculos envolvidos com o segmento corporal imobilizado.

Os efeitos da imobilização sobre a articulação do joelho têm sido amplamente investigados (ANDO et al., 2010; ANDO et al., 2012; ANDO et al., 2011; DEL CARLO et al., 2007; GALVÃO et al., 2006). Cabe ressaltar a importância da articulação talocrural, ou articulação do tornozelo, que é formada pelos terços distais dos ossos da tíbia e fíbula com o osso tálus, sobre a biomecânica corporal. Além de ser responsável pelo suporte do peso do corpo na posição ereta, a articulação talocrural desempenha papel importante no desenvolvimento da marcha e no amortecimento de impactos (BOGART; ORT, 2008; BONO; BERBERIAN, 2001). Dessa forma, torna-se de fundamental importância um estudo que busque analisar os efeitos da imobilização sobre essa articulação, bem como sobre os músculos sóleo e tibial anterior, diretamente envolvidos em sua biomecânica, responsáveis pela flexão plantar e dorsal, respectivamente, da articulação talocrural.

Apesar de alguns indivíduos retomarem sua funcionalidade normal em curto período de tempo após a lesão do tornozelo é possível que haja o aparecimento de sinais e sintomas residuais (BRAUN, 1999). Assim, embora a imobilização possa representar um tratamento necessário nas lesões mais graves, pode levar a novas lesões, como entorses recorrentes e limitação funcional persistente. Desta forma, a compreensão da relação entre uso/desuso e degeneração articulares representa uma etapa importante na tentativa de desenvolver estratégias de prevenção e tratamento de doenças articulares (VANWANSEELE; LUCCHINETTI; STUSSI, 2002; VENOJÄRVI et al., 2004).

Braun (1999) sugere que uma reabilitação mais extensa, incluindo o período pós-imobilização, baseada em exercícios terapêuticos que maximizem a recuperação articular, ajuda a reduzir a probabilidade de sintomas residuais e prevenir novas lesões. Nesse sentido, diversos estudos experimentais sobre

técnicas e exercícios de remobilização são descritos na literatura (ANDO et al., 2012; ANDO et al., 2011; DEL CARLO et al., 2007; GALVÃO et al., 2006; MORIMOTO et al., 2013; POLIZELLO et al., 2011; ROCHA et al., 2010), tanto para reestabelecer a funcionalidade e morfologia muscular quanto articular. Apesar disso, ainda, não há um modelo ideal de remobilização que permita ao músculo e aos constituintes da articulação sinovial retornar às suas características morfológicas do momento pré-imobilização. Dessa forma, justifica-se o estudo de um protocolo composto pela combinação de exercício aeróbico, representado pela natação, e exercício resistido, o salto, sobre a capacidade reparadora da articulação talocrural e musculatura associada após um período de imobilização.

A presente dissertação é composta por três artigos científicos. O artigo 1 foi intitulado: Efeitos da imobilização e remobilização sobre a articulação do tornozelo em ratos *Wistar*, e encaminhado a *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. O artigo 2 ficou intitulado como: Efeitos da imobilização e remobilização sobre os músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar*, submetido à *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. O artigo 3, intitulado: Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos, foi aceito pelo Corpo Editorial da revista *Publicatio UEPG – Ciências Biológicas e da Saúde*.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Analisar os efeitos da imobilização, remobilização livre e remobilização por associação de exercícios terapêuticos em meio aquático sobre a morfologia da articulação talocrural e dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar*.

#### **3.2 Específicos**

- Analisar os efeitos da imobilização e remobilização na cartilagem articular e membrana sinovial.
- Quantificar os condrócitos e mensurar a espessura da cartilagem da articulação talocrural.

- Mensurar a massa, menor diâmetro e o comprimento muscular do sóleo e tibial anterior.

## **4 REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1 Interdisciplinaridade**

A descoberta dos primeiros registros escritos há cerca de seis milênios permitiu que a humanidade acumulasse saberes, que foram e ainda são sistematizados como conhecimentos. Ao longo do tempo, a geração de conhecimento passou por mudanças, culminando com a revolução científica do século XVII, no que se conhece por ciência moderna. Com o advento dessa nova concepção, os conhecimentos passaram a ser fundamentados por comprovações, estudos e pesquisas que cientificamente reconhecidos, permitem que essa nova teoria revele a verdade sobre o fenômeno (RIOS et al., 2007).

Neste contexto, a ciência é utilizada na tentativa de satisfazer às necessidades humanas e como um instrumento que permite um controle prático sobre a natureza (KÖCHE, 1997). Compreendendo-se que tanto o homem, quanto a natureza estão em constante modificação é necessário que o conhecimento seja frequentemente redimensionado, ou seja, questionado, possibilitando a renovação e reconstrução contínua da ciência (RIOS et al., 2007).

O conhecimento científico atinge todas as áreas do saber, inclusive a saúde. No Brasil, a pesquisa em saúde sempre recebeu destaque, desde a criação dos institutos de saúde no século XIX, passando pela fase acadêmica propiciada pela criação da Universidade de São Paulo em 1934, e a criação do CNPq<sup>1</sup> (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) em 1951. Merece destaque o distanciamento que se vem operando entre as pesquisas em saúde e as políticas de saúde desde então, traduzido no afastamento entre a temática da pesquisa e as necessidades de saúde da população (GUIMARÃES, 2004).

Esse distanciamento entre saberes, tão evidenciado na área da saúde, levou a uma nova etapa de desenvolvimento do conhecimento, a interdisciplinaridade.

---

<sup>1</sup> Na data de sua criação, CNPq foi a sigla utilizada para designar o “Conselho Nacional de Pesquisas” que, em 1974, foi transformado em “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”, sendo preservada sua sigla.

Esta justifica-se pela complexidade dos problemas atualmente vivenciados, aproximando-nos de um conhecimento humano, mesmo que não integralmente, ao menos convergindo conhecimentos particulares (JAPIASSU, 1976).

Na área da saúde torna-se claro a complexidade existente entre fatores físicos, emocionais, psíquicos, ambientais, sociais e culturais. Compreendendo-se que o movimento é uma característica inerente do ser humano, a capacidade e a liberdade de executar movimentos que geram conforto, traduz-se em bem-estar e na capacidade funcional do indivíduo. Uma motricidade equilibrada realça o corpo, valoriza o autoconceito e a autoestima, criando uma relação produtiva e saudável com o meio ambiente e com as pessoas a sua volta, traduzindo-se em saúde (DANTAS et al., 2002).

Segundo Japiassu (1976), a interdisciplinaridade não deve ser considerada somente no plano do conhecimento e na formulação de suas teorias, mas também no domínio da ação e da efetiva intervenção na realidade social e humana. De acordo com essa afirmação, o desenvolvimento do trabalho permitirá a geração de conhecimento a partir principalmente da formulação de seus resultados, permitindo que médicos, fisioterapeutas e educadores físicos, bem como os demais profissionais da saúde, com base nos conhecimentos obtidos, desenvolvam um melhor plano de intervenção ao paciente, tanto para a indicação da imobilização como medida terapêutica quanto durante a escolha do protocolo de exercícios para a remobilização.

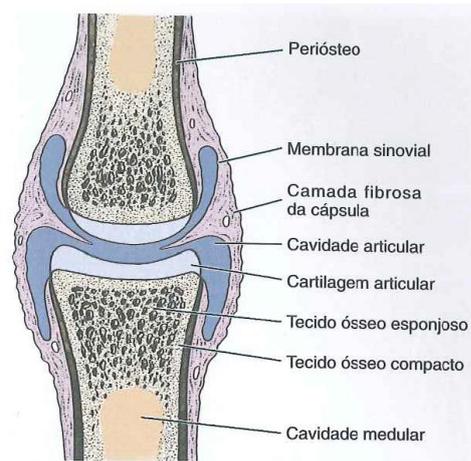
## **4.2 Articulações Sinoviais**

O arcabouço do corpo é formado pelo esqueleto, que é o conjunto de ossos e cartilagens que se interligam pelas articulações, permitindo assim a mobilidade corporal. As articulações são divididas em três tipos, de acordo com a natureza do elemento que se interpõe entre as peças que se articulam: articulações fibrosas (tecido conjuntivo fibroso); articulações cartilagíneas (tecido cartilaginoso) e articulações sinoviais (líquido sinovial) (DÂNGELO; FATTINI, 2007).

As articulações sinoviais estão presentes, principalmente, nos membros, como é o caso da articulação talocrural. Permitem o movimento livre dos ossos, sendo chamadas diartroses, e estão relacionadas à amplitude de movimento relativamente grande. Estas articulações são um sistema biológico complexo

composto de células altamente especializadas, provenientes de vários tipos de tecidos, como o hematopoiético e mesenquimal (HUI et al., 2012; IWANAGA et al., 2000).

A articulação sinovial saudável é composta pela cápsula articular, cartilagem articular, membrana sinovial, líquido sinovial presente no interior da cavidade articular e elementos anexos associados, como os ligamentos capsulares, presentes em algumas articulações sinoviais (figura 1) (HUI et al., 2012).



**Figura 1:** Imagem esquemática dos componentes da articulação sinovial (Adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A parede da cápsula articular, que é responsável pela junção das peças esqueléticas, é composta de duas camadas bastante distintas: uma externa mais espessa, composta por tecido conjuntivo denso chamada camada fibrosa, e uma interna, a membrana sinovial, cuja função primária é a produção de líquido sinovial e remoção de restos celulares e de tecido conjuntivo da cavidade articular (HUI et al., 2012; IWANAGA et al., 2000; OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

A membrana sinovial é constituída por uma camada íntima, na qual encontram-se muitas células modificadas de tecido conjuntivo, os sinoviócitos. Estes podem ser do tipo A, semelhantes a macrófagos, correspondendo a 20-30% das células de revestimento, cuja função é a remoção de materiais particulados. Há, ainda, os sinoviócitos tipo B, semelhantes a fibroblastos, presentes em maior número (75-80%) na íntima sinovial, responsáveis pela secreção de glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas. Esses sinoviócitos organizam-se em duas ou três camadas de células voltadas para a cavidade articular, podendo apresentar pregas ou vilos, que aumentam a área de superfície (BARLAND;

NOVIKOFF; HAMERMAN, 1962; IWANAGA et al., 2000; OVALLE; NAHIRNEY, 2008; SHIKICHI et al., 1999).

A subíntima, subjacente à íntima sinovial, é formada por tecido conjuntivo frouxo, podendo ser do tipo areolar, adiposa ou fibrosa. No tipo areolar, a camada íntima é relativamente espessa e a subíntima é formada por um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos. No tipo adiposo, há uma camada íntima única e achatada enquanto a matriz contém células adiposas. Já no tipo fibroso, a camada de sinoviócitos também é fina e a matriz é formada por colágeno denso. Numerosos capilares fenestrados são encontrados em todos os tipos de subíntima sinovial, de forma que o sangue extravasado pode rapidamente interagir com o líquido sinovial em caso de lesões articulares (IWANAGA et al., 2000; OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

O líquido sinovial é principalmente um ultrafiltrado de plasma sanguíneo proveniente dos capilares da subíntima sinovial, com moléculas adicionais secretadas pelos sinoviócitos tipo B para o interior do espaço sinovial da articulação. O líquido sinovial humano normal, de aspecto claro, pálido-amarelado e viscoso, contém um número relativamente pequeno de células (HUI et al., 2012; IWANAGA et al., 2000; ROPES; ROSSMEISL; BAUER, 1940).

A lubrificação das superfícies da cartilagem articular pelo líquido sinovial é mediada por vários lubrificantes, que são macromoléculas sintetizadas e secretadas pelas populações de células sinoviais. Dentre estas, merece destaque o ácido hialurônico, que é uma GAG não sulfatada, responsável pela característica viscosa do líquido sinovial, com propriedades lubrificantes importantes tanto em condições estáticas quanto dinâmicas (HUI et al., 2012; OGSTON; STANIER, 1953).

O tecido cartilaginoso, que também está presente nas articulações sinoviais, é um constituinte do esqueleto, sendo caracterizado em uma forma especializada de tecido conjuntivo de consistência rígida, derivado do mesênquima embrionário. A cartilagem desempenha várias funções, como suporte estrutural de tecidos moles, reveste as superfícies articulares e, é essencial à formação e crescimento dos ossos longos. É um tecido que não apresenta suprimento sanguíneo, nervoso e linfático, sendo os capilares localizados no pericôndrio ou o líquido sinovial, os responsáveis pela nutrição desse tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

Algumas diferenças no aspecto histológico e nas propriedades da matriz extracelular permitem classificar a cartilagem em três tipos: hialina, elástica e

fibrocartilagem. A cartilagem hialina, o tipo mais comum, está presente no feto, formando um esqueleto provisório; na criança e no adolescente compondo as placas epifisárias de crescimento; nas cartilagens costais; como parte do esqueleto nasal, na laringe, traqueia e brônquios; e, além disso, está presente revestindo as superfícies articulares das articulações sinoviais, onde é chamada de cartilagem articular (GENESER, 2003; OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

A cartilagem articular que recobre as extremidades dos ossos longos em cada articulação sinovial cumpre duas funções: serve como superfície de apoio ao deslizamento entre os ossos, devido ao papel lubrificante do líquido sinovial e também transmite a carga de um osso para o seguinte dentro da articulação, minimizando assim a concentração de força (BRANDT, 2003).

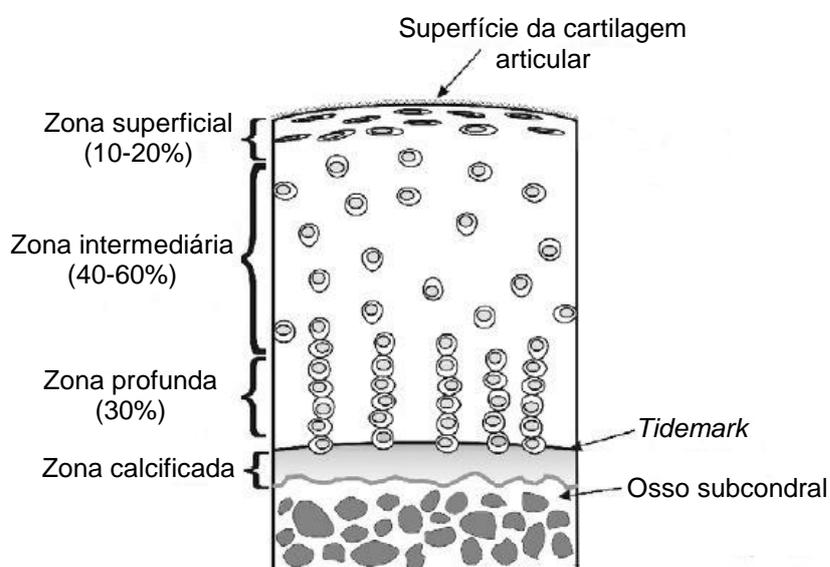
Na cartilagem articular os condrócitos, que são as células adultas que constituem o tecido, estão dispersos em um grande volume de matriz extracelular, composta por 70-75% de água, 15-20% por colágeno (principalmente do tipo II) que fornece a força tênsil e os proteoglicanos (PGs) em 2-10%, responsáveis pela resistência a pressões (OVALLE; NAHIRNEY, 2008; WATRIN et al., 2001).

Todos os componentes da matriz extracelular são sintetizados e mantidos pelos condrócitos. A água e os sais inorgânicos dão à cartilagem a capacidade de elasticidade e lubrificação. Colágenos, PGs e proteínas não-colagênicas compõem as macromoléculas estruturais da matriz. As PGs da matriz são carregadas negativamente e sustentam grandes quantidades de íons positivamente carregados associados às moléculas de água. As GAGs são carboidratos complexos ligados a uma proteína central, compondo as PGs. Essas PGs formadas por GAGs sulfatadas (condroitino-sulfato, dermatan-sulfato e queratan-sulfato, principalmente) associam-se ao ácido hialurônico (uma GAG não-sulfatada) para formar grandes agregados de PGs, os agregans (OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

Os condrócitos estão, frequentemente, organizados em pares ou grupos de quatro a seis células, denominados grupos isógenos. A matriz cartilaginosa secretada pelos condrócitos pode ser dividida em dois tipos, de acordo com a localização: a matriz territorial que é rica em GAGs sulfatadas e circunda imediatamente os condrócitos; e a matriz interterritorial, mais rica em fibrilas de colágeno tipo II e localizada entre os condrócitos (OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

A cartilagem articular adulta pode ser dividida em quatro regiões distintas (figura 2): 1- zona superficial, onde as fibras de colágeno tipo II são orientadas

tangencialmente à superfície, proporcionando resistências às tensões; 2 - Zona de transição (ou intermediária), onde as forças de cisalhamento dão lugar às forças de compressão, com o colágeno distribuído obliquamente e contendo grande quantidade de PGs; 3 - Zona profunda (ou radial), onde as fibras de colágeno se dispõem de forma vertical e a carga é distribuída de forma a resistir à compressão; 4 - Zona de cartilagem calcificada, caracterizada por uma linha basofílica (*tidemark*) que demarca a fronteira entre a cartilagem calcificada e a não-calcificada. Cada uma dessas regiões distingue-se nas características morfológicas dos condrócitos, na distribuição das células no interior da matriz extracelular e na atividade metabólica (SIMON; JACKSON, 2006; WATRIN et al., 2001).



**Figura 2:** Zonas da cartilagem articular (Adaptado de SIMON; JACKSON, 2006).

A densidade celular e a organização dos condrócitos variam de acordo com a profundidade da cartilagem articular madura. Essa característica parece ser fundamental na manutenção da homeostase do tecido (JADIN et al., 2005).

A zona superficial desempenha papel vital na manutenção da saúde da cartilagem articular, pois funciona como superfície de baixo atrito que resiste à tração e distribui idealmente as cargas, protegendo a cartilagem subjacente (SCHUMACHER et al., 2002).

Na zona superficial, a densidade celular é maior e as células são dispostas em aglomerados horizontais, estando as lacunas achatadas no sentido paralelo à superfície. Na zona profunda, os condrócitos encontram-se em menor densidade e

geralmente isolados, presentes em lacunas mais arredondadas. Essa mudança no formato celular ocorre de forma correspondente no núcleo (GENESER, 2003; SCHUMACHER et al., 2002).

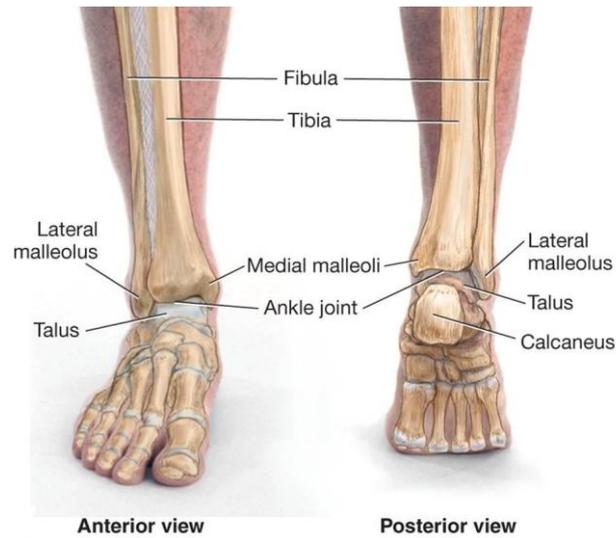
O metabolismo da matriz extracelular, bem como a densidade e organização dos condrócitos sofrem importantes alterações durante o processo de crescimento e maturação (JADIN et al., 2005).

A absorção e redistribuição das forças compressivas são adaptações frente às demandas funcionais, sendo responsáveis pelo desenvolvimento morfológico da cartilagem articular e manutenção da sua homeostase (VANWANSEELE; LUCCHINETTI; STUSSI, 2002).

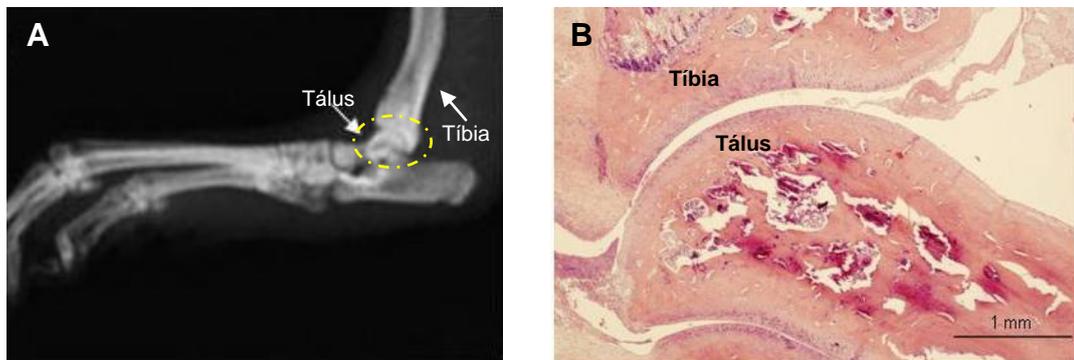
Como explanado anteriormente, todos os componentes da articulação sinovial desempenham funções específicas, permitindo uma adequada amplitude de movimento. Devido à sua importância, traumas, lesões, doenças ou alterações de outra natureza que afetem a cápsula articular, cartilagem articular ou a membrana sinovial podem acarretar prejuízos articulares, o que levará a uma diminuição da movimentação articular, traduzidas em perdas na capacidade funcional do indivíduo.

### **4.3 Articulação Talocrural**

O membro inferior é estruturado de tal forma que se tornou especializado no suporte de peso corporal na posição vertical e locomoção bípede, onde se destacam as articulações do quadril, do joelho e talocrural ou do tornozelo. A articulação talocrural (figuras 3 e 4) compreende uma sindesmose distal entre a tíbia e a fíbula e um encaixe formado pelos terços distais dos ossos da tíbia e fíbula com o osso tálus, sendo uma articulação sinovial tipo gínglimo, e seus movimentos primários são a flexão (flexão plantar), extensão (flexão dorsal), inversão e eversão (BOGART; ORT, 2008; BONO; BERBERIAN, 2001; LUNDBERG et al., 1989).



**Figura 3:** Articulação talocrural humana (TIETZ, 2013).



**Figura 4:** Articulação talocrural de rato. Em A, radiografia em perfil lateral da articulação talocrural e, em B, fotomicrografia em corte sagital da articulação talocrural, coloração em hematoxilina-eosina (Adaptado de TSAI et al., 2007).

A anatomia óssea é responsável pela estabilidade da articulação talocrural na posição neutra. Essa estabilidade óssea é incrementada pelas cargas compressivas advindas da manutenção da posição ereta. Durante a movimentação, os ligamentos, que constituem as partes moles da articulação, passam a desenvolver o papel de estabilizadores. Realizando esta função estabilizadora, lateralmente existem os ligamentos talofibular anterior, calcaneofibular e o talofibular posterior, e medialmente, o ligamento deltoide, constituído pelos ligamentos tibiotalares anterior e posterior, tibioalcâneo e tibionavicular (RENSTRÖM; LYNCH; 1999).

Dentre as articulações que suportam peso, o tornozelo tem a menor área de superfície. Todas as atividades, dentre elas a deambulação, podem produzir tensões de 1,25 a 5,5 vezes o peso normal do corpo através da articulação talocrural, o que

corresponde ao dobro da força suportada pelo joelho ou quadril em humanos (CARR; TRAFTON, 1998 *apud* MANDI, 2012).

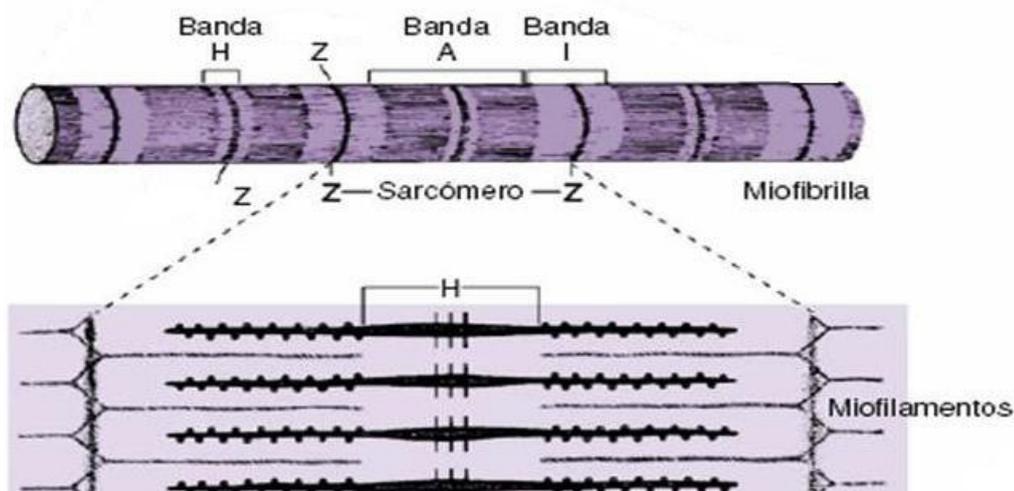
#### 4.4 Músculo Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético totaliza 40-50% da massa corporal e tem como funções: manter a integridade do esqueleto, locomoção, postura e permite a realização de atividades de vida diária (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; HARRIDGE, 2007; POWERS; SMUDER; CRISWELL, 2011; SATO et al., 2011).

Microscopicamente, as fibras musculares esqueléticas são longas, estreitas e multinucleadas. Seus núcleos localizam-se periféricamente na fibra, abaixo da membrana plasmática (BERCHTOLD; BRINKMEIER; MUNTENER, 2000; DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007). O diâmetro das fibras pode variar de 10 a 100 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), e o comprimento pode chegar até 10 centímetros (cm), dependendo da arquitetura muscular (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007).

Os músculos esqueléticos estão organizados por estruturas altamente ordenadas, os sarcômeros, que são associados em série para formar as miofibrilas. A organização dos sarcômeros é responsável pela característica estriada do músculo (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

O sarcômero (figura 5) possui cerca de 2,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e é delimitado pelas linhas Z, discos escuros e transversais que ancoram os filamentos delgados (contém actina). No centro do sarcômero está presente a linha M, composta por proteínas arranjadas de forma hexagonal que ligam os filamentos espessos (contém miosina). Essa arquitetura sarcomeral forma as bandas, sendo a banda I (isotrópica à luz polarizada) localizada na extremidade do sarcômero, formada somente pelos filamentos delgados; a banda A (anisotrópica à luz polarizada) está localizada na região central e compreende os filamentos espessos e delgados. No centro da banda A observa-se uma fina faixa mais clara, a banda H, que contém somente filamentos espessos (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; OVALLE; NAHIRNEY, 2008).



**Figura 5:** Organização do sarcômero (Adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Diferentes tipos de fibras podem ser distinguidos em cada músculo. Essa heterogeneidade das fibras musculares, com características genéticas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas, é que permite que um mesmo músculo possa desempenhar atividades de baixa intensidade (postura), contrações submáximas repetidas (locomoção) e contrações máximas fortes e rápidas (saltar) (BERCHTOLD; BRINKMEIER; MUNTENER, 2000; CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

Inicialmente as fibras musculares foram classificadas em vermelhas, intermediárias e brancas, de acordo com a quantidade do pigmento mioglobina e do grau de vascularização de cada músculo. Em seguida, de acordo com a reação para a atividade da ATPase da porção globular da miosina, as fibras foram classificadas em tipo I, IIA e IIB. A análise histoquímica para as atividades das enzimas mitocondriais permite ainda classificar a fibra muscular em fibra: de contração lenta e metabolismo oxidativo; de contração rápida e metabolismo glicolítico; e de contração rápida e de metabolismo oxidativo e glicolítico (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005).

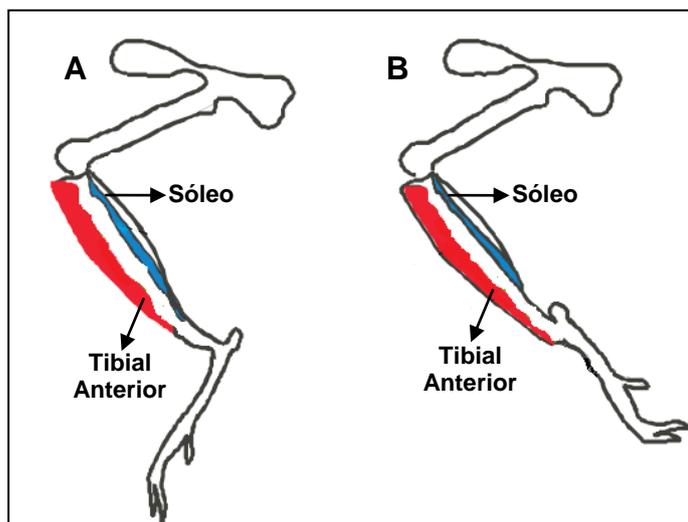
As fibras musculares são envoltas por uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, compondo o tecido conjuntivo muscular. Este pode ser dividido em três bainhas distintas: o epimísio, que envolve todo o músculo externamente; o perimísio, que divide o músculo em fascículos, cada um contendo várias fibras musculares; e o endomísio, que envolve cada fibra muscular individualmente. Os capilares que correm paralelamente ao eixo longitudinal da fibra

seguem o tecido conjuntivo para o interior do músculo, fornecendo o suprimento sanguíneo (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; GILLIES; LIEBER, 2011; OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

Os músculos que atuam sobre a articulação talocrural estão localizados na perna e separados em três compartimentos pelos septos intermusculares, ossos e membrana interóssea. No compartimento anterior encontram-se os músculos tibial anterior, extensor longo dos dedos, extensor longo do hálux e fibular terceiro, que são principalmente dorsiflexores do tornozelo, inversores do pé e extensores dos dedos do pé. Composto o compartimento lateral estão os músculos fibular longo e fibular curto, responsáveis principalmente pela eversão do pé. O compartimento posterior, responsável pela flexão plantar do tornozelo, inversão do pé e flexão dos dedos do pé, é dividido em grupo superficial, que contém os músculos gastrocnêmio, sóleo e plantar; e grupo profundo, onde estão os músculos flexor longo dos dedos, flexor longo do hálux, tibial posterior e poplíteo (age estabilizando a articulação do joelho) (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2010; KHALE; LEONHARDT; PLATZER, 2000; MOORE; DALLEY, 2001; RUSSO; MOREIRA, 2003).

Juntamente com as duas cabeças do músculo gastrocnêmio, o músculo sóleo (figura 6) forma o tríceps sural, cuja função é a flexão plantar da articulação talocrural. O sóleo localiza-se profundamente ao gastrocnêmio e é um músculo forte, grande, plano e antigravitacionário, com fibras predominantemente do tipo I (BERTOLINI; OLIVEIRA; CARARO, 2010) e inclinadas ífero-medialmente (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2010; MOORE; DALLEY, 2001).

Já o músculo tibial anterior (figura 6), antagonista do sóleo (DURIGAN et al., 2009), localiza-se no compartimento anterior da perna e é o mais forte dorsiflexor e inversor do pé. É composto principalmente por fibras do tipo IIB (FUJITA et al., 2011), responsáveis por contrações de curta duração e alta intensidade. Além disso, atua como suporte dinâmico do arco medial do pé durante a caminhada (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2010; MOORE; DALLEY, 2001).



**Figura 6:** Esquema dos músculos tibial anterior e sóleo de rato. Em A, posição neutra da articulação talocrural. Em B, posição de flexão plantar da articulação talocrural (Adaptado de SHAH et al., 2001).

#### 4.5 Imobilização e remobilização

A imobilização de algum segmento corporal é muitas vezes indicada como forma de tratamento conservador de injúrias musculoesqueléticas, quando não há indicação cirúrgica ou como medida auxiliar pós-cirúrgica. Patridge e Duthie (1963) afirmaram que a imobilização articular pode ser uma opção benéfica para os pacientes, diminuindo a dor, prevenindo danos futuros e mantendo a saúde de estruturas previamente lesadas. Brand (2003) completa, ainda, que a imobilização pode apresentar efeito condroprotetor, ou seja, proteger a cartilagem articular perante danos induzidos quimicamente.

Apesar de ser uma modalidade terapêutica, a imobilização afeta negativamente a composição óssea, a estrutura e composição muscular, a estrutura articular e até mesmo o suprimento sanguíneo do segmento imobilizado (ARAKAKI et al., 2011; BARONI et al., 2010; THAXTER; MANN; ANDERSON, 1965).

Grande parte dos estudos que analisam os efeitos da imobilização sobre as articulações são realizados em modelos animais, sendo suas generalizações para os seres humanos ainda vistos com ressalvas. Apesar disso, pesquisas experimentais permitem o surgimento de perguntas que, quando respondidas, aprimoram o conhecimento de médicos e profissionais da saúde, aperfeiçoando a reabilitação de humanos após períodos de imobilização das articulações sinoviais (BRANDT, 2003).

Os efeitos da imobilização sobre a musculatura esquelética e sobre as articulações têm sido estudados por meio de diversas técnicas não invasivas, como órteses de gesso, de resina acrílica e de algodão, suspensão do corpo e repouso no leito. Na literatura são também listadas algumas técnicas invasivas, como a desnervação, tenotomia e fixação articular por meio de pinos. Esse conjunto de técnicas tem possibilitado o estudo das alterações musculares e articulares provocadas pela imobilização (DURIGAN et al., 2005).

Mudanças mecânicas, bioquímicas e morfológicas têm sido descritas em estudos de imobilização articular animal, as quais nem sempre são totalmente reversíveis com a remobilização (VANWANSEELE; LUCCHINETTI; STUSSI, 2002).

O maior efeito verificado no tecido muscular submetido a períodos de imobilização é a atrofia muscular. Este processo parece ser altamente ordenado e regulado, caracterizado pela diminuição da área de secção transversa da fibra muscular e conteúdo proteico. Essas alterações resultam em redução da capacidade de produção de força, diminuição da ativação elétrica, aumento da fadigabilidade e resistência à insulina (BARONI et al., 2010; ZHANG; CHEN; FAN, 2007).

Além disso, a imobilização pode causar mudanças na relação força-comprimento de acordo com o comprimento em que o músculo é imobilizado (BARONI et al., 2010). Shah et al. (2001) constataram que o número de sarcômeros varia em resposta à perturbação crônica do comprimento, onde a imobilização em posição encurtada diminuiu sua quantidade, enquanto a posição alongada aumentou.

Baroni et al. (2010) relataram que a entorse de tornozelo, quando seguida por duas semanas de imobilização, afeta a funcionalidade dos músculos flexores dorsais e plantares. Dessa forma, conhecer os efeitos da imobilização e remobilização sobre os músculos sóleo e tibial anterior, intimamente relacionados com a biomecânica da articulação talocrural, pode ser fundamental na manutenção da capacidade funcional do indivíduo.

Thaxter, Mann e Anderson (1965), relataram que as mudanças histológicas que ocorrem nas articulações sinoviais de ratos após a imobilização são progressivas e, em 15 dias de imobilização, houve proliferação dos tecidos sinovial e conjuntivo, aderência das membranas articulares, necrose e ulcerações da cartilagem e do osso subcondral.

Lantz (1998) constatou que a imobilização por períodos prolongados pode causar ulcerações no tecido cartilaginoso, tais como perda de PGs, de massa e volume totais da cartilagem.

A composição e função do líquido sinovial são alterados em casos de lesão ou doença articular, devido tanto a alterações diretas do líquido quanto de mudanças nos tecidos da articulação sinovial. Como o líquido sinovial está em contato direto com a cartilagem, a membrana sinovial e, em algumas articulações, com meniscos e ligamentos, mediando as interações entre esses tecidos, qualquer alteração metabólica ou estrutural nestes pode refletir em mudanças na composição e função do líquido sinovial. Estas mudanças no líquido sinovial podem resultar em uma capacidade reduzida em lubrificar a cartilagem articular e formar um ambiente catabólico dentro da articulação, contribuindo para a deterioração desta. Dessa forma, alterações nos tecidos articulares levam o líquido sinovial a um estado anormal o que, por sua vez, contribui em exacerbar o estado patológico de toda a articulação (HUI et al., 2012).

Vários estudos mostram que a imobilização causa mudanças degenerativas na cartilagem articular, como redução de sua espessura, aumento da hidratação tanto da cartilagem quanto dos condrócitos, aparecimento de clones celulares, irregularidade das camadas celulares, diminuição do número de condrócitos, diminuição do conteúdo e síntese de proteoglicanos e aumento do número de células inflamatórias (ANDO et al., 2011; ARAKAKI et al., 2011; CATERSON; LOWTHER, 1978; HAGIWARA et al., 2009; IQBAL, 2012; IQBAL; KHAN; MINHAS, 2012; LEROUX et al., 2001; PALMOSKI; BRAND, 1981).

Ando et al. (2012), objetivaram verificar mudanças causadas na cápsula articular e na movimentação da articulação do joelho de ratos após a imobilização completa do joelho, de modo a simular o desuso da articulação. Após a retirada do aparato de imobilização, foi permitido aos ratos a movimentação livre por 16 semanas. Os autores verificaram que a imobilização a partir de uma semana já induziu mudanças histológicas irreversíveis na cápsula articular que podem restringir a movimentação da articulação do joelho de ratos.

Ando et al. (2010), estudaram os aspectos morfológicos da membrana sinovial após períodos distintos de imobilização. Os autores constataram que a imobilização por 2 semanas causou adesão e encurtamento da membrana sinovial e que após 8 e 16 semanas, essa área de adesão tornou-se fibrosa e hipocelular.

Dessa forma, as mudanças na membrana sinovial podem contribuir para o desenvolvimento de contraturas após períodos de imobilização articular.

No estudo de Portinho, Boin e Bertolini (2008), os ratos tiveram seu membro posterior esquerdo imobilizado em plantiflexão e em seguida foram submetidos a um período de 15 dias de remobilização livre na gaiola, associado a três séries diárias de alongamento do músculo sóleo esquerdo por 30 segundos. Os autores concluíram que a imobilização causa diminuição do número de osteócitos, mas não afeta a espessura da cartilagem articular nem o número de condrócitos. Esses achados persistiram mesmo após o período de remobilização.

Ainda, nos estudos de Del Carlo et al. (2007) e Galvão et al. (2006) a imobilização por 45 dias promoveu aumento da espessura da cápsula articular, perda de proteoglicanas da matriz cartilaginosa, aumento do número de condrócitos, dispostos de forma irregular, aumento da espessura da cartilagem calcificada, irregularidade da superfície articular, proliferação de tecido conjuntivo no espaço intra-articular, aumento da espessura do osso subcondral e degeneração das células sinoviais.

Assim, dados da literatura relatam que todos os tecidos que compõe a articulação sinovial podem sofrer alterações induzidas pela imobilização. Essas mudanças podem traduzir-se em maior dificuldade na manutenção das funções articulares, especialmente na articulação talocrural, onde poderá haver prejuízos na distribuição do peso corporal para os pés, dificuldade de movimentação durante a marcha e, em casos mais graves, incapacidade funcional do indivíduo.

Em geral, não há consenso entre os autores sobre quais procedimentos poderiam restaurar de maneira apropriada a funcionalidade das articulações sinoviais, visto que todos os componentes destas são, de alguma maneira, afetados pela imobilização.

Brandt (2003), acredita que possa ocorrer a reversão das alterações causadas pela imobilização. O autor postula que a imobilização esgota as proteoglicanas que compõe a matriz cartilaginosa, mas não danifica a rede de colágeno. Assim, quando a imobilização é retirada, reinicia-se a descarga de peso sobre a articulação e são secretadas novas moléculas de proteoglicanas no interior da matriz extracelular, restaurando a integridade biomecânica da cartilagem.

Diversas técnicas e terapias não cirúrgicas são usadas para controlar os sintomas e a incapacidade provenientes de lesões da cartilagem articular,

retardando as alterações degenerativas destas e, em alguns casos, revertendo as lesões. Além dos tratamentos farmacológicos, as técnicas não farmacológicas como modalidades de frio e calor, uso de órtese para descarga de peso, alterações de hábitos de vida, educação do paciente e a realização de exercícios físicos constituem estratégias eficazes no enfrentamento dessas lesões (SIMON; JACKSON, 2006).

Em contraste ao tratamento farmacológico, a perda de peso e os exercícios físicos, isentos de efeitos secundários, podem prever aumentos de movimento e força, e melhora do bem-estar, menor risco de queda e característica condroprotetora. Dessa forma, atuam reduzindo a sintomatologia sem apresentar toxicidade gastrointestinal, renal ou hepática, advindos dos medicamentos, além de abranger um número maior de pacientes (SIMON; JACKSON, 2006).

Diferentes técnicas e exercícios têm sido estudados na tentativa de reverter os danos celulares causados pela imobilização sobre os músculos esqueléticos, entre eles a corrida em esteira (MORIMOTO et al., 2013; NATALI et al., 2008), ultrassom terapêutico (CUNHA et al., 2012), alongamento passivo (MENON et al., 2007; ROCHA et al., 2010), estimulação elétrica neuromuscular (DURIGAN et al., 2009), remobilização livre (POLIZELLO et al., 2011). Quanto à tentativa de recuperação das lesões causadas sobre os constituintes da articulação sinovial, a natação (DEL CARLO et al., 2007; GALVÃO et al., 2006) e a remobilização livre (ANDO et al., 2012; ANDO et al., 2011; DEL CARLO et al., 2007; GALVÃO et al., 2006; SETTON et al., 1997) têm sido estudadas. Há também estudo sobre os efeitos da injeção intra-articular de derivados de ácido hialurônico e sulfato de condroitina sobre a capacidade reparadora da cartilagem articular e membrana sinovial (ANDO et al., 2008; MELO et al., 2008). Apesar desses achados, ainda não há um modelo ideal de remobilização que permita ao músculo e aos constituintes da articulação sinovial retornar às suas características morfológicas do momento pré-imobilização, o que, segundo Ando et al. (2011) pode ser devido aos diferentes tempos e métodos de imobilização, locais de mensuração e análise e diferentes espécies animais.

O exercício de salto foi utilizado como técnica de remobilização no estudo de Ju et al. (2008). O objetivo desta pesquisa foi analisar a arquitetura trabecular do fêmur de ratos que tiveram seus membros posteriores suspensos e posteriormente remobilizados com o exercício de salto. Os animais foram imobilizados por 14 dias e após a retirada da imobilização realizaram 10 saltos por dia, 5 vezes na semana por

5 semanas. Os autores concluíram que o exercício de salto restaurou a integridade trabecular e a massa óssea do fêmur, o que não foi observado com a remobilização livre.

Nos estudos de Del Carlo et al. (2007) e Galvão et al. (2006) a natação e a remobilização livre foram realizadas após um período de imobilização do joelho de ratos. Del Carlo et al. (2007) observaram que tanto a remobilização livre quanto o exercício de natação promoveram um menor aparecimento dessas alterações, enquanto no estudo de Galvão et al. (2006) a natação mostrou um efeito positivo na diminuição do aparecimento das alterações em comparação com a remobilização livre.

Como evidenciado nos estudos anteriormente citados, os efeitos da imobilização sobre a articulação do joelho estão bem descritos. Porém, são escassos os estudos sobre a articulação talocrural, o que justifica um estudo sobre os efeitos da imobilização sobre os elementos que constituem esta importante articulação do corpo humano. Da mesma forma, não há relatos na literatura sobre os efeitos de duas modalidades de exercícios terapêuticos associados, como forma de recuperação articular e muscular, justificando o estudo da associação entre natação e salto em meio aquático na remobilização da articulação talocrural e músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar* e sua comparação com a remobilização livre.

## **5 METODOLOGIA**

Este estudo classifica-se como uma pesquisa descritiva de caráter experimental (GIL, 2007), cujo objetivo geral é a descrição do fenômeno (efeitos da imobilização) e a relação entre as variáveis (diferentes maneiras de remobilização). Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos (LELRF) e no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF), laboratórios vinculados à UNIOESTE, Campus de Cascavel.

### **5.1 Caracterização da amostra**

Foram utilizados 18 ratos machos da linhagem *Wistar*, com  $10 \pm 2$  semanas de idade, peso aproximado de 280-350 gramas, obtidos do Biotério Central

UNIOESTE. Os animais foram mantidos em fotoperíodo claro-escuro de 12 horas e temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com água e ração *ad libitum*. Todos os animais tiveram seu membro posterior direito imobilizado e foram separados em três grupos experimentais, com seis ratos em cada grupo:

- G1: imediatamente eutanasiados após o período de imobilização;
- G2: remobilização livre na gaiola por 14 dias, e, além disso, os animais eram colocados em contato com a água<sup>2</sup> por aproximadamente 1 minuto, de maneira que recebessem o estímulo aquático diariamente;
- G3: remobilizados por 14 dias por meio de natação e salto em meio aquático, realizados em dias alternados, totalizando sete dias de tratamento com natação e sete dias de tratamento com salto.

Neste estudo os valores reportados para o membro esquerdo serviram como controle para verificação das adaptações ocorridas no membro direito (imobilizado/remobilizado), bem como realizado no estudo de Baroni et al. (2010). Todos os procedimentos metodológicos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE, sob o protocolo 03012 (anexo 4).

## 5.2 Protocolo de imobilização

Foi utilizado um aparato de imobilização (figura 7), confeccionado com material próprio para engessar um seguimento corporal, sendo o mesmo: ligadura de tecido saturada com sulfato de cálcio desidratado ( $\text{CaSO}_4$ ), sob a forma de pó branco, caracterizando uma atadura gessada. Todos os grupos experimentais tiveram a descrita órtese moldada diretamente no membro posterior direito de cada animal, sendo colocada em toda a extensão do membro de forma que este permaneceu em extensão da articulação do joelho bem como, flexão plantar completa de tornozelo, ou seja, em posição de encurtamento do músculo sóleo, a qual foi mantida na posição descrita acima por um período de 15 dias consecutivos.

---

<sup>2</sup> Os animais foram contidos manualmente e seu corpo mantido submerso na água.



**Figura 7:** Imobilização do membro posterior direito, mantendo a flexão plantar completa do tornozelo (seta) por meio de atadura gessada.

### 5.3 Protocolo de remobilização

Após a retirada do aparato de imobilização, os animais do grupo G2 foram apenas colocados em contato com a água, a 33° C, em um tanque (turbilhão) com capacidade de 220 litros, a fim de garantir o mesmo tratamento entre os grupos experimentais, minimizando diferentes respostas de estresse pela ação do contato com o meio aquático. Já os animais do G3 foram submetidos à remobilização, alternando exercícios de natação e salto em meio aquático, sendo que esses animais foram previamente treinados por 5 dias consecutivos antes do período de imobilização.

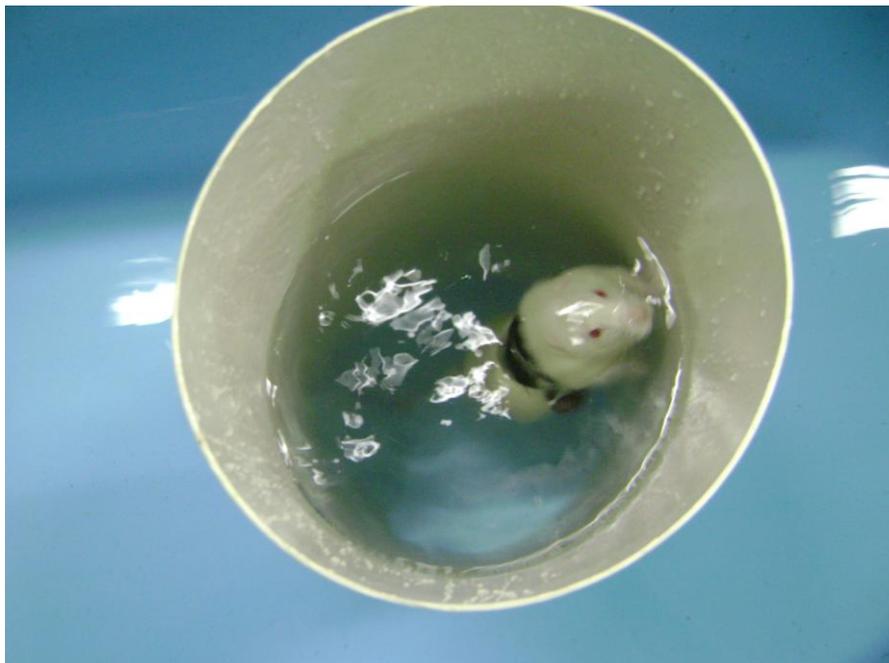
O mesmo tanque com capacidade de 220 litros, com temperatura de 33° C foi utilizado para a realização do protocolo no grupo G2 e o treinamento do G3. Nos seis primeiros dias de remobilização, a natação foi realizada durante 20 minutos e os saltos foram efetuados em duas séries de 10 saltos cada. Nos oito dias restantes de remobilização efetuou-se uma progressão quanto ao tempo e às séries dos exercícios realizados, sendo que o tempo de natação foi de 40 minutos e os saltos eram realizados em quatro séries de 10 saltos cada.

No exercício de natação, o animal executou movimentos nos membros anteriores e posteriores de forma a manter-se na superfície da água, simulando o nado *crawl* (figura 8). Para a execução do exercício de salto, foi colocado dentro do

tanque um tubo de forma cilíndrica com diâmetro de 30 cm e altura de 55 cm. Cada animal recebeu uma sobrecarga de 50% do peso corporal. Essa sobrecarga foi confeccionada com o uso de uma cinta de velcro posicionada na região abdominal, com pesos de chumbo presos com barbante, de acordo com o peso de cada animal. Assim, um animal por vez foi colocado dentro desse cilindro e, com a sobrecarga, este submergia e, ao atingir o fundo do tanque, realizava um impulso afim de alcançar a superfície, contabilizando um salto (figura 9) (GAFFURI et al., 2011).



**Figura 8:** Imagem mostrando o exercício de natação em tanque com água.



**Figura 9:** Imagem demonstrando a execução do exercício de salto em meio aquático.

#### **5.4 Eutanásia dos animais e coleta das amostras**

Os animais do G1, logo após o período de imobilização e os animais dos grupos G2 e G3, logo após a remobilização, foram pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (50mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10mg/Kg). Sob o efeito dos anestésicos, os animais eram decapitados em guilhotina. Em seguida, foram dissecadas e reduzidas as articulações talocrurais direitas (submetidas à imobilização) e esquerdas (controle), e colocadas em formol 10% para posterior análise histológica. Foram também coletados os músculos tibial anterior e sóleo, tanto direito quanto esquerdo. Previamente à fixação em formol 7%, esses músculos foram pesados em balança analítica de precisão (Shimadzu<sup>®</sup> - Japão) para obtenção da massa muscular fornecida em gramas (g). Os músculos foram também mensurados quanto ao comprimento máximo de repouso por meio de paquímetro digital (Digimess<sup>®</sup> - São Paulo/Brasil) para obtenção do comprimento muscular, fornecido em milímetros (mm).

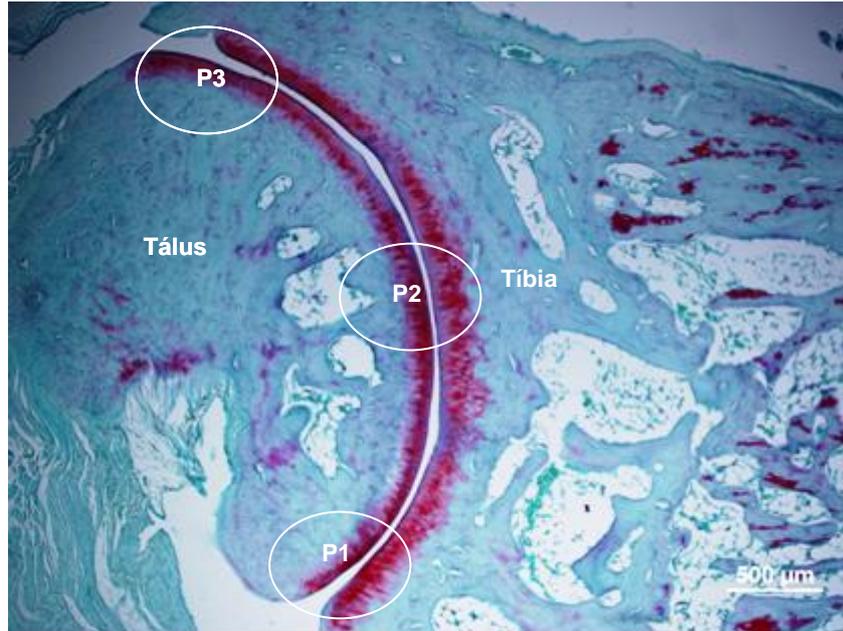
## 5.5 Preparo das lâminas e análise histológica

As articulações talocrurais, após a fixação, foram lavadas em água destilada e descalcificadas em ácido tricloroacético (TCA) a 5% por aproximadamente 5 dias. As amostras foram desidratadas por 1 hora e meia nos alcoóis 70, 80 e 90% e no 95%, *overnight*. No dia seguinte, passadas para o álcool 100% por 4 banhos de 1 hora cada.

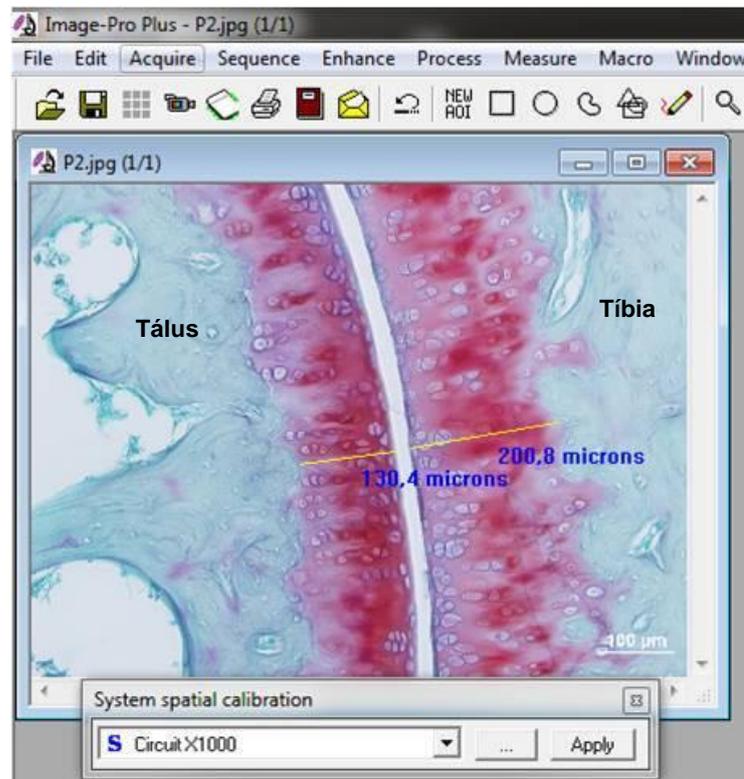
Em seguida, o material foi diafanizado, impregnado e incluído em parafina. Posteriormente, foi realizada a microtomia, com cortes de 7  $\mu\text{m}$  em micrótomo *Olympus* CUT 4055, e a coloração das lâminas em hematoxilina e eosina (H/E) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), para análise morfológica geral do tecido e coloração de safranina O-fast Green (ANDO et al., 2008), para análise da cartilagem articular.

Após a confecção das lâminas, as mesmas foram analisadas em microscópio de luz (*Olympus*<sup>®</sup>), onde os campos visuais de interesse foram fotomicrografados em microscópio *Olympus* DP71 para análise das características morfológicas dos tecidos articulares.

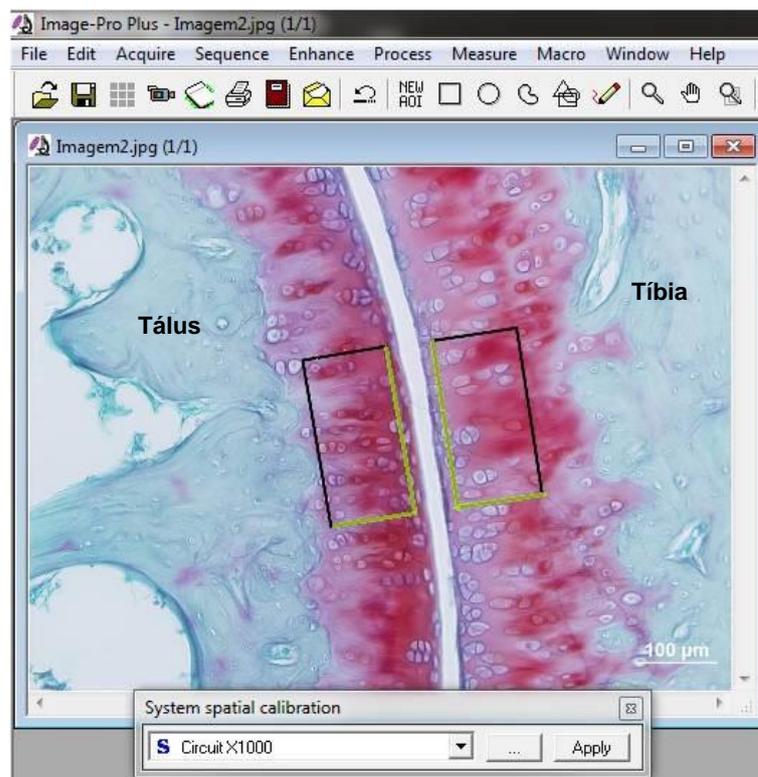
O protocolo de mensuração da espessura da cartilagem articular e do número de condrócitos foi adaptado de Ando et al. (2011) e Hagiwara et al. (2009). Para tanto, foram identificados três campos de interesse distintos (figura 10), sendo: P1, extremidade articular anterior (próxima as falanges); P2, região ântero-posterior média da articulação; P3, extremidade articular posterior. Essas áreas de interesse foram fotomicrografadas em aumento de 200 vezes e, com o auxílio do programa *Image Pro Plus 6.0*<sup>®</sup>, foi mensurada a espessura total da cartilagem nos três pontos, definida como a distância entre a superfície cartilaginosa e a junção osteocondral (figura 11). Para a contagem do número de condrócitos foi escolhida uma área de interesse (retângulo de 100  $\mu\text{m}$  de profundidade por 200  $\mu\text{m}$  de comprimento) que era sobreposta aos três pontos de análise, onde considerou-se como bordas de exclusão as margem superior e profunda (figura 12).



**Figura 10:** Imagem das áreas de mensuração na articulação talocrural. Corte sagital, coloração em Safranina O-Fast Green. P1 – extremidade articular anterior; P2 – região articular média; P3 – extremidade articular posterior.



**Figura 11:** Imagem da utilização do programa Image-Pro Plus 6.0 para a mensuração da espessura da cartilagem articular.

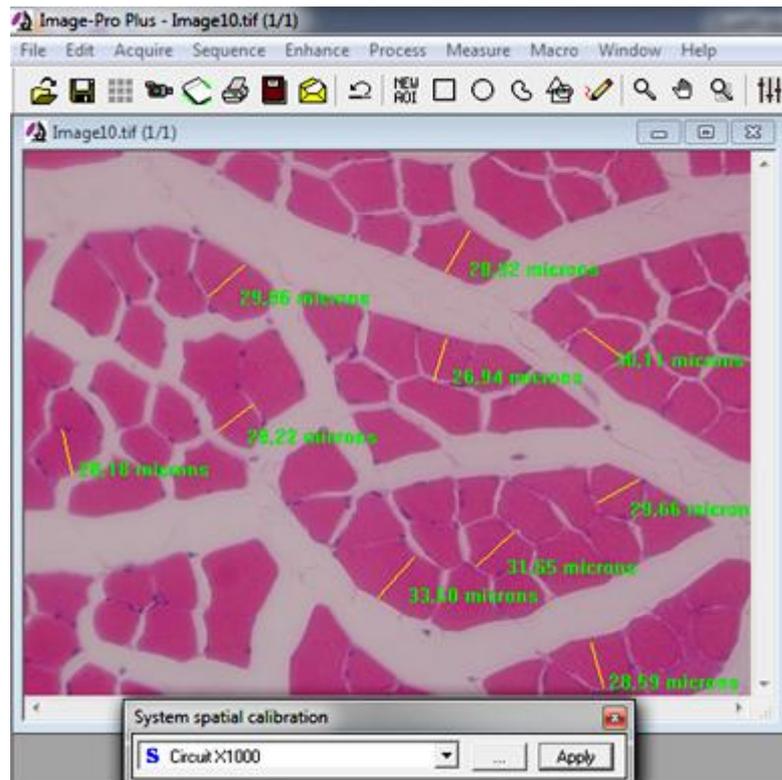


**Figura 12:** Imagem da utilização do programa Image-Pro Plus 6.0 para a contagem de condrócitos da cartilagem articular.

Na análise das lâminas, foram também observadas as características morfológicas da membrana sinovial, padronizando-se a região articular anterior como ponto de observação; da cartilagem articular, como presença de floculações na superfície articular, fissuras e organização celular; e, na cavidade articular foi analisada a presença de infiltrado sinovial e formação de *panus*.

Já os músculos sóleos e tibiais anteriores, após a fixação, foram armazenados em álcool 70% e seguiram o procedimento histológico de rotina para emblocamento em parafina. Foram obtidos cortes transversais de 7 µm das fibras musculares, corados em H/E (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Para a mensuração do menor diâmetro da fibra muscular (figura 13), dez áreas de interesse distintas de cada lâmina foram fotomicrografadas em aumento de 400x, sendo analisado o menor diâmetro de 10 fibras por foto, totalizando 100 fibras por músculo, utilizando-se o programa *Image-Pro Plus 6.0*® (USA), previamente calibrado.



**Figura 13:** Imagem da utilização do programa Image-Pro Plus 6.0 para a mensuração do menor diâmetro da fibra muscular.

## 5.6 Análise estatística

Os dados referentes aos efeitos da imobilização e remobilização sobre os músculos sóleo e tibial anterior, bem como os resultados histomorfométricos da tíbia e do tálus, foram analisados com auxílio do programa SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences) e apresentados em média e desvio-padrão. Para realizar a comparação dos diferentes grupos e lados em conjunto, foi utilizado ANOVA (Analysis of Variance) modelo misto, de acordo com as diferentes variáveis avaliadas. O nível de significância aceito foi 5%.

## 6 REFERÊNCIAS<sup>3</sup>

ANDO, A.; HAGIWARA, Y.; CHIMOTO, E.; HATORI, K.; ONODA, Y.; ITOI, E. Intra-articular injection of hyaluronan diminishes loss of chondrocytes in a rat immobilized-knee model. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 4, p.321-331, 2008.

ANDO, A.; HAGIWARA, Y.; ONODA, Y.; HATORI, K.; SUDA, H.; CHIMOTO, E.; ITOI, E. Distribution of type A and type B synoviocytes in the adhesive and shortened synovial membrane during immobilization of the knee joint in rats. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 221, n. 2, p. 161-168, 2010.

ANDO, A.; SUDA, H.; HAGIWARA, Y.; ONODA, Y.; CHIMOTO, E.; ITOI, E. Remobilization does not restore immobilization-induced adhesion of capsule and restricted joint motion in rat knee joints. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 227, n. 1, p. 13-22, 2012.

ANDO, A.; SUDA, H.; HAGIWARA, Y.; ONODA, Y.; CHIMOTO, E.; SAIJO, Y.; ITOI, E. Reversibility of immobilization-induced articular cartilage degeneration after remobilization in rat knee joints. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 224, n. 2, p. 77-85, 2011.

ARAKAKI, K.; KITAMURA, N.; KUROKAWA, T.; ONODERA, S.; KANAYA, F.; GONG, J. P.; YASUDA, K. Joint immobilization inhibits spontaneous hyaline cartilage regeneration induced by a novel double-network gel implantation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, p. 417-425, 2011.

ARRUDA, L. R. P.; SILVA, M. A. C.; MALERBA, F. G.; FERNANDES, M. C.; TURÍBIO, F. M.; MATSUMOTO, M. H. Fraturas expostas: estudo epidemiológico e prospectivo. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 326-330, 2009.

BARLAND, P.; NOVIKOFF, A. B.; HAMERMAN, D. Electron microscopy of the human synovial membrane. **The Journal of Cell Biology**, v. 14, p. 207-216, 1962.

BARONI, B. M.; GALVÃO, A. Q.; RITZEL, C. H.; DIEFENTHAELER, F.; VAZ, M. A. Adaptações neuromusculares de flexores dorsais e plantares a duas semanas de imobilização após entorse de tornozelo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.16, n. 5, p. 358-362, set/out. 2010.

---

<sup>3</sup> De acordo com a NBR 6023: informação e documentação: referências – elaboração. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Rio de Janeiro, 2002.

BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiological reviews**, v. 80, n. 3, p. 1215-1265, jul. 2000.

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

BOGART, B. I.; ORT, V. H. **Anatomia e Embriologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

BONO, C. M.; BERBERIAN, W. S. Orthotic devices: Degenerative disorders of the foot and ankle. **Foot and Ankle Clinics**, v. 6, n. 2, p. 329-340, 2001.

BRANDT, K. D. Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization. **Arthritis & Rheumatism**, v. 49, n. 2, p. 267-271, apr. 2003.

BRAUN, B. L. Effects of ankle sprain in a general clinic population 6 to 18 months after medical evaluation. **Archives of Family Medicine**, v. 8, p. 143-148, mar/apr. 1999.

CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2005.

CATERSON, B.; LOWTHER, D. A. Changes in the metabolism of the proteoglycans from sheep articular cartilage in response to mechanical stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 540, p. 412-422, 1978.

CRUZ, D. T.; RIBEIRO, L. C.; VIEIRA, M. T.; TEIXEIRA, M. T. B.; BASTOS, R. R.; LEITE, I. C. G. Prevalência de quedas e fatores associados em idosos. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 1, p. 138-146, 2012.

CUNHA, D. M.; NASCIMENTO, C. M.; ARTIFON, E. L.; FERRARI, D.; RIBEIRO, L. F. C.; FONTANESI, L. B.; BERTOLINI, G. R. F. Evaluation of rats' soleus muscle submitted to remobilization protocol with therapeutic ultrasound associated with static stretching. **Journal of Morphological Science**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 2012.

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, supl. especial, p. 21-31, 2007.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar: para o estudante de medicina**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007.

DANTAS, E. H. M.; PEREIRA, S. A. M.; ARAGÃO, J. C.; OTA, A. H. A preponderância da diminuição da mobilidade articular ou da elasticidade muscular na perda da flexibilidade no envelhecimento. **Fitness & Performance Journal**, v. 1, n. 3, p. 12-20, mai/jun. 2002.

DEL CARLO, R. J.; GALVÃO, M. R.; VILORIA, M. I. V.; NATALI, A. J.; BARBOSA, A. L. T.; MONTEIRO, B. S.; PINHEIRO, L. C. P. Imobilização prolongada e remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos: estudo clínico e microscópico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 363-370, 2007.

DEL DUCA, G. F.; SILVA, M. C.; HALLAL, P. C. Incapacidade funcional para atividades básicas e instrumentais da vida diária em idosos. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 5, p. 796-805, 2009.

DRAKE, R. L.; VOGL, A. W.; MITCHELL, A. W. M. **Gray's, Anatomia para Estudantes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; BOSI, P. L.; DELFINO, G. B.; MONTEBELO, M. I. L.; GUIRRO, R. R. J.; SILVA, C. A.; POLACOW, M. L. O. Metabolic and morphometric alterations inherent to neuromuscular electric stimulation in the antagonist muscle submitted to ankle joint immobilization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 85-91, 2009.

DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; POLACOW, M. L. O.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J. Modelos de desuso muscular e estimulação elétrica neuromuscular: aspectos pertinentes à reabilitação fisioterapêutica. **Fisioterapia em Movimento**, v. 18, n. 4, p. 53-62, 2005.

FIMS – Fédération Internationale de Médecine Sportive. Posicionamento Oficial: A inatividade física aumenta os fatores de risco para a saúde e a capacidade física. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 4, n. 2, p. 69-70, mar/abr. 1998.

FUJITA, N.; MURAKAMI, S.; ARAKAWA, T.; MIKI, A.; FUJINO, H. The combined effect of electrical stimulation and resistance isometric contraction on muscle atrophy in rat tibialis anterior muscle. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 74-79, 2011.

GAFFURI, J.; MEIRELES, A.; ROCHA, B. P.; ROSA, C. T.; ARTIFON, E. L.; SILVA, L. I.; MOREIRA, N. B.; BERTOLINI, G. R. F. Avaliação do exercício físico como fator de analgesia em um modelo experimental de cialgia. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 2, p. 115-118, mar/abr. 2011.

GALVÃO, M. R.; DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I. V.; NATALI, A. J.; BARBOSA, A. L.; MONTEIRO, B. S.; PINHEIRO, L. C. P.; DEL CARLO, K. N. Aspectos clínicos e morfofisiológicos do joelho de ratos após imobilização prolongada e remobilização. **Revista Ceres**, v. 53, n. 308, p. 495-505, jul/ago. 2006.

GENESER, F. **Histologia – Com Bases Biomoleculares**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GIL, A. C. Como elaborar Projetos de Pesquisa. In:\_\_\_\_\_. **Como Classificar as Pesquisas?** 4. ed. São Paulo: Atlas, 2007. cap. 4.

GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318-331, sep. 2011.

GUIMARÃES, R. Bases para uma política nacional de ciência, tecnologia e inovação em saúde. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 9, n. 2, p. 375-387, 2004.

HAGIWARA, Y.; ANDO, A.; CHIMOTO, E.; SAIJO, Y.; OHMORI-MATSUDA, K.; ITOI, E. Changes of articular cartilage after immobilization in a rat knee contracture model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, p. 236-242, 2009.

HARRIDGE, S. D. R. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to *in vivo* function. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 5, p. 783-797, sep. 2007.

HOOD, D. A.; IRRCHER, I.; LJUBICIC, V.; JOSEPH, A. M. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2265-2275, 2006.

HUI, A. Y.; MCCARTY, W. J.; MASUDA, K.; FIRESTEIN, G. S.; SAH, R. L. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. **WIREs Systems Biology and Medicine**, v. 4, p. 15-37, jan/feb. 2012.

IQBAL, K. Effects of immobilization on chondrocytes and pericellular matrix in articular cartilage of patella in rats. **Journal of Morphological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 8-11, 2012.

IQBAL, K.; KHAN, Y.; MINHAS, L. A. Effects of immobilization on thickness of superficial zone of articular cartilage of patella in rats. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 46, n. 4, p. 391-394, 2012.

IWANAGA, T.; SHIKICHI, M.; KITAMURA, H.; YANASE, H.; NAZAWA-INOUE, K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. **Archives of Histology and Cytology**, v. 63, n. 1, p. 17-31, 2000.

JADIN, K. D.; WONG, B. L.; BAE, W. C.; LI, K. W.; WILLIAMSON, A. K.; SCHUMACHER, B. L.; PRICE, J. H.; SAH, R. L. Depth-varying Density and Organization of Chondrocytes in Immature and Mature Bovine Articular Cartilage Assessed by 3D Imaging and Analysis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 53, n. 9, p. 1109-1119, sep. 2005.

JAPIASSU, H. Domínio do Interdisciplinar. In:\_\_\_\_\_. **Interdisciplinaridade e patologia do saber**. Rio de Janeiro: Imago, 1976. cap. I.

JU, Y-I.; SONE, T.; OKAMOTO, T.; FUKUNAGA, M. Jump exercise during remobilization restores integrity of the trabecular architecture after tail suspension in young rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 6, p. 1594-1600, apr. 2008.

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

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KHALE, W.; LEONHARDT, H.; PLATZER, W. **Atlas de Anatomia Humana: Aparelho de Movimento**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

KÖCHE, J. C. Ciência e Método: Uma Visão Histórica. In:\_\_\_\_\_. **Fundamentos de Metodologia Científica: Teoria da Ciência e Prática da Pesquisa**. 19. ed. Petrópolis (RJ): Vozes, 1997. cap. 2.

LANTZ, C. A. Immobilization degeneration and the fixation hypothesis of chiropractic subluxation. A review of the literature related to the degeneration of connective tissue following joint immobilization: implications concerning the fixation hypothesis of chiropractic subluxations. **The Chiropractic Research Journal**, v. 1, p. 21-46, 1998. Disponível em:  
<[http://www.chiro.org/LINKS/FULL/IMMOBILIZATION\\_DEGENERATION.shtml](http://www.chiro.org/LINKS/FULL/IMMOBILIZATION_DEGENERATION.shtml)>. Acesso em: 24 jul. 2012.

LEROUX, M. A.; CHEUNG, H. S.; BAU, J. L.; WANG, J. Y.; HOWELL, D. S.; SETTON, L. A. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, p. 633-640, 2001.

LIMA, S. C.; CAIERÃO, Q. M.; DURIGAN, J. L. Q.; SCHWARZENBECK, A.; SILVA, C. A.; MINAMOTO, V. B.; GUIRRO, R. R. J. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 4, p. 297-302, jul/ago. 2007.

LUNDBERG, A.; SVENSSON, O. K.; NÉMETH, G.; SELVIK, G. The axis of rotation of the ankle joint. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 71-B, n. 1, p. 94-99, jan. 1989.

MANDI, D. M. Ankle fractures. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 29, n. 2, p. 155-186, apr. 2012.

MATOS, D. R.; ARAUJO, T. C. C. F. Qualidade de vida e envelhecimento: questões específicas sobre osteoartrose. **Psicologia em Estudo**, v. 14, n. 3, p. 511-518, jul/set. 2009.

MELO, E. G.; NUNES, V. A.; REZENDE, C. M. F.; GOMES, M. G.; MALM, C.; GHELLER, V. A. Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa em cães. Estudo histológico da cartilagem articular e membrana sinovial. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 83-92, 2008.

MENON, T.; CASAROLLI, L. M.; CUNHA, N. B.; SOUZA, L.; ANDRADE, P. H. M.; ALBUQUERQUE, C. E.; BERTOLINI, G. R. F. Influência do alongamento passivo em três repetições de 30 segundos a cada 48 horas em músculo sóleo imobilizado de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 6, p. 407-410, 2007.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para a clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MORIMOTO, A.; WINAGA, H.; SAKURAI, H.; OHMACHI, M.; YOSHIMOTO, T.; OHMACHI, Y.; MATSUI, T.; USHIDA, T.; OKADA, T.; SATO, J. Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats. **Neuroscience Letters**, v. 534, p. 295-300, 2013.

NATALI, L. H.; SILVA, T. S.; CIENA, A. P.; PADOIN, M. J.; ALVES, É. P. B.; ARAGÃO, F. A.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos da corrida em esteira em músculos sóleos de ratos encurtados por imobilização. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 6, p. 490-493, nov/dez. 2008.

OGSTON, A. G.; STANIER, J. E. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. **The Journal of Physiology**, v. 19, p. 244-252, 1953.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter – Bases da Histologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

PALMOSKI, M. J.; BRAND, K. D. Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast. **Arthritis & Rheumatism**, v. 24, p. 1329-1337, 1981.

PATRIDGE, R. E. H.; DUTHIE, J. J. R. Controlled trial of the effect of complete immobilization of the joints in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 22, p. 91-99, 1963.

POLIZELLO, J. C.; CARVALHO, L. C.; FREITAS, F. C.; PADULA, N.; MARTINEZ, E. Z.; MATTINELLO-SVERZUT, A, C. Efeitos morfológicos do retorno da sobrecarga após imobilização em alongamento de músculo esquelético de ratas. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 15, n. 1, p. 73-79, 2011.

PORTINHO, D.; BOIN, V. G.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos *Wistar*. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 5, p. 408-411, set/out. 2008.

POWERS, S. K.; SMUDER, A. J.; CRISWELL, D. S. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 9, p. 2519-2528, 2011.

RENSTRÖM, P. A. F. H.; LYNCH, S. A. Lesões ligamentares do tornozelo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 5, n. 1, p. 13-23, jan/fev. 1999.

RIOS, E. R.G.; FRANCHI, K. M. B.; SILVA, R. M.; AMORIM, R. F. COSTA, N. C. Senso comum, ciência e filosofia - elo dos saberes necessários à promoção da saúde. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 2, p. 501-509, 2007.

ROCHA, W. A.; GOBBI, G. A.; ARAUJO, V. F.; SANTUZZI, C. H.; COUTINHO, G. C.; NOGUEIRA, B. V.; GONÇALVES, W. L. S. Alterações morfofuncionais musculares em resposta ao alongamento passivo em modelo animal de imobilização prolongada de membro posterior. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 6, p. 450-454, 2010.

ROPES, M. W.; ROSSMEISL, E. C.; BAUER, W. The origin and nature of normal human synovial fluid. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 19, p. 795-799, 1940.

RUSSO, A. F.; MOREIRA, D. Avaliação fisioterapêutica na entorse de tornozelo: uma visão curativa e profilática. **Revista Fisioterapia Brasil**, v. 4, n. 4, p. 276-281, jul/ago. 2003.

SATO, S.; SHIRATO, K.; TACHIYASHIKI, K.; IMAIZUMI, K. Musche plasticity and  $\beta$ 2-adrenergic receptors: adaptative responses of  $\beta$ 2-adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiologic Review**, v. 91, p. 1447-1531, 2011.

SCHUMACHER, B. L.; SU, J-L.; LINDLEY, K. M.; KUETTNER, K. E.; COLE, A. A. Horizontally Oriented Clusters of Multiple Chondrons in the Superficial Zone of Ankle, but Not Knee Articular Cartilage. **The Anatomical Record**, v. 266, p. 241–248, 2002.

SHAH, S. B.; PETERS, D.; JORDAN, K. A.; MILNER, D. J.; FRIDÉN, J.; CAPETANAKI, Y.; LIEBER, R. L. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 1703-1710, 2001.

SETTON, L. A.; MOW, V. C.; MÜLLER, F. J.; PITA, J. C.; HOWELL, D. S. Mechanical behavior and biochemical composition of canine knee cartilage following periods of joint disuse and disuse with remobilization. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 5, p. 1-16, 1997.

SHIKICHI, M.; KITAMURA, H. P.; YANASE, H.; KONNO, A.; TAKAHASHI-IWANAGA, H.; IWANAGA, T. Three-dimensional ultrastructure of synoviocytes in the horse joint as revealed by the scanning electron microscope. **Archives of Histology and Cytology**, v. 62, n. 3, p. 219-229, 1999.

SIMON, T. M.; JACKSON, D. W. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 14, n. 3, p. 146-154, sep. 2006.

THAXTER, T. H.; MANN, R. A.; ANDERSON, C. E. Degeneration of immobilized knee joints in rats. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 47A, p. 567-85, apr. 1965.

TIETZ, S. **Knee, foot and ankle**. 2013. Altura: 858 pixels. Largura: 942 pixels. 96 dpi. Formato JPEG. Disponível em: <<http://www.studyblue.com/notes/note/n/units-18-and-19-the-knee-foot-and-ankle/deck/6357773>>. Acesso em: 16 jul. 2013.

TSAI, C. Y.; SHIAU, A. L.; CHEN, S. Y.; CHEN, Y. H.; CHENG, P. C.; CHANG, M. Y.; CHEN, D. H.; CHOU, C. H.; WANG, C. R.; WU, C. L. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 2, p. 544, 554, 2007.

VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STUSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 5, p. 408-419, 2002.

VENOJÄRVI, M.; KVIST, M.; ATALAY, M.; JOZSA, L.; KALIMO, H. Recovery from immobilization: responses of fast-twitch muscle fibres to spontaneous and intensive exercise in rat calf muscles. **Pathophysiology**, v. 11, p. 17-22, 2004.

WATRIN, A.; RUAUD, J. P. B.; OLIVIER, P. T. A.; GUINGAMP, N. C.; GONORD, P. D.; NETTER, P. A.; BLUM, A. G.; GUILLOT, G. M.; GILLET, P. M.; LOEUILLÉ, D. H. J. T2 Mapping of Rat Patellar Cartilage. **Radiology**, v. 219, p. 395-402, may. 2001.

ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. **Medical Hypotheses**, v. 69, p. 310-321, 2007.

**7 ARTIGO 1:**

**EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO E REMOBILIZAÇÃO SOBRE A ARTICULAÇÃO DO  
TORNOZELO EM RATOS *Wistar***

Submetido à Brazilian Journal of Medical and Biological Research<sup>4</sup>

<http://www.bjournal.com.br/>

---

<sup>4</sup> Normas da Revista no anexo 1.

## **EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO E REMOBILIZAÇÃO SOBRE A ARTICULAÇÃO DO TORNOZELO EM RATOS *WISTAR***

### **IMOBILIZAÇÃO E REMOBILIZAÇÃO NA ARTICULAÇÃO DO TORNOZELO**

Regina Inês Kunz<sup>1</sup>, Josinéia Gresele Coradini<sup>2</sup>, Lígia Inez Silva<sup>2</sup>, Gladson Ricardo Flor Bertolini<sup>2</sup>, Rose Meire Costa Brancalhão<sup>1</sup>, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil

<sup>2</sup>. Laboratório do Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil

Autor correspondente:

Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Rua Universitária, nº 2069 – CEP 85819-110 – Telefone: (45) 3220-7405 Cascavel – Paraná - E-mail: [lucineia.cr@gmail.com](mailto:lucineia.cr@gmail.com)

## Resumo

A entorse do tornozelo é a lesão musculoesquelética mais comum do esporte e frequentemente tratada por imobilização articular. Apesar dos efeitos benéficos dessa medida terapêutica, a alta prevalência de sintomas residuais, afeta a qualidade de vida do indivíduo, e a remobilização articular pode reverter este quadro. O objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos da imobilização e remobilização sobre a articulação do tornozelo em ratos *Wistar*. Foram utilizados 18 ratos machos, que tiveram seu membro posterior direito imobilizado por 15 dias, e divididos em 3 grupos: G1, somente imobilizados; G2, remobilizados livremente por 14 dias; e G3, remobilizados por meio de natação e salto em meio aquático por 14 dias, realizados em dias alternados com progressão de tempo e série dos exercícios. O membro contralateral foi utilizado como controle. Após o período experimental, as articulações do tornozelo seguiram o processamento padrão para análises microscópicas. A histomorfometria não revelou diferenças significativas entre os grupos e os membros, controle e imobilizado/remobilizado, no número de condrócitos e na espessura da cartilagem articular da tíbia e do tálus. A análise morfológica de G1 evidenciou lesões degenerativas importantes no tálus, como exposição do osso subcondral, floculações e fissuras, entre as regiões anterior e média da cartilagem articular; bem como na membrana sinovial. A remobilização por associação de exercícios terapêuticos em meio aquático, apresentou efeitos positivos na recuperação da articulação do tornozelo, quando comparada com a remobilização livre, sendo uma medida terapêutica eficaz na recuperação da articulação do tornozelo.

**Palavras-chave:** Articulação Sinovial; Remobilização em Meio Aquático; Morfologia; Cartilagem Articular; Membrana Sinovial.

## INTRODUÇÃO

Entorse de tornozelo é a lesão musculoesquelética mais comum do esporte (1) e estima-se que ocorra uma a cada 10.000 pessoas por dia (2), com pico de incidência entre 20 e 30 anos de idade, predominantemente em homens (3). Vários estudos confirmam uma alta porcentagem de indivíduos que apresentam dor residual, instabilidade do tornozelo e entorses recidivantes (4-7), o que eleva os custos com cuidados em saúde (4,8).

Apesar dos diferentes métodos de tratamento usados nas entorses de tornozelo, como os funcionais, as medidas cirúrgicas e o conservador, com a imobilização fixa ou semi-rígida (6,9), não há consenso entre os autores da indicação do melhor tratamento (4,6). Entretanto, a imobilização articular ainda é a modalidade terapêutica mais utilizada (10) e, segundo Belangero et al. (4), é utilizada em mais de 45% nas lesões ligamentares parciais e em mais de 60% nas totais.

Segundo Lamb et al. (11) a imobilização de articulações sinoviais lesionadas promove redução da dor e uma rápida melhora da qualidade de vida. Porém, quando realizada na articulação do joelho, pode afetar negativamente a composição óssea e muscular, o suprimento sanguíneo do segmento imobilizado e até mesmo a estrutura articular (12,13). De acordo com Widuchowski et al. (14) a imobilização pode causar e/ou piorar a lesão condral, levando à longo prazo, ao desenvolvimento da osteoartrite. Bedi et al. (15) acrescentam que associado à artrite degenerativa, essas lesões, se incorretamente tratadas, podem gerar dor debilitante e disfunção articular.

Mollon et al. (16) colocam que o tratamento terapêutico ideal para lesões nas articulações sinoviais deveria associar imobilização e remobilização, de forma a reestabelecer as propriedades de suporte, de fricção e desgaste causados pela descarga de peso sobre esta articulação. Essa medida melhoraria a mecânica articular e poderia atrasar ou mesmo parar a progressão da osteoartrite. Dessa maneira, quando a imobilização torna-se fundamental, a realização de medidas terapêuticas com o intuito de remobilização (17), pode atuar de maneira positiva na cartilagem articular e tecidos circunvizinhos.

Após um período de imobilização, o movimento articular proporcionado pelos exercícios de remobilização, pode prevenir ou reduzir a rigidez articular, melhorar o fluxo sinovial e a nutrição, estimulando a cicatrização e regeneração da cartilagem (18). Gu et al. (19) acrescentam que os exercícios físicos podem diminuir a dor,

manter a amplitude de movimento e, assim, reduzir o tempo de reabilitação ou hospitalização. Entre os exercícios físicos, os realizados em meio aquático, aos quais são somados as propriedades físicas da água, são utilizados como recursos em diversos tratamentos, podendo cumprir com a maioria dos objetivos propostos num programa de remobilização (20).

Neste sentido, considerando o uso da imobilização como modalidade terapêutica em lesões musculoesqueléticas, a escassez de informações científicas dos seus efeitos sobre a articulação do tornozelo, bem como os da remobilização articular, com exercícios em meio aquático, e o grande número de sintomas residuais, justifica-se o presente estudo, que objetivou analisar os efeitos da imobilização sobre a articulação do tornozelo e a associação entre natação e salto em meio aquático na remobilização desta articulação em ratos *Wistar*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Caracterização da amostra**

Foram utilizados 18 ratos machos da linhagem *Wistar*, com  $10 \pm 2$  semanas de idade, peso aproximado de 280-350g, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Os animais foram mantidos em fotoperíodo claro-escuro de 12 horas e temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , com água e ração *ad libitum*. Todos os animais tiveram seu membro posterior direito imobilizado e foram divididos em três grupos experimentais, com seis ratos em cada grupo:

- G1: imediatamente eutanasiados após o período de imobilização;
- G2: remobilização livre na gaiola por 14 dias e, além disso, os animais eram colocados em contato com a água por aproximadamente um minuto, de maneira que recebessem estímulo aquático diariamente;
- G3: remobilizados por 14 dias por meio de natação e salto em meio aquático, realizados em dias alternados, totalizando sete dias de tratamento com natação e sete dias de tratamento com salto.

Neste trabalho os valores reportados para o membro esquerdo serviram como controle para verificação das adaptações ocorridas no membro direito (imobilizado/remobilizado), bem como realizado no estudo de Baroni et al. (10). Todos os procedimentos metodológicos foram aprovados pelo Comitê de Ética no

Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE, campus de Cascavel/PR e aprovado sob o protocolo 03012.

### **Protocolo de imobilização**

Foi utilizado um aparato de imobilização, confeccionado com material próprio para engessar um seguimento corporal, sendo o mesmo: ligadura de tecido saturada com sulfato de cálcio desidratado ( $\text{CaSO}_4$ ), sob a forma de pó branco, caracterizando uma atadura gessada. Todos os grupos experimentais tiveram a descrita órtese moldada diretamente no membro posterior direito de cada animal, sendo colocada em toda a extensão do membro de forma que este permaneceu em extensão da articulação do joelho bem como, flexão plantar completa de tornozelo, ou seja, em posição de encurtamento do músculo sóleo, a qual foi mantida na posição descrita acima por um período de 15 dias consecutivos.

### **Protocolo de remobilização**

Aos animais do G2 foi permitida a remobilização livre na gaiola e estes foram apenas colocados em contato com a água, a fim de garantir o mesmo tratamento entre os grupos experimentais, minimizando diferentes respostas de estresse pela ação do contato com o meio aquático. Já os animais do G3 foram submetidos à remobilização, alternando exercícios de natação, simulando o nado *crawl*, e salto em meio aquático por 14 dias, sendo que esses animais foram previamente treinados por cinco dias consecutivos, antes do período de imobilização.

Nos seis primeiros dias de remobilização, a natação foi realizada durante 20 minutos e os saltos foram efetuados em duas séries de 10 saltos cada. Nos oito dias restantes de remobilização, efetuou-se uma progressão quanto ao tempo e séries dos exercícios realizados, sendo que o tempo de natação foi de 40 minutos e os saltos foram realizados em quatro séries de 10 saltos cada. O exercício de natação foi realizado sem nenhuma sobrecarga, enquanto o exercício de salto em meio aquático foi realizado com sobrecarga de 50% do peso corporal (21).

### **Eutanásia dos animais e coleta das amostras**

Os animais do G1, logo após o período de imobilização e os animais dos grupos G2 e G3, após a remobilização, foram pesados e anestesiados com

cloridrato de quetamina (50mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10mg/Kg). Sob o efeito dos anestésicos, os animais eram decapitados em guilhotina. Em seguida, foram dissecadas as articulações do tornozelo direitas (submetidas à imobilização/remobilização) e esquerdas (controle), que eram limpas e colocadas em formol 10% para posterior análise histológica.

### **Preparo das lâminas e análise histológica**

As articulações do tornozelo, após a fixação, foram lavadas em água destilada e descalcificadas em ácido tricloroacético (TCA) a 5% por aproximadamente 5 dias, seguindo o protocolo para inclusão em parafina e posteriormente, foi realizada a microtomia, com cortes de 7  $\mu\text{m}$  em micrótomo *Olympus*<sup>®</sup> CUT 4055. As lâminas com corte sagital da articulação do tornozelo foram coradas em hematoxilina e eosina (22), para análise morfológica geral do tecido e coloração de safranina O-fast Green (23), para análise da cartilagem articular.

Após a confecção das lâminas, as mesmas foram analisadas em microscópio de luz (*Olympus*<sup>®</sup>), onde os campos visuais de interesse foram fotomicrografados em microscópio *Olympus*<sup>®</sup> DP71. O protocolo de mensuração da espessura da cartilagem articular e do número de condrócitos foi adaptado de Ando et al. (24) e Hagiwara et al. (25). Para tanto, foram identificados três campos de interesse distintos (figura 1), sendo: P1, extremidade articular anterior (próxima as falanges); P2, região média da articulação; P3, extremidade articular posterior.

Essas áreas de interesse foram fotomicrografadas em aumento de 200 vezes e, com o auxílio do programa *Image Pro Plus 6.0*<sup>®</sup>, foi mensurada a espessura total da cartilagem nos três pontos, definida como a distância entre a superfície cartilaginosa e a junção osteocondral. Para a contagem do número de condrócitos foi escolhida uma área de interesse (retângulo de 100  $\mu\text{m}$  de profundidade por 200  $\mu\text{m}$  de comprimento) que era sobreposta aos três pontos de análise, referidos anteriormente (P1, P2 e P3), onde se considerou como bordas de exclusão as margens superior (de 100  $\mu\text{m}$ ) e profunda (de 200  $\mu\text{m}$ ), mais próxima ao osso subcondral.

Na análise das lâminas, foram também observadas as características morfológicas da membrana sinovial, padronizando-se a região articular anterior como ponto de observação; da cartilagem articular, como presença de floculações

na superfície articular, fissuras e organização celular; e, na cavidade articular foi analisada a presença de infiltrado sinovial e formação de *panus*.

### **Análise estatística**

Os dados histomorfométricos da tíbia e do tálus foram analisados com auxílio do programa SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences) e apresentados em média e desvio-padrão. Para realizar a comparação dos diferentes grupos e lados em conjunto, foi utilizado ANOVA (Analysis of Variance) modelo misto, de acordo com as diferentes variáveis avaliadas. O nível de significância aceito foi 5%.

## **RESULTADOS**

Na análise histomorfométrica do número de condrócitos, presentes na cartilagem articular da tíbia e do tálus, não houve diferenças significativas entre os grupos, e nem entre os lados controle e imobilizado/remobilizado de nenhum grupo (tabela 1). Da mesma forma, não foram verificadas diferenças em relação à espessura da cartilagem articular (tabela 2).

As articulações do tornozelo esquerdo (controle), de todos os grupos, mostraram morfologia característica, com a cartilagem articular apresentando superfície lisa e organizada em quatro camadas celulares normais (figuras 2A e 2B). Na zona superficial visualizou-se uma densidade celular maior, estando os condrócitos dispostos em aglomerados horizontais, de aspecto achatado. Na zona intermediária as células assumiram um aspecto arredondado e dispuseram-se isoladas ou em grupos isógenos. Em seguida, os condrócitos organizam-se em lacunas, correspondendo à zona profunda, separada da zona calcificada, por uma linha basofílica, a *tidemark*.

A membrana sinovial também se apresentava com características normais, ou seja, de duas a três camadas de células (sinoviócitos tipo A e tipo B) na íntima sinovial, e subíntima com predominância de células adiposas (figura 3A).

Em três animais do grupo somente imobilizado, a cartilagem não apresentou as características morfológicas normais descritas para os demais grupos controle, havendo lesão na cartilagem articular entre a região anterior e o centro da

articulação, bem como fissuras no centro da cartilagem articular da tíbia. Também foi observado um leve espessamento da membrana sinovial em um dos animais de G1 (não mostrado).

Na articulação do tornozelo direita de G1 foi verificado que a imobilização causou perda completa da cartilagem articular do tálus, entre a região articular anterior (P1) e o centro da articulação (P2), com exposição do osso subcondral (figura 2C), o que não foi visualizado na tíbia. Constatou-se também, tanto na tíbia quanto no tálus, uma leve diminuição da intensidade da coloração por hematoxilina e eosina ao longo da cartilagem, bem como o desaparecimento e/ou descontinuidade da *tidemark*. Em alguns pontos na superfície da cartilagem foram visualizadas áreas extensas de floculações e aparecimento de fissuras nas camadas mais profundas (figura 2D).

A membrana sinovial em G1 se apresentou espessada com a presença de infiltrado sanguíneo, predominantemente na subíntima, com o aumento de hemácias no interior dos vasos e a substituição do tipo de tecido conjuntivo, de adiposo para fibroso (figura 3B).

Nos animais do G2, foram verificadas regiões de destruição da cartilagem articular do tálus, porém, estas regiões se apresentaram totalmente recobertas por *panus*, também conhecido como tecido de granulação, de forma que não havia exposição do osso subcondral (figura 2E). Notou-se também a presença de fissuras e floculações principalmente no tálus e a descontinuidade da *tidemark* (figura 2F).

Quanto à membrana sinovial de G2, a íntima se apresentou fibrosa e desorganizada, onde foi verificada a perda do arranjo epitelióide. Na região subíntima, foi observada a recuperação parcial da organização tecidual, com o reaparecimento de adipócitos. Quantidades moderadas de hemácias foram visualizadas no interior dos vasos sanguíneos, embora não houvesse infiltrado sanguíneo no conjuntivo (figura 3C).

Em G3 foram visualizadas áreas de recuperação da cartilagem pela presença de clones celulares (figura 2G), ao invés do *panus*, recobrando o osso subcondral. Entretanto, houve a permanência de pequenas áreas com floculações e minifissuras, bem como leve desarranjo da *tidemark* (figura 2H). Na membrana sinovial, a íntima se mostrou com áreas de reorganização tecidual, assumindo o aspecto epitelióide. Também a subíntima se apresentava menos fibrosa, com a presença de células adiposas e poucas hemácias nos vasos sanguíneos (figura 3D).

## DISCUSSÃO

A imobilização pode levar a características distintas entre as áreas de contato, não-contato e transicional da articulação do joelho (23-25) e, por isso, as análises histomorfométricas da cartilagem articular do tornozelo foram efetuadas nas regiões anterior, média e posterior (figura 1), fornecendo um referencial padrão para as mensurações do número de condrócitos e espessura da cartilagem.

A imobilização, bem como a remobilização livre e por exercícios terapêuticos, não alteraram o número de condrócitos e a espessura da cartilagem articular do tornozelo, no tempo estudado. No caso do joelho Hagiwara et al. (25), verificaram que a partir de duas semanas de imobilização em 150° de flexão do joelho, houve diminuição no número de condrócitos nas áreas de contato da tíbia e do fêmur, enquanto na área transicional, essa diminuição foi observada em oito e dezesseis semanas para o fêmur e a tíbia, respectivamente. Resultados similares também foram encontrados por Ando et al. (24).

Assim, mesmo considerando serem articulações distintas, um tempo maior de imobilização, parece ser necessário para causar alteração no número de condrócitos na articulação do tornozelo explicando a diferença nos resultados.

Embora não haja estudos em relação à articulação do tornozelo, quanto ao joelho foi observado um aumento da espessura (25), diminuição (26) e nenhuma mudança frente à imobilização (27). Assim, diferentes modalidades de imobilização, ângulos articulares de fixação (extensão ou flexão) e áreas de estudo diversas, dificultam um consenso na literatura acerca dos efeitos da imobilização sobre a espessura da cartilagem articular.

A imobilização causou alterações degenerativas mais significativas sobre a cartilagem articular do tálus, com relação à tíbia. Vanwanseele, Lucchinetti e Stussi (28) colocam que as demandas funcionais as quais a cartilagem das articulações sinoviais são submetidas, são responsáveis pela morfologia da cartilagem articular e manutenção da sua homeostase. Dessa maneira, pode-se inferir que a ausência de carga, devido a imobilização da articulação por quinze dias, parecer ser a causa das alterações morfológicas da cartilagem articular do tálus.

Ainda, imobilização fixa da articulação do tornozelo causou destruição completa da cartilagem articular entre a região anterior (P1) e o centro (P2) da articulação. Segundo Del Carlo et al. (29) este tipo de imobilização pode dificultar a

difusão do líquido sinovial na cavidade articular, diminuindo a oferta de nutrientes aos condrócitos, que respondem às mudanças induzidas pelo desuso, com diminuição da secreção da matriz extracelular e síntese de proteoglicanos (28). Nagase e Kashiwagi (30), acrescentam que a degradação da matriz extracelular e erosão completa da cartilagem articular podem ser causadas pelo aumento da atividade de enzimas proteolíticas, conhecidas como metaloproteinases da matriz.

O desequilíbrio da distribuição de forças sobre a superfície articular causou alterações degenerativas menos marcantes nos outros locais da cartilagem (centro – P2 e região posterior – P3), como ruptura do arranjo dos proteoglicanos e aparecimento de floclulações na superfície e fissuras nas camadas mais profundas, como também verificado na articulação do joelho por Melo et al. (31).

A coloração menos intensa da cartilagem articular do tornozelo após imobilização pode ser devido a síntese diminuída da matriz extracelular, conforme colocam Ando et al. (23), em seus estudos sobre o joelho.

Cabe ressaltar que a lesão entre a região anterior e o centro da articulação nos três animais controle (G1) pode ser explicada pelo maior uso do membro esquerdo na locomoção, durante o período de imobilização do membro direito. Assim, tanto o excesso de carga exercido sobre a cartilagem, como ocorrido no lado esquerdo, quanto a ausência desta, lado imobilizado, podem levar a adaptações na cartilagem articular. Estudos prévios demonstraram uma alteração na composição da matriz cartilágnea (32) e nas propriedades mecânicas da cartilagem (33) no lado contralateral.

No caso das alterações na membrana sinovial dos animais imobilizados (G1), Del Carlo et al. (29) afirmam que a imobilização leva a uma rigidez articular, com conseqüente diminuição da amplitude de movimento, causando um espessamento da membrana sinovial, resultado também encontrado por Melo et al. (31), Ando et al. (34) e Trudel et al. (35).

Para os animais remobilizados livremente (G2), a presença de *panus*, recobrando as regiões lesadas da cartilagem, resultam de fenômenos inflamatórios a partir dos tecidos intra e periarticulares (31). Fassbender (36) constatou que a proliferação de células mesenquimais originadas da membrana sinovial precede a formação do *panus*, que então adere-se à cartilagem articular. Allard, Bayliss e Maini (37) afirmam que o *panus* pode induzir lesão da cartilagem articular pela produção de enzimas proteolíticas e interação por citocinas com células da cartilagem e do

osso subcondral. Ainda, Ando et al. (34) sugerem que a imobilização causa mudanças na secreção e distribuição do ácido hialurônico, levando a conversão de tecido adesivo imaturo em maduro e afetando a propriedade de adesão da matriz extracelular, causando a deposição do *panus* sobre a cartilagem articular.

No presente estudo, a formação do *panus* ocorreu somente nas regiões de exposição do osso subcondral. Assim, corroborando com Del Carlo et al. (29), a presença do *panus* nesse local parece refletir uma reação de cura em resposta aos danos causados na destruição da cartilagem e, associado aos vasos sanguíneos medulares presentes na região, suprir a demanda nutricional e de reparo do osso subcondral.

Verificou-se que tanto nos animais remobilizados livremente (G2), quanto naqueles submetidos aos exercícios terapêuticos (G3), a membrana sinovial apresentou um aspecto intermediário em relação aos animais controle e somente imobilizados. Del Carlo et al. (29) também verificaram que tanto a remobilização livre quanto a natação influenciam positivamente o retorno morfológico da membrana sinovial na articulação do joelho. Apesar disso, observou-se que os exercícios realizados pelos animais de G3 parecem ter um efeito reparador mais significativo, evidenciado pela melhora do arranjo epitelíode da íntima sinovial, diminuição do infiltrado sanguíneo e o retorno do aspecto conjuntivo normal na subíntima.

A combinação dos exercícios terapêuticos, salto e natação, auxiliaram na restauração do movimento, melhorando o fluxo do líquido sinovial no interior da cavidade articular, favorecendo a nutrição da cartilagem, proporcionando sua regeneração, semelhante ao descrito no joelho por Ando et al. (24).

De acordo com Melo et al. (31), a presença de clones celulares, em substituição ao *panus*, na cartilagem articular (G3) parece ser uma tentativa de reparação do tecido, devido a manutenção da capacidade proliferativa dos condrócitos, mesmo após períodos de imobilização. Del Carlo et al. (29) verificaram que as lesões da cartilagem podem ser revertidas com programas de remobilização. Ainda nesse estudo, os autores confirmaram que a natação determinou uma diminuição do estresse articular, melhorando a difusão do líquido sinovial, promovendo lesões menos severas sobre a cartilagem.

O exercício em meio aquático, utilizado em G3, resultou em uma recuperação mais eficiente da cartilagem do tornozelo, quando comparada com a remobilização livre (G2), isto pode ser atribuído a uma menor força gravitacional, que facilita o

movimento articular e, conseqüentemente, a distribuição do líquido sinovial, necessário a manutenção da homeostase.

Em conclusão, verificou-se que a imobilização da articulação do tornozelo causou degeneração da cartilagem articular, principalmente do tálus, e alterações na membrana sinovial. Já na remobilização por associação de exercícios terapêuticos em meio aquático, houve uma melhora na organização morfológica da articulação do tornozelo, tanto na cartilagem como na membrana sinovial, ao se comparar com a remobilização livre. Estudos utilizando-se tempos maiores e outras modalidades terapêuticas seriam importantes para se confirmar os efeitos positivos da remobilização sobre a articulação do tornozelo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Junge A, Engebretsen L, Mountjoy ML, Alonso JM, Renström PAFH, Aubry MJ, et al. Sports injuries during the summer Olympic Games 2008. *Am J Sports Med* 2009; 37(11): 2165-2172.
2. Katcharian DA. Soft-tissue injuries of the ankle. In: Lutter LD, Mizel MS, Pfeiffer GB (Editors), *Orthopaedic Knowledge Update: Foot and Ankle*. Rosemont, Illinois: American Academy of Orthopaedic surgeons, 1994: 241–53.
3. Hølmer P, Søndergaard L, Konradsen L, Nielsen PT, Jørgensen LN. Epidemiology of sprains in the lateral ankle and foot. *Foot Ankle* 1994; 15(2): 72-74.
4. Belangero PS, Tamaoki MJS, Nakama GY, Shoitani MV, Gomes RVF, Belloti JC. How does the Brazilian orthopedic surgeon treat acute lateral ankle sprain? *Rev Bras Ortop* 2010; 45(5): 468-473.
5. Braun BL. Effects of ankle sprain in a general clinic population 6 to 18 months after medical evaluation. *Arch Fam Med* 1999; 8: 143-148.
6. Kerkhoffs GMMJ, Rowe BH, Assendelft WJJ, Kelly KD, Struijs PAA, van DijkCN. Immobilisation and functional treatment for acute lateral ankle ligament injuries in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 3: CD003762.
7. Van Rijn RM, van Os AG, Bernsen RMD, Luijsterburg PA, Koes BW, Bierma-Zeinstra SMA. What is the clinical course of acute ankle sprains? A systematic literature review. *Am J Med* 2008; 121: 324-331.

8. Gerber JP, Williams GN, Scoville CR, Arciero RA, Taylor DC. Persistent disability with ankle sprains: a prospective examination of an athletic population. *Foot Ankle Int* 1998; 19: 653-660.
9. Kerkhoffs GMMJ, Struijs PAA, Marti RK, Assendelft WJJ, Blankevoort L, Dijk van CN. Different functional treatment strategies for acute lateral ankle ligament injuries in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 3: CD002938.
10. Baroni BM, Galvão AQ, Ritzel CH, Diefenthaeler F, Vaz MA. Dorsiflexor and Plantarflexor Neuromuscular Adaptations at Two-Week Immobilization After Ankle Sprain. *Rev Bras Med Esporte* 2010; 16(5): 358-362.
11. Lamb SE, Marsh JL, Hutton JL, Nakash R, Cooke MW; Collaborative Ankle Support Trial (CAST Group). Mechanical supports for acute, severe ankle sprain: a pragmatic, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 2009; 373(9663): 575-81.
12. Arakaki K, Kitamura N, Kurokawa T, Onodera S, Kanaya F, Gong JP, et al. Joint immobilization inhibits spontaneous hyaline cartilage regeneration induced by a novel double-network gel implantation. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22: 417-425.
13. Thaxter TH, Mann RA, Anderson CE. Degeneration of immobilized knee joints in rats. *J Bone Joint Surg* 1965; 47A: 567-585.
14. Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, Faltus R, Szyluk K, Widuchowski J, et al. Isolated full thickness chondral injuries. Prevalance and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2008; 75: 382-386.
15. Bedi A, Feeley BT, Williams RJ. Management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg* 2010; 92: 994-1009.
16. Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J. The Clinical Status of Cartilage Tissue Regeneration in Humans. *Osteoarthritis Cartilage* 2013 (in press).
17. Simon TM, Jackson DW. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthrosc* 2006; 14(3): 146-154.
18. Salter RB. History of rest and motion and the scientific basis of early continuous passive motion. *Hand Clin* 1996; 12(1): 1-11.
19. Gu X, Leong DJ, Guzman F, Mahamud R, Li YH, Majeska RJ, et al. Development and validation of a motion and loading system for a rat knee joint *in vivo*. *Ann Biomed Eng* 2010; 38(3): 621-631.

20. Resende SM, Rassi CM, Viana FP. Effects of hydrotherapy in balance and prevention of falls among elderly women. *Rev Bras Fisioter* 2008; 12(1): 57-63.
21. Gaffuri J, Meireles A, Rocha BP, Rosa CT, Artifon EL, Silva LI, et al. Physical exercise assessment as an analgesia factor in a sciatica experimental model. *Rev Bras Med Esporte* 2011; 17(2): 115-118.
22. Junqueira LC, Junqueira LMMS. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos; 1983.
23. Ando A, Hagiwara Y, Chimoto E, Hatori K, Onoda Y, Itoi E. Intra-articular injection of hyaluronan diminishes loss of chondrocytes in a rat immobilized-knee model. *Tohoku J Exp Med* 2008; 215(4): 321-331.
24. Ando A, Suda H, Hagiwara Y, Onoda Y, Chimoto E, Saijo Y, et al. Reversibility of immobilization-induced articular cartilage degeneration after remobilization in rat knee joints. *Tohoku J Exp Med* 2011; 224(2): 77-85.
25. Hagiwara Y, Ando A, Chimoto E, Saijo Y, Ohmori-Matsuda K, Itoi E. Changes of articular cartilage after immobilization in a rat knee contracture model. *J Orthop Res* 2009; 27:236-242.
26. Palmoski MJ, Brand KD. Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast. *Arthritis Rheum* 1981; 24:1329-1337.
27. Trudel G, Himori K, Uhthoff HK. Contrasting alterations of apposed and unapposed articular cartilage during joint contracture formation. *Arch Phys Med Rehabil* 2005; 86: 90–97.
28. Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stussi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(5): 408-419.
29. Del Carlo RJ, Galvão MR, Vitoria MIV, Natali AJ, Barbosa ALT, Monteiro BS, et al. Experimental immobilization and remobilization rat knee joints: clinical and microscopic study. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2007; 59(2): 363-370.
30. Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 94-103.
31. Melo EG, Nunes VA, Rezende CMF, Gomes MG, Malm C, Gheller VA. Chondroitin sulfate and sodium hyaluronate in the treatment of the degenerative joint disease in dogs. Histological features of articular cartilage and synovium. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2008; 60(1): 83-92.

32. Setton LA, Mow VC, Müller FJ, Pita JC, Howell DS. Mechanical behavior and biochemical composition of canine knee cartilage following periods of joint disuse and disuse with remobilization. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5: 1-16.
33. Leroux MA, Cheung HS, Bau JL, Wang JY, Howell DS, Setton LA. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 633-640.
34. Ando A, Hagiwara Y, Onoda Y, Hatori K, Suda H, Chimoto E, et al. Distribution of type A and type B synoviocytes in the adhesive and shortened synovial membrane during immobilization of the knee joint in rats. *Tohoku J Exp Med* 2010; 221(2): 161-168.
35. Trudel G, Jabi M, Uhthoff HK. Localized and Adaptive Synoviocyte Proliferation Characteristics in Rat Knee Joint Contractures Secondary to Immobility. *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84: 1350-1356.
36. Fassbender HG. Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Collagen Rel Res* 1983; 3: 141-155.
37. Allard SA, Bayliss MT, Maini RN. The sinovium-cartilage junction of the normal human knee. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1170-1178.

## TABELAS:

Tabela 1. Número de Condrócitos na Cartilagem Articular da Tíbia e do Tálus<sup>1</sup>

NÚMERO DE CONDRÓCITOS			Grupos		
			G1	G2	G3
Tíbia					
P1 <sup>2</sup>	Direito		30,4±9,5	31,8±8,6	35,2±7,8
	Esquerdo		36,0±14,1	31,7±6,8	29,7±7,5
P2	Direito		37,8±6,6	34,0±5,4	41,2±7,7
	Esquerdo		36,2±4,8	39,7±15,2	34,8±6,9
P3	Direito		31,6±7,4	30,2±8,6	29,8±4,2
	Esquerdo		27,7±5,9	30,8±7,7	28,3±9,6
Tálus					
P1	Direito		36,2±8,2	28,0±5,3	38,0±8,0
	Esquerdo		29,7±5,4	32,3±5,5	30,7±11,8
P2	Direito		14,8±8,5	19,8±8,7	27,7±7,7
	Esquerdo		26,8±9,2	32,0±6,6	26,5±5,8
P3	Direito		38,8±8,1	31,5±5,5	38,5±9,4
	Esquerdo		35,3±8,4	33,5±7,5	35,7±9,0

<sup>1</sup>Cada valor representa a média±desvio padrão.

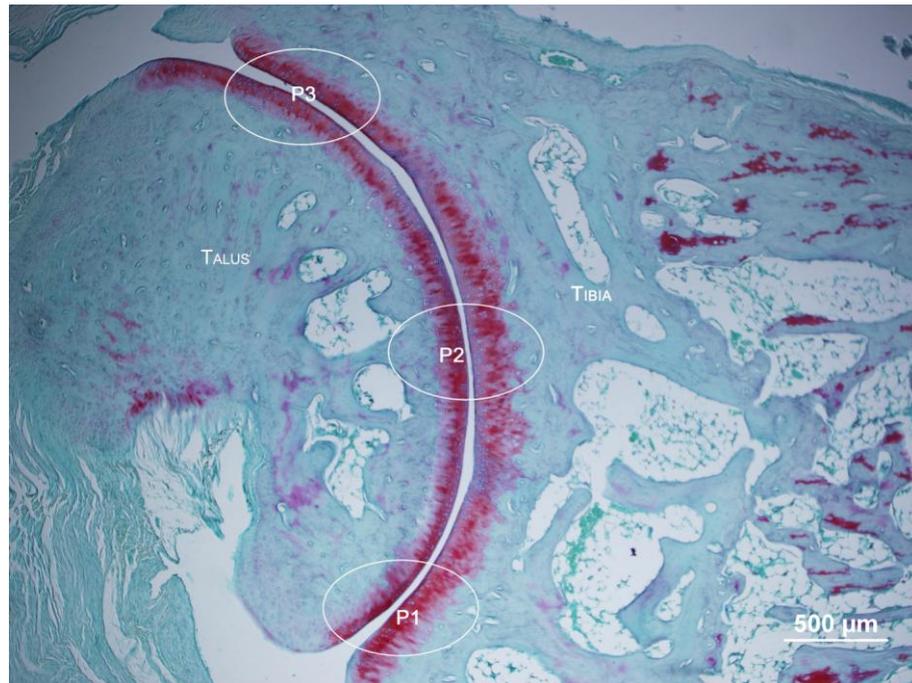
<sup>2</sup>P1 – região articular anterior; P2 – região articular média; P3 – região articular posterior.

Tabela 2. Espessura da Cartilagem Articular (µm) da tíbia e do tálus<sup>1</sup>

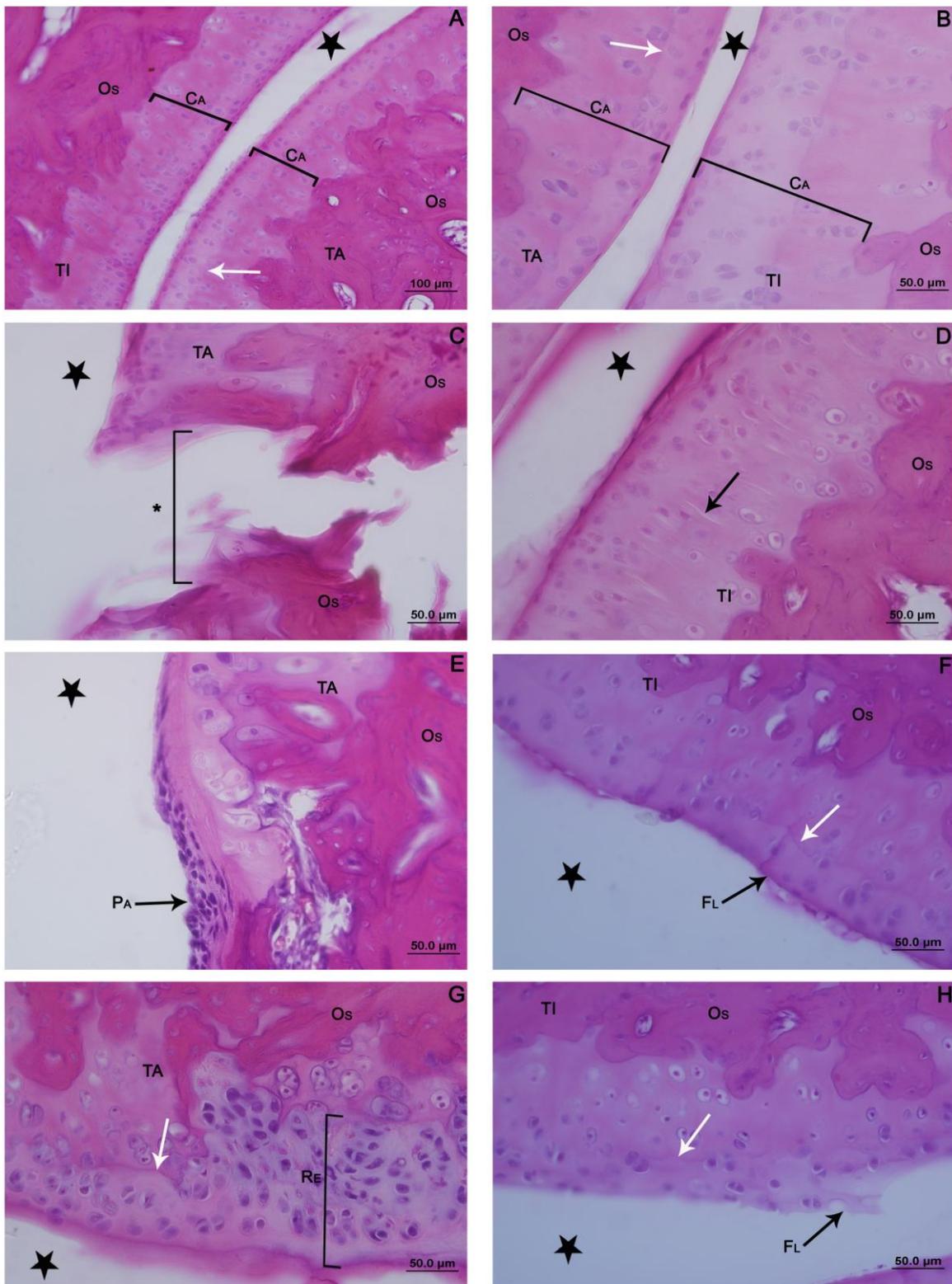
ESPESSURA DA CARTILAGEM			Grupos		
			G1	G2	G3
Tíbia					
P1 <sup>2</sup>	Direito		237,1±42,9	212,7±28,8	207,5±32,1
	Esquerdo		224,8±28,5	235,1±18,1	228,5±41,1
P2	Direito		231,5±28,9	186,2±21,8	196,9±61,1
	Esquerdo		200,9±43,3	197,2±19,2	207,7±51,4
P3	Direito		139,6±42,1	136,8±71,1	152,3±46,1
	Esquerdo		144,5±55,4	157,4±31,1	124,5±20,7
Tálus					
P1	Direito		134,4±28,1	154,2±36,0	163,7±36,6
	Esquerdo		162,2±23,1	162,0±27,7	147,5±16,7
P2	Direito		132,0±67,7	122,8±68,0	145,9±45,5
	Esquerdo		148,8±34,2	147,2±22,7	179,6±43,2
P3	Direito		134,5±35,6	163,8±70,0	150,9±37,1
	Esquerdo		139,5±42,4	154,9±13,2	150,4±20,1

<sup>1</sup>Cada valor representa a média±desvio padrão.

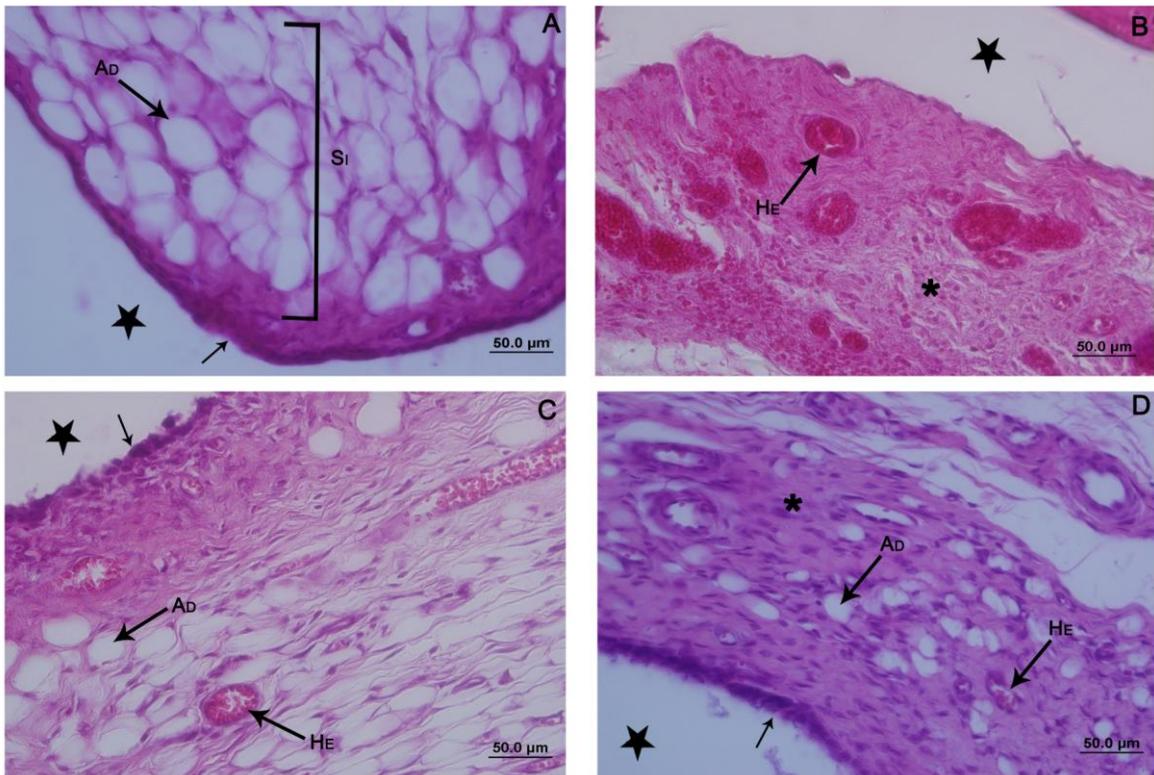
<sup>2</sup>P1 – região articular anterior; P2 – região articular média; P3 – região articular posterior.



**Figura 1:** Fotomicrografia da articulação do tornozelo, demonstrando as áreas (P1, P2 e P3) de mensuração na articulação. Corte sagital, coloração em Safranina O fast-green.



**Figura 2:** Fotomicrografias da cartilagem articular da articulação do tornozelo de ratos *Wistar* controle (A e B), G1 (C e D), G2 (E e F) e G3 (G e H); corte sagital, coloração em hematoxilina e eosina. Em A, vista panorâmica evidenciando a cartilagem articular (CA) e, em B, detalhes de sua organização celular. Em C, perda da cartilagem articular (asterisco), com exposição do osso subcondral (OS) e em D, visualizam-se as fissuras (seta preta). Em E, formação de *panus* (PA) e em F, presença de flocculações na superfície cartilaginosa (FL). Em G, recuperação da cartilagem articular com presença de clones (RE) e, em H, flocculações na superfície. Cavidade articular (estrela), *tidemark* (seta branca), osso tálus (TA) e tíbia (TI).



**Figura 3:** Fotomicrografias da membrana sinovial da articulação do tornozelo de ratos *Wistar*, corte sagital, coloração em hematoxilina e eosina. Em A controle, membrana com íntima sinovial (seta preta) delgada e subíntima (SI), com predominância de células adiposas (AD). Em B grupo G1, espessamento da membrana sinovial que se apresenta predominantemente fibrosa (asterisco), com vasos sanguíneos (HE) repletos de hemácias que extravasam para o conjuntivo. Em C grupo G2, membrana sinovial com espessamento na região apical e íntima com sinoviócitos desorganizados (seta preta), presença de adipócitos (AD) na subíntima, com quantidade moderada de hemácias no interior dos vasos sanguíneos (HE). Em D grupo G3, membrana sinovial onde se verifica áreas de reorganização da íntima (seta preta), subíntima menos fibrosa (asterisco), com células adiposas (AD) e com poucas hemácias nos vasos sanguíneos (HE). Cavidade articular (estrela).

**8 ARTIGO 2:**

**EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO E REMOBILIZAÇÃO SOBRE OS MÚSCULOS  
SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR DE RATOS *WISTAR***

Submetido à Revista Brasileira de Medicina do Esporte<sup>5</sup>

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_serial&pid=1517-8692&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=1517-8692&lng=pt&nrm=iso)

---

<sup>5</sup> Normas da Revista no anexo 2.

**Efeitos da imobilização e remobilização sobre os músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar***

Regina Inês Kunz<sup>1</sup>

Josinéia Gresele Coradini<sup>1</sup>

Lígia Inez Silva<sup>2</sup>

Camila Mayumi Martin Kakihata<sup>3</sup>

Rose Meire Costa Brancalhão<sup>4</sup>

Gladson Ricardo Flor Bertolini<sup>4</sup>

Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro<sup>4</sup>

1. Mestrandas em Biociências e Saúde pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* de Cascavel – Paraná.
2. Fisioterapeuta formada pela UNIOESTE.
3. Graduada em Fisioterapia pela UNIOESTE.
4. Docentes do programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde/ UNIOESTE.

**Endereço para correspondência:**

Laboratório de Biologia Celular, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

Rua: Universitária, nº 2069 – CEP 85819-110 – Telefone: (45) 3220-3237 Cascavel – Paraná - E-mail: [lucineia.cr@gmail.com](mailto:lucineia.cr@gmail.com)

## RESUMO

O músculo esquelético possui a capacidade de se adaptar a diferentes estímulos, entre eles, a imobilização, recurso terapêutico frequentemente usado em distúrbios músculo-esqueléticos. Este trabalho analisou o efeito da imobilização e da remobilização sobre parâmetros histomorfométricos de massa, menor diâmetro da fibra e comprimento dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar*. Foram utilizados 18 ratos machos, divididos em três grupos de seis animais cada: G1 – imobilizados por 15 dias; G2 – imobilizados por 15 dias e remobilizados livremente; G3 – imobilizados por 15 dias e remobilizados por meio de natação e salto em meio aquático, realizados em dias alternados e com progressão de tempo e série dos exercícios. Foram coletados os músculos sóleo e tibial anterior tanto direitos (imobilizados ou tratados) e esquerdos (controle). No músculo sóleo a imobilização reduziu 0,043 g a massa muscular, 3,182  $\mu\text{m}$  o diâmetro da fibra e 2,913 mm o comprimento muscular. Em relação ao tibial anterior houve diminuição de 0,049 g do peso muscular. Na comparação entre os grupos tratados a massa e o comprimento muscular do tibial anterior foram significativamente menores em G1 em relação à G2 e G3. Quanto ao sóleo, houve um aumento do menor diâmetro da fibra muscular de G3 em relação à G1. Conclui-se que a imobilização produziu alterações significativas sobre os parâmetros musculares do sóleo e, quanto ao tibial anterior, causou alteração somente na massa muscular. Tanto a remobilização livre quanto a remobilização por exercícios aumentaram a massa e o comprimento muscular do tibial anterior. A natação combinada com o salto em meio aquático aumentaram o menor diâmetro do músculo sóleo.

Palavras-chave: músculo esquelético, natação, atrofia muscular

## **ABSTRACT**

Skeletal muscle has the ability to adapt to different stimuli, among them, immobilization, therapeutic resource often used in musculoskeletal disorders. This study examined the effect of immobilization and remobilization on histomorphometric parameters of mass, smaller fiber diameter and length of the soleus and tibial anterior muscles of rats. We used 18 male rats were divided into three groups of six animals each: G1 - immobilized for 15 days; G2 - immobilized for 15 days and remobilized freely; G3 - immobilized for 15 days and remobilized by swimming and jumping in water, performed on alternate days, with the progression of time and number of exercises. We collected the soleus and tibial anterior both rights (immobilized or treated) and left (control). Soleus muscle immobilization reduced muscle mass 0.043 g, fiber diameter in 3.182 mm and muscle length 2.913 mm. Regarding the tibial anterior decreased 0.049 g muscle weight. Comparing the treated groups the mass and length of the tibial anterior muscle were significantly lower in G1 regarding G2 and G3. As for the soleus, there was an increase in the smaller diameter of the muscle fiber in G3 compared with G1. It is concluded that immobilization produced significant changes in the parameters of the soleus muscle and, for the tibial anterior, there was only change in muscle mass. Both the free remobilization as remobilization by exercise increased the mass and length of the tibial anterior muscle. The swimming combined with the jump in water increased the smaller diameter of the soleus muscle.

Keywords: skeletal muscle, swimming, muscular atrophy

## INTRODUÇÃO

O músculo esquelético totaliza 40-50% da massa corporal<sup>(1,2)</sup> e possui uma elevada capacidade de adaptação estrutural e funcional, a chamada plasticidade neuromuscular. Dessa forma, a massa e a composição são diretamente relacionadas com a função muscular, podendo ser reguladas de acordo com a carga de trabalho, a atividade e condições patológicas<sup>(3-5)</sup>. Ainda, estímulos podem acarretar alterações musculares, como a imobilização, um recurso terapêutico frequentemente usado no tratamento de injúrias músculo-esqueléticas<sup>(6,7)</sup>.

O maior efeito observado no tecido muscular submetido a períodos de imobilização é a atrofia muscular. Este processo parece ser altamente ordenado e regulado, caracterizado pela diminuição da área de secção transversa da fibra muscular e conteúdo proteico. Essas alterações, resultam em redução da capacidade de produção de força, diminuição da ativação elétrica, aumento da fadigabilidade e resistência à insulina<sup>(5,8)</sup>.

Além disso, a imobilização pode causar mudanças na relação força-comprimento de acordo com a posição em que o músculo é imobilizado<sup>(8)</sup>. Shah *et al.*<sup>(9)</sup> observaram que o número de sarcômeros varia em resposta a perturbação crônica do comprimento, sendo que a imobilização em posição encurtada diminuiu sua quantidade, enquanto em posição alongada aumentou.

Diferentes técnicas e exercícios têm sido estudados na tentativa de reverter os danos celulares causados pela imobilização, entre eles a corrida em esteira<sup>(10,11)</sup>, ultrassom terapêutico<sup>(12)</sup>, alongamento passivo<sup>(13,14)</sup>, estimulação elétrica neuromuscular<sup>(15)</sup> e remobilização livre<sup>(16)</sup>. Apesar disso, ainda não há um modelo ideal de remobilização que permita ao músculo retornar às suas características morfológicas do momento pré-imobilização.

O objetivo do estudo foi analisar o efeito da imobilização e do protocolo de remobilização composto pela associação de exercício aeróbico (natação) e exercício resistido (salto em meio aquático) sobre parâmetros de massa muscular, menor diâmetro da fibra muscular e comprimento muscular dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus de Cascavel/PR sob o protocolo 03012.

Foram utilizados 18 ratos machos da linhagem *Wistar*, com  $10 \pm 2$  semanas de idade, mantidos em fotoperíodo claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*, os quais foram divididos em três grupos experimentais, com seis ratos em cada grupo:

- G1: os ratos tiveram seu membro posterior direito imobilizado por 15 dias;
- G2: os ratos tiveram seu membro posterior direito imobilizado por 15 dias e, em seguida, lhes foi permitido a remobilização livre na gaiola por 14 dias, e, além disso, os animais eram colocados em contato com a água por aproximadamente um minuto, de maneira que recebessem estímulo aquático diariamente;
- G3: os ratos tiveram seu membro posterior direito imobilizado por 15 dias e, em seguida, foram remobilizados por 14 dias por meio de natação e salto em meio aquático, realizados em dias alternados, totalizando sete dias de tratamento com natação e sete dias de tratamento com salto.

Neste trabalho os valores reportados para o membro esquerdo serviram como controle na verificação de adaptações ocorridas no membro direito (imobilizado), da mesma forma que o realizado no estudo de Baroni *et al.*<sup>(8)</sup>.

### Protocolo de imobilização

Foi utilizado um aparato de imobilização, confeccionado com material próprio para engessar um seguimento corporal, sendo o mesmo: ligadura de tecido saturada com sulfato de cálcio desidratado ( $\text{CaSO}_4$ ), sob a forma de pó branco,

caracterizando uma atadura gessada. Todos os grupos experimentais tiveram a descrita órtese moldada diretamente no membro posterior direito de cada animal, sendo colocada em toda a extensão do membro de forma que este permaneceu em extensão da articulação do joelho e flexão plantar completa do tornozelo, ou seja, em posição de encurtamento do músculo sóleo e alongamento do tibial anterior, a qual foi mantida na posição descrita acima por um período de 15 dias consecutivos.

### **Protocolo de remobilização**

Após a retirada do aparato de imobilização, os animais do G1 foram imediatamente eutanasiados. Aos animais do G2 foi permitida a remobilização livre na gaiola e estes foram apenas colocados em contato com a água, a fim de garantir o mesmo tratamento entre os grupos experimentais, minimizando diferentes respostas de estresse pela ação do contato com o meio aquático. Já os animais do G3 foram submetidos à remobilização, alternando exercícios de natação e salto em meio aquático por 14 dias, sendo que esses animais foram previamente treinados por cinco dias consecutivos, antes do período de imobilização. Nos seis primeiros dias de remobilização, a natação foi realizada durante 20 minutos e os saltos foram efetuados em duas séries de 10 saltos cada. Nos oito dias restantes de remobilização, efetuou-se uma progressão quanto ao tempo e às séries dos exercícios realizados, sendo que o tempo de natação foi de 40 minutos e os saltos foram realizados em quatro séries de 10 saltos cada.

O exercício de natação foi realizado sem nenhuma sobrecarga, enquanto o exercício de salto em meio aquático foi realizado com sobrecarga de 50% do peso corporal <sup>(17)</sup>.

## **Eutanásia dos animais e preparação histológica**

Os animais do G1, logo após o período de imobilização e os animais de G2 e G3, logo após a remobilização, foram pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (50mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10mg/Kg). Sob o efeito dos anestésicos, os animais foram decapitados em guilhotina. Em seguida, foram coletados os músculos tibial anterior e sóleo, tanto direito quanto esquerdo. Previamente à fixação em formol 7%, esses músculos foram pesados em balança analítica de precisão (Shimadzu® - Japão) para obtenção da massa muscular dada em gramas (g). Os músculos foram também mensurados quanto ao comprimento máximo de repouso por meio de paquímetro digital (Digimess® - São Paulo/Brasil) para obtenção do comprimento muscular, fornecido em milímetros (mm).

Após a fixação, os músculos sóleos e tibiais anteriores foram armazenados em álcool 70% e seguiram o procedimento histológico de rotina para emblocamento em parafina. Foram obtidos cortes transversais de 7 µm das fibras musculares, corados em hematoxilina e eosina<sup>(18)</sup>.

Os campos de interesse nas lâminas foram fotomicrografados na objetiva de 40x, sendo analisado o menor diâmetro de 100 fibras por músculo, utilizando-se o programa *Image-Pro-Plus6.0*® (USA), dado em micrômetros (µm).

## **Análise Estatística**

Os dados foram analisados com auxílio do programa SPSS 17.0 e apresentados em média e desvio-padrão. Para realizar a comparação dos diferentes grupos e lados em conjunto, foi utilizado ANOVA modelo misto, de acordo com as diferentes variáveis avaliadas. O nível de significância aceito foi 5%.

## RESULTADOS

### Massa Muscular

Houve variação significativa na massa muscular do sóleo com estatística  $F(1,15)=5,678$ ;  $p=0,031$ . Na comparação entre os grupos, não houve diferenças ( $p=1,00$ ). Contudo, ao comparar os lados, houve diferença de 0,043 g menor para o lado imobilizado ( $p=0,031$ ) (tabela 1).

Os resultados da massa muscular do tibial anterior apresentaram valores  $F(1,15)=4,664$ ;  $p=0,047$ . Na comparação entre os grupos, a massa muscular de G1 foi significativamente menor que G2 e G3 ( $p=0,001$ ), sendo que não houve diferença entre G2 e G3 ( $p=0,339$ ). O lado imobilizado apresentou massa muscular 0,049 g menor que o lado contralateral, sendo esta diferença significativa ( $p=0,047$ ) (tabela 1).

### Menor Diâmetro da Fibra Muscular

O menor diâmetro das fibras do músculo sóleo apresentou valor  $F(1,15)=26,724$ ;  $p=0,001$ . Na comparação entre os grupos, não houve diferença entre G1 e G2 ( $p=0,140$ ) e entre G2 e G3 ( $p=1,00$ ), porém houve um aumento de 3,792  $\mu\text{m}$  no diâmetro de G3 em relação à G1 ( $p=0,025$ ). Ao comparar os lados, o diâmetro da fibra muscular do sóleo direito foi 3,182  $\mu\text{m}$  menor que o lado esquerdo ( $p=0,001$ ) (tabela 1).

Não houve variação significativa no menor diâmetro da fibra do músculo tibial anterior para o presente estudo, com estatística  $F(1,15)=0,235$ ;  $p=0,635$  (tabela 1).

### **Comprimento Muscular**

O comprimento muscular do sóleo apresentou estatística  $F(1,15)=17,097$ ;  $p=0,001$ . Não houve variação significativa entre os grupos ( $p=1,00$ ) e, na comparação entre os lados, houve redução de 2,913 mm no lado imobilizado em relação ao controle ( $p=0,001$ ) (tabela 1).

O comprimento muscular do tibial anterior apresentou estatística  $F(1,15)=0,224$ ;  $p=0,643$ . Os valores de G1 foram significativamente menores que G2 ( $p=0,001$ ) e G3 ( $p=0,002$ ), não havendo diferença entre G2 e G3. Ao comparar os lados, também não houve diferença estatística ( $p=0,643$ ) (tabela 1).

**INSERIR TABELA 1**

## DISCUSSÃO

Estudos em modelos animais demonstram a plasticidade muscular frente a diferentes estímulos, causando alterações no tamanho e peso das fibras musculares, no comprimento e na quantidade de tecido conjuntivo<sup>(9)</sup>. Essas adaptações foram também encontradas nos músculos sóleo e tibial anterior dos animais no presente estudo.

Fibras musculares lentas (tipo I), predominantemente oxidativas parecem ser mais susceptíveis à atrofia muscular por desuso do que as fibras musculares rápidas (tipo II), devido a mudanças no metabolismo da fibra<sup>(19)</sup>. Porém, no presente estudo, observou-se uma diminuição da massa muscular tanto no músculo sóleo (predominantemente tônico), quanto no músculo tibial anterior (predominantemente fásico), imobilizados em relação aos músculos contralaterais em todos os grupos.

Natali *et al.*<sup>(11)</sup> também verificaram que 15 dias de imobilização em flexão plantar máxima diminuiu a massa muscular do sóleo. Resultados semelhantes na diminuição do peso do sóleo, quando imobilizado em encurtamento por 21 dias, foram encontrados por Menon *et al.*<sup>(13)</sup>.

Fujita *et al.*<sup>(20)</sup> observaram que a suspensão do membro posterior de ratos *Wistar* por 7 dias, mimetizando o desuso muscular, resultou em atrofia do tibial anterior, caracterizado pela diminuição da massa muscular e da área de secção transversa das fibras tipo I, IIA e IIB.

Alguns autores sugerem que a imobilização em encurtamento muscular aumenta o número de microlesões nas miofibrilas, levando ao aumento de espécies reativas de oxigênio e radicais livres no tecido muscular, conseqüentemente diminuindo a miofibrilogênese e a massa muscular<sup>(14)</sup>. Järvinen *et al.*<sup>(21)</sup> afirmam ainda que os músculos imobilizados em alongamento sofrem atrofia muscular menos

evidente e menor perda de proteínas elásticas, quando comparado com músculos imobilizados em encurtamento. Essas postulações corroboram com o presente estudo, no qual a imobilização diminuiu o diâmetro da fibra muscular apenas no sóleo, sendo que não houve alterações no menor diâmetro do músculo tibial anterior.

Lima *et al.*<sup>(4)</sup> observaram que a imobilização diminui a tensão ativa e passiva atuante sobre o músculo, levando a uma alteração no metabolismo dos fibroblastos, que por sua vez respondem com o aumento da área de tecido conjuntivo intramuscular, principalmente na imobilização em encurtamento<sup>(22)</sup>. Józsa *et al.*<sup>(23)</sup> acrescentam ainda que esse aumento do tecido conjuntivo cria uma barreira mecânica ao influxo sanguíneo para o músculo, diminuindo o número de capilares na fibra o que pode causar atrofia muscular.

Na comparação entre os grupos, verificou-se que tanto G2 quanto G3 reestabeleceram a massa muscular do tibial anterior, o que não foi observado para o músculo sóleo. Essa capacidade de retornar ao peso pré-imobilização do músculo tibial anterior parece ocorrer devido ao menor número de lesões nas miofibrilas e também à uma reorganização do tecido conjuntivo, melhorando o fluxo sanguíneo. Stone<sup>(24)</sup> afirma que o exercício físico pode aumentar a força do tecido conjuntivo bem como a massa muscular, tornando o músculo mais resistente.

A remobilização com exercícios do G3 levou a um aumento do diâmetro da fibra muscular do sóleo em relação ao grupo somente imobilizado. Järvinen e Lehto<sup>(25)</sup> afirmam que as injúrias nas miofibrilas do músculo esquelético são dependentes de uma recuperação do fluxo sanguíneo e que a arquitetura e o tamanho das miofibrilas é mais rapidamente restaurado quanto mais ativa for a remobilização. Assim, observou-se no presente estudo uma recuperação da

capacidade contrátil do sóleo após a remobilização, embora essa não tenha sido eficaz em restaurar a massa muscular desse músculo.

A imobilização pode também causar alterações no comprimento da fibra muscular, pela adição ou diminuição do número de sarcômeros, ou ainda pela alteração no seu tamanho<sup>(4,26)</sup>. Embora no presente estudo não tenham sido analisados aspectos referentes ao número ou comprimento médio dos sarcômeros, observou-se uma diminuição do comprimento muscular do sóleo imobilizado em relação ao sóleo controle. Menon *et al.*<sup>(13)</sup> também verificaram que 21 dias de imobilização em encurtamento do músculo sóleo diminuiu 12,74% do seu comprimento muscular em relação ao controle.

O músculo tibial anterior não teve seu comprimento alterado pela imobilização. Porém, foi verificado que tanto a remobilização livre quanto os exercícios, aumentaram o comprimento muscular do tibial anterior em relação ao grupo controle. Esse dado pode ter ocorrido tanto por um aumento do comprimento médio do sarcômero, quanto pela adição de sarcômeros em série ao longo da fibra muscular. Gomes *et al.*<sup>(27)</sup> afirmam que a remobilização por meio de exercícios pode produzir adaptações rápidas no comprimento funcional do sarcômero.

Como limitações do presente estudo, salienta-se que não foram realizadas as análises referentes ao número de sarcômeros em série e ao comprimento médio dos sarcômeros na fibra muscular, análise essa que sugere-se ser realizada em estudos futuros. Salienta-se também o fato de que G3 foi remobilizado pela combinação da natação com o exercício de salto, dificultando a compreensão de qual intensidade e que tipo de exercício apresenta-se mais benéfico na restauração dos parâmetros musculares pré-imobilização. Sugere-se que em estudos futuros sejam usados grupos no qual os exercícios sejam realizados separadamente.

Ao término do presente conclui-se que a imobilização produziu alterações significativas sobre a massa, menor diâmetro da fibra e comprimento muscular do sóleo, e para o tibial anterior causou alteração somente sobre a massa muscular. Tanto a remobilização livre quanto a remobilização por exercícios aumentaram a massa e o comprimento muscular do tibial anterior. A natação combinada com o salto em meio aquático aumentaram o menor diâmetro do músculo sóleo.

## AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de Mestrado, a UNIOESTE e ao programa de Mestrado em Biociências e Saúde pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

1. Powers SK, Smuder AJ, Criswell DS. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(1):2519-2528.
2. Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Muscle plasticity and  $\beta$ 2-adrenergic receptors: adaptative responses of  $\beta$ 2-adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:1-10.
3. Hood DA, Irrcher I, Ljubcic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol* 2006; 209:2265-2275.
4. Lima SC, Caierão QM, Durigan JLQ, Schwarzenbeck A, Silva CA, Minamoto VB, et al. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. *Rev Bras Fisioter* 2007; 11(4):297-302.
5. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses* 2007; 69:310-321.
6. Cornachione AS, Cação-Benedini LO, Benedini-Elias PCO, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut AC. Effects of 40 min of maintained stretch on the soleus and plantaria muscles of rats applied for different periods of time after hindlimb immobilization. *Acta Histochem* 2013; 115(5):505-511.

7. Sakakima H. Effects of immobilization and subsequent low and high frequency treadmill running on rat soleous muscle and ankle joint movement. *J Phys Ther Sci* 2004; 16:43-48.
8. Baroni BM, Galvão AQ, Ritzel CH, Diefenthaeler F, Vaz MA. Adaptações neuromusculares de flexores dorsais e plantares a duas semanas de imobilização após entorse de tornozelo. *Rev Bras Med Esporte* 2010; 16(5):358-362.
9. Shah SB, Peters D, Jordan KA, Milner DJ, Fridén J, Capetanaki Y, et al. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Biol* 2001; 204:1703-1710.
10. Morimoto A, Winaga H, Sakurai H, Ohmichi M, Yoshimoto T, Ohmichi Y, et al. Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats. *Neurosci Lett* 2013; 534:295-300.
11. Natali LH, Silva TS, Ciena AP, Padoin MJ, Alves ÉPB, Aragão FA, et al. Efeitos da corrida em esteira em músculos sóleos de ratos encurtados por imobilização. *Rev Bras Med Esporte* 2008; 14(6):490-493.
12. Cunha DM, Nascimento CM, Artifon EL, Ferrari D, Ribeiro LFC, Fontanesi LB, et al. Evaluation of rats' soleus muscle submitted to remobilization protocol with therapeutic ultrasound associated with static stretching. *J Morphol Sci* 2012; 29(1):53-57.
13. Menon T, Casarolli LM, Cunha NB, Souza L, Andrade PHM, Albuquerque CE, et al. Influência do alongamento passivo em três repetições de 30 segundos a cada 48 horas em músculo sóleo imobilizado de ratos. *Rev Bras Med Esporte* 2007; 13(6):407-410.

14. Rocha WA, Gobbi GA, Araujo VF, Santuzzi CH, Coutinho GC, Nogueira BV, et al. Alterações morfofuncionais musculares em resposta ao alongamento passivo em modelo animal de imobilização prolongada de membro posterior. *Rev Bras Med Esporte* 2010; 16(6):450-454.
15. Durigan JLQ, Cancelliero KM, Bosi PL, Delfino GB, Montebelo MIL, Guirro RRJ, et al. Metabolic and morphometric alterations inherent to neuromuscular electric stimulation in the antagonist muscle submitted to ankle joint immobilization. *Braz Arch Biol Technol* 2009; 52(1):85-91.
16. Polizello JC, Carvalho LC, Freitas FC, Padula N, Martinez EZ, Mattinello-Sverzut AC. Efeitos morfológicos do retorno da sobrecarga após imobilização em alongamento de músculo esquelético de ratas. *Rev Bras Fisioter* 2011; 15(1):73-79.
17. Gaffuri J, Meireles A, Rocha BP, Rosa CT, Artifon EL, Silva LI, et al. Avaliação do exercício físico como fator de analgesia em um modelo experimental de cialgia. *Rev Bras Med Esporte* 2011; 17(2):115-118.
18. Junqueira LC, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983.
19. Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization: a review. *Sports Med* 1990; 10(1):42-58.
20. Fujita N, Murakami S, Arakawa T, Miki A, Fujino H. The combined effect of electrical stimulation and resistance isometric contraction on muscle atrophy in rat tibialis anterior muscle. *Bosn J Basic Med Sci* 2011; 11(2):74-79.
21. Järvinen TAH, Józsa L, Kannus P, Järvinen TLN, Järvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized

- skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopy study. *J Muscle Res Cell Motil* 2002; 23(3):245-254.
22. Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat* 1984; 138:343-504.
23. Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue: a morphometric and microscopy study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72b(2):293-297.
24. Stone MH. Implications for connective tissue and bone alterations resulting from resistance exercise training. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(5):162-168.
25. Järvinen MJ, Lehto MUK. The effects of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries. *Sports Med* 1993; 15:78-89.
26. Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol* 1972; 224:231-244.
27. Gomes ARS, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. Effects of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:1473-1480.

**TABELA 1: Resultados encontrados de acordo com os diferentes parâmetros musculares dos grupos experimentais.**

PARÂMETROS			Massa Muscular (g)	Menor Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento Muscular (mm)
G1	Sóleo	Direito	0,07 $\pm$ 0,01	30,30 $\pm$ 2,00	18,75 $\pm$ 2,36
		Esquerdo	0,13 $\pm$ 0,09	31,32 $\pm$ 2,30	25,61 $\pm$ 2,75
	Tibial Anterior	Direito	0,42 $\pm$ 0,03	34,57 $\pm$ 2,78	16,95 $\pm$ 1,20
		Esquerdo	0,41 $\pm$ 0,06	33,09 $\pm$ 2,37	17,43 $\pm$ 1,24
G2	Sóleo	Direito	0,10 $\pm$ 0,03	30,88 $\pm$ 2,60	21,77 $\pm$ 0,78
		Esquerdo	0,12 $\pm$ 0,06	36,16 $\pm$ 3,00	23,26 $\pm$ 1,71
	Tibial Anterior	Direito	0,63 $\pm$ 0,09	32,45 $\pm$ 1,85	21,30 $\pm$ 1,31
		Esquerdo	0,63 $\pm$ 0,08	34,41 $\pm$ 2,66	20,86 $\pm$ 1,90
G3	Sóleo	Direito	0,09 $\pm$ 0,02	32,98 $\pm$ 3,08	22,23 $\pm$ 1,36
		Esquerdo	0,13 $\pm$ 0,01	36,23 $\pm$ 1,92	22,62 $\pm$ 0,94
	Tibial Anterior	Direito	0,51 $\pm$ 0,07	32,75 $\pm$ 2,66	19,80 $\pm$ 1,98
		Esquerdo	0,65 $\pm$ 0,07	33,11 $\pm$ 2,50	20,42 $\pm$ 1,41

**9 ARTIGO 3:****EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO E REMOBILIZAÇÃO PELA COMBINAÇÃO  
NATAÇÃO E SALTO EM MEIO AQUÁTICO, SOBRE A MORFOLOGIA DO  
MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR DE RATOS**

Submetido e aceito para publicação pelo Corpo Editorial da Publicatio UEPG –  
Ciências Biológicas e da Saúde<sup>6</sup>

Prezada autora, segue em anexo o artigo ACEITO, com pequenas correções a serem realizadas. Favor retornar o mais breve possível.

Att

Prof. Giovani M. Favero  
Prof.Dr. Giovani Marino Fávero  
Ciências Biológicas e da Saúde  
<http://www.editora.uepg.br/index.php/biologica>

<http://www.revistas2.uepg.br/index.php/biologica/index>

---

<sup>6</sup> Normas da Revista no anexo 3.

# **EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO E REMOBILIZAÇÃO PELA COMBINAÇÃO NATAÇÃO E SALTO EM MEIO AQUÁTICO, SOBRE A MORFOLOGIA DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR DE RATOS**

**Effects of immobilization and remobilization by combination of swimming and jumping  
in the aquatic environment on the morphology of tibialis anterior muscle of rats**

Regina Inês Kunz<sup>[a]</sup>

Josinéia Gresele Coradini<sup>[b]</sup>

Carmen Lúcia Soares Rondon<sup>[c]</sup>

Rose Meire Costa Brancalhão<sup>[d]</sup>

Gladson Ricardo Flor Bertolini<sup>[e]</sup>

Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro<sup>[f]</sup>

<sup>[a]</sup> Fisioterapeuta, mestranda em Biociências e Saúde pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná – Brasil, e-mail: regina\_kunz@hotmail.com

<sup>[b]</sup> Fisioterapeuta, mestranda em Biociências e Saúde/UNIOESTE, Cascavel, Paraná – Brasil, e-mail: josi.coradini@hotmail.com

<sup>[c]</sup> Mestre em Ciências da Reabilitação, docente do Curso de Fisioterapia/UNIOESTE, Cascavel, Paraná – Brasil, e-mail: clrondon@yahoo.com.br

<sup>[d]</sup> Doutora em Zoologia, docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde/UNIOESTE, Cascavel, Paraná – Brasil, e-mail: rosecb@gmail.com

<sup>[e]</sup> Doutor em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde/UNIOESTE, Cascavel, Paraná – Brasil, e-mail: gladson\_ricardo@yahoo.com.br

<sup>[f]</sup> Doutora em Ciências Biológicas, docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde/UNIOESTE, Cascavel, Paraná – Brasil, e-mail: lucineia.cr@gmail.com

## **Endereço para correspondência:**

Laboratório de Biologia Celular, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Rua:  
Universitária, nº 2069 – CEP 85819-110 – Telefone: (45) 3220-3237 Cascavel –Paraná - E-  
mail: lucineia.cr@gmail.com

## **Resumo**

A integridade morfológica e funcional do músculo estriado esquelético é mantida pelo tecido conjuntivo, importante na execução da função contrátil. As fibras musculares e o tecido conjuntivo podem sofrer alterações frente ao excesso ou ausência de carga mecânica. Este trabalho analisou o efeito da imobilização e da remobilização sobre parâmetros morfológicos da fibra muscular e do tecido conjuntivo do músculo tibial anterior. Foram utilizados 18 ratos machos, divididos em três grupos: G1 – imobilizados por 15 dias; G2 – remobilizados livremente; G3 – remobilizados por meio

de natação e salto em meio aquático, realizados em dias alternados e com progressão de tempo e série dos exercícios. Foram coletados e processados para microscopia de luz o músculo tibial anterior, tanto direito (imobilizado/remobilizado) quanto esquerdo (controle). Observou-se que a imobilização alterou a morfologia da fibra muscular, que apresentou formas polimórficas e a necrose das fibras. Também houve aumento da quantidade de tecido conjuntivo, com mudanças na sua organização. Em G2 e G3, foram verificadas algumas fibras polimórficas, embora não tenham sido observadas fibras em necrose. O tecido conjuntivo ainda se apresentava alterado quanto à organização, mas houve redução na quantidade. Conclui-se que a imobilização afeta o tecido muscular, tanto a morfologia das fibras musculares, quanto o tecido conjuntivo intramuscular do tibial anterior. A remobilização livre e por exercícios terapêuticos causaram melhora nos aspectos morfológicos da fibra muscular, assim como no tecido conjuntivo intramuscular.

**Palavras-chave:** Músculo esquelético. Tecido conjuntivo. Reabilitação.

### **Abstract**

The morphological and functional integrity of skeletal muscle is maintained by connective tissue, important in the implementation of contractile function. Muscle fibers and connective tissue may suffer alterations against excess or absence of mechanical load. This study analyzed the effect of immobilization and remobilization on morphological parameters of the muscle fiber and connective tissue of the tibialis anterior muscle. 18 male rats were used, divided into three groups: G1 - immobilized for 15 days; G2 - remobilized freely; G3 - remobilized through swimming and jumping in water, performed on alternate days with progression of time and number of exercises. Were collected and processed for light microscopy both right (assets/remobilized) and left (control) tibialis anterior muscles. It was observed that the immobilization changed the morphology of the muscle fiber, which showed polymorphic forms and caused necrosis of the fibers. Also, there was increase in the amount of connective tissue, with changes in its organization. In G2 and G3, some fibers were found polymorphic, although there were no fibers observed in necrosis. The connective tissue still showed to be altered in regards to its organization, but there was a reduction in the amount. It is concluded that immobilization affects muscle tissue, both the morphology of the muscle fibers and the intramuscular tissue of the anterior tibialis. Free remobilization and exercise therapy caused improvement in muscle fiber morphologic aspects, as well as in the intramuscular connective tissue.

**Keywords:** Skeletal muscle. Connective tissue. Rehabilitation.

## Introdução

O músculo esquelético totaliza 40% a 50% da massa corporal (SATO et al., 2011) e, microscopicamente, caracteriza-se pela presença de fibras musculares esqueléticas longas, estreitas e multinucleadas. Seus núcleos localizam-se perifericamente na fibra, abaixo da membrana sarcoplasmática. (BERCHTOLD; BRINKMEIER; MUNTENER, 2000; DAL PAI SILVA; CARVALHO, 2007). O diâmetro das fibras pode variar de 10 a 100 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) e o comprimento pode chegar até 10 centímetros (cm), dependendo da arquitetura muscular. (DAL PAI SILVA; CARVALHO, 2007).

As fibras musculares têm sua integridade morfológica e funcional mantida pelo tecido conjuntivo, uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, que envolve o músculo. (CAIERÃO; TEODORI; MINAMOTO, 2007). Este pode ser dividido em três bainhas conjuntivas distintas: o epimísio, que envolve todo o músculo externamente; o perimísio, que o divide em fascículos, cada um contendo várias fibras musculares; e o endomísio, que envolve cada fibra muscular individualmente. (DAL PAI SILVA; CARVALHO, 2007; GILLIES; LIEBER, 2011; OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

Várias funções podem ser atribuídas ao tecido conjuntivo do músculo, entre elas a capacidade de preencher o espaço entre as fibras musculares e assim permitir a união e alinhamento entre essas fibras; coordenar a transmissão de força pelo músculo e transmitir o movimento resultante para o tendão e o osso; também é um tecido de sustentação para nervos e vasos sanguíneos; e lubrifica as estruturas, facilitando o deslizamento. (PURSLOW, 2005; PURSLOW, 2010; PURSLOW, 2002).

O tecido muscular possui uma elevada capacidade de adaptação estrutural e funcional, a chamada plasticidade neuromuscular. Dessa forma, a massa e a composição são diretamente relacionadas com sua função, podendo ser reguladas de acordo com a carga de trabalho, a atividade e as condições patológicas. (HOOD et al., 2006; LIMA et al., 2007; ZHANG; CHEN; FAN, 2007). Ainda, estímulos podem acarretar alterações musculares, como a imobilização, um recurso terapêutico frequentemente usado no tratamento de injúrias músculo-esqueléticas. (CORNACHIONE et al., 2013; SAKAKIMA, 2004).

A maioria dos estudos sobre os efeitos da imobilização são realizados em relação às propriedades contráteis do músculo estriado esquelético, em que o principal efeito encontrado é a atrofia, caracterizada pela diminuição da área de secção transversa da fibra muscular e conteúdo proteico. (ZHANG; CHEN; FAN, 2007; BARONI et al., 2010). Além disso, a imobilização pode causar mudanças na relação força-comprimento de acordo com a posição

em que o músculo é imobilizado. (BARONI et al., 2010). Shah et al. (2001) observaram que o número de sarcômeros varia em resposta à perturbação crônica do comprimento, sendo que a imobilização em posição encurtada diminui sua quantidade, enquanto em posição alongada ela a aumenta.

Cabe ressaltar que a íntima associação entre a fibra muscular e o tecido conjuntivo circundante é importante na execução da função. Além disso, o colágeno é provavelmente o maior contribuinte da coerência e da propriedade tênsil do tecido conjuntivo muscular. (JÓZSA et al., 1990).

Assim, o objetivo do estudo foi analisar o efeito da imobilização e da remobilização pela combinação de natação e salto em meio aquático, sobre os aspectos morfológicos da fibra muscular e do tecido conjuntivo intramuscular do músculo tibial anterior de ratos *Wistar*.

## **Materiais e métodos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* de Cascavel/PR, sob o protocolo 03012, sendo realizado de acordo com as diretrizes internacionais para pesquisas com animais. (ZIMMERMANN, 1983).

Foram utilizados 18 ratos machos da linhagem *Wistar*, com  $10 \pm 2$  semanas de idade, mantidos em fotoperíodo claro-escuro de 12 horas e temperatura de 23°C, com água e ração *ad libitum*. Todos os animais tiveram seu membro posterior direito imobilizado e, em seguida, foram divididos em três grupos experimentais, com seis ratos em cada grupo:

- G1: imediatamente eutanasiados após o período de imobilização;
- G2: remobilização livre na gaiola por 14 dias, e, além disso, os animais eram colocados em contato com a água por aproximadamente um minuto, de maneira que recebessem estímulo aquático diariamente;
- G3: remobilizados por 14 dias por meio de natação e salto em meio aquático, realizados em dias alternados, totalizando 7 dias de tratamento com natação e 7 dias de tratamento com salto.

Neste trabalho, os valores reportados para o membro esquerdo serviram como controle na verificação de adaptações ocorridas no membro direito (imobilizado), da mesma forma que o realizado no estudo de Baroni et al. (2010).

### **Protocolo de imobilização**

Foi utilizado um aparato de imobilização, confeccionado com material próprio para engessar um segmento corporal, sendo o mesmo: ligadura de tecido saturada com sulfato de cálcio desidratado ( $\text{CaSO}_4$ ), sob a forma de pó branco, caracterizando uma atadura gessada. Todos os grupos experimentais tiveram a descrita órtese moldada diretamente no membro posterior direito de cada animal, sendo colocada em toda a extensão do membro de forma que este permaneceu em extensão da articulação do joelho e flexão plantar completa do tornozelo, ou seja, em posição de alongamento do tibial anterior, que foi mantida na posição descrita acima por um período de 15 dias consecutivos.

### **Protocolo de remobilização**

Aos animais do G2 foi permitida a remobilização livre na gaiola e estes foram apenas colocados em contato com a água, a fim de garantir o mesmo tratamento entre os grupos experimentais, minimizando diferentes respostas de estresse pela ação do contato com o meio aquático. Já os animais do G3 foram submetidos à remobilização, alternando exercícios de natação, simulando o nado *crawl*, e salto em meio aquático por 14 dias, sendo que esses animais foram previamente treinados por 5 dias consecutivos, antes do período de imobilização. Nos seis primeiros dias de remobilização, a natação foi realizada durante 20 minutos e os saltos foram efetuados em duas séries de 10 saltos cada. Nos oito dias restantes de remobilização, efetuou-se uma progressão quanto ao tempo e séries dos exercícios realizados, sendo que o tempo de natação foi de 40 minutos e os saltos foram realizados em quatro séries de 10 saltos cada.

O exercício de natação foi realizado sem nenhuma sobrecarga, enquanto o exercício de salto em meio aquático foi realizado com sobrecarga de 50% do peso corporal. (GAFFURI et al., 2011).

### **Eutanásia dos animais e preparação histológica**

Os animais do G1, logo após o período de imobilização, e os animais de G2 e G3, logo após a remobilização, foram pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (50mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10mg/Kg). Sob o efeito dos anestésicos, os animais foram decapitados em guilhotina. Em seguida, foram coletados o músculo tibial anterior direito e esquerdo. Após a fixação em formol 7%, os músculos foram armazenados em álcool 70% e

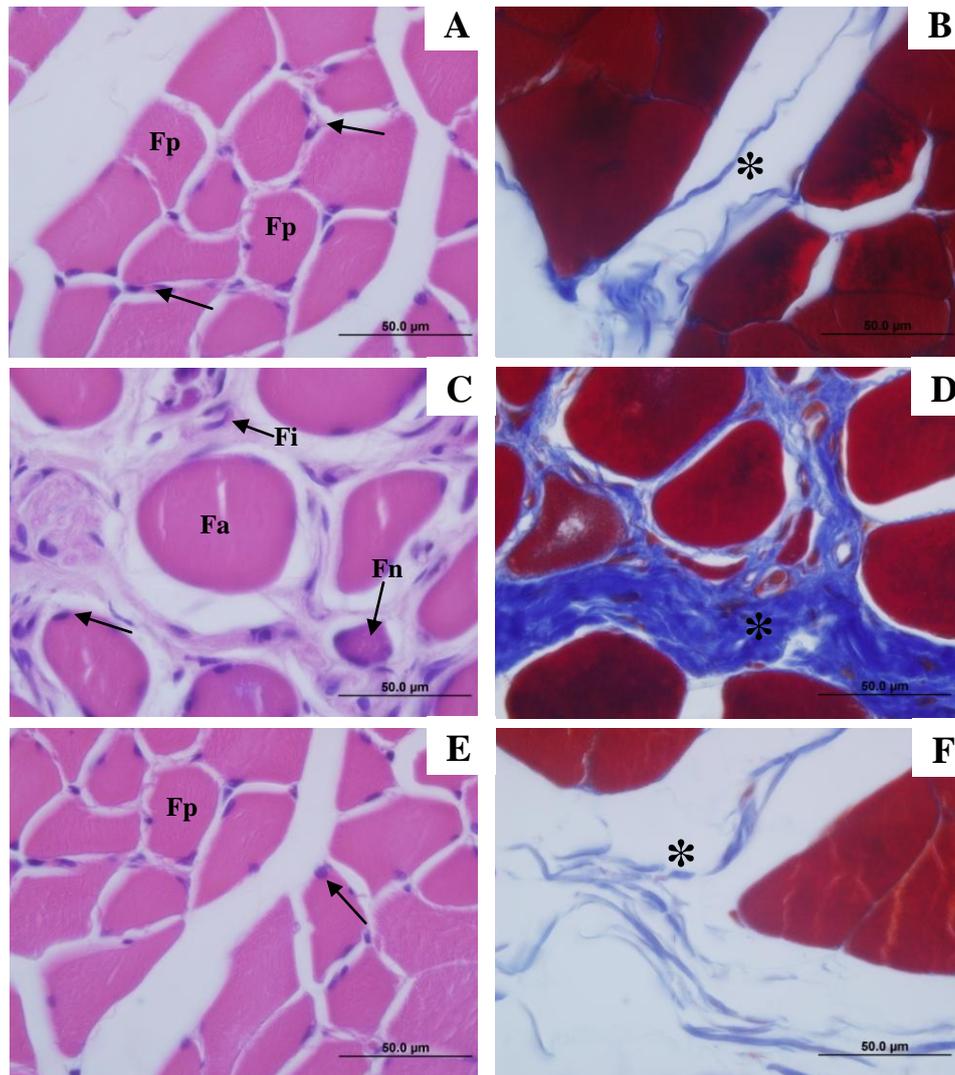
seguiram o procedimento histológico de rotina para emblocamento em parafina. Foram obtidos cortes transversais de 7  $\mu\text{m}$  das fibras musculares, corados em hematoxilina e eosina e Tricrômico de Mallory. (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz e fotomicrografadas.

## **Resultados**

Na análise, foi identificado que no músculo tibial anterior esquerdo (controle) dos grupos estudados, as fibras musculares apresentavam-se com contorno poligonal, núcleos em posição periférica e padrão fascicular normal (figura 1A). O conjuntivo intramuscular (perimísio) se mostrou rico em fibras colágenas envolvendo os feixes musculares (figura 1B), com a presença de feixes nervosos e vasos sanguíneos, cujas células principais observadas foram os fibroblastos, dispersos no perimísio (não mostrado).

Os músculos dos animais do G1 (imobilizados) (figura 1C) exibiam grande quantidade de fibras polimórficas, muitas com formato arredondado, mantendo o posicionamento do núcleo; além disso, foi possível verificar a presença de fibras em necrose. Ainda, constatou-se um aumento na quantidade de tecido conjuntivo, com abundância de fibras colágenas, que se mostraram de aspecto descontínuo (figura 1D); também houve um aumento na quantidade de fibroblastos (figura 1C).

Nos animais de G2 e G3, remobilizados livremente e por exercícios terapêuticos, respectivamente, constatou-se que a maioria das fibras musculares retornou ao seu formato poligonal característico (figura 1E), não sendo visualizadas fibras em necrose. Da mesma forma que o verificado nas fibras musculares, o conjuntivo do perimísio retornou ao seu arranjo normal característico, em grande parte do músculo, tanto no constituinte colágeno, quanto na quantidade de fibroblastos (figura 1F).



**Figura 14:** Fotomicrografias do músculo tibial anterior de ratos *Wistar*, controle (A e B), G1 (C e D) e G3 (E e F). Corte transversal, coloração hematoxilina-eosina (A, C e E) e tricrômico de Mallory (B, D e F). Em A, fibras poligonais (Fp) com núcleos periféricos (seta) e em B, conjuntivo rico em fibras colágenas (asterisco). Em C, fibras arredondadas (Fa) e em necrose (Fn), e aumento na quantidade de fibroblastos (Fi). Em D, aumento na quantidade de conjuntivo, que se apresentou com aspecto desorganizado (asterisco). Em E, fibras poligonais (Fp) com núcleos periféricos (seta) e, em F, conjuntivo levemente desorganizado e de aspecto descontínuo (asterisco).

## Discussão

As alterações morfológicas causadas no formato das fibras musculares do grupo imobilizado (G1) são indicações de lesão muscular, como proposto por Brito et al. (2006). O período de imobilização (15 dias) foi prejudicial para as fibras musculares do tibial anterior, levando-o à degeneração, pois, como verificado, algumas fibras estavam necrosadas. Fernandes et al. (2008) afirmam que a necrose da fibra muscular é o evento inicial da degeneração muscular. Ainda, segundo Rocha et al. (2010), a imobilização pode causar microlesões nas miofibrilas, levando ao aumento de espécies reativas de oxigênio e radicais

livres no tecido muscular, conseqüentemente diminuindo a miofibrilogênese e a massa muscular.

Nos animais remobilizados livremente e/ou por exercícios terapêuticos houve uma diminuição das alterações indicativas de lesão na fibra muscular. De acordo com Fernandes et al. (2008), a musculatura esquelética possui a capacidade de se regenerar rapidamente, mesmo após danos considerados severos. Hawke e Garry (2001) afirmam que essa regeneração é promovida por células satélites, que são ativadas e proliferam em resposta a estímulos, como a sobrecarga mecânica. Assim, a recuperação similar das fibras musculares observadas nos animais de G2 e G3 provavelmente seja independente do tipo de remobilização e, sim, resultado da capacidade intrínseca de plasticidade da musculatura esquelética, que ativa mitoticamente as células satélites.

No que tange às modificações do tecido conjuntivo, Lima et al. (2007) observaram que a imobilização diminui a tensão ativa e passiva atuante sobre o músculo, levando a uma alteração no metabolismo dos fibroblastos, que, por sua vez, respondem com o aumento da área de tecido conjuntivo intramuscular, principalmente na imobilização em encurtamento. (WILLIAMS; GOLDSPIK, 1984). Apesar de, no presente estudo, a imobilização do tibial anterior ter sido em alongamento muscular, esse aumento do tecido conjuntivo intramuscular também foi observado. De acordo com Desmoulière (1995) e Gabbiani (1993), essa proliferação e deposição de tecido conjuntivo é um mecanismo de resposta dos fibroblastos frente a uma lesão, objetivando a cicatrização e reparação tecidual.

Kannus et al. (1998) observaram em seu estudo que três semanas de imobilização causaram um aumento da área de tecido conjuntivo nos músculos sóleo e gastrocnêmio. No mesmo estudo, após oito semanas de remobilização livre ou corrida em esteira, a área de tecido conjuntivo intramuscular retornou aos níveis controle. Embora os músculos estudados, os tempos de imobilização e os protocolos de remobilização tenham sido distintos do presente estudo, também foi verificada uma diminuição da quantidade de tecido conjuntivo após a remobilização.

Woo et al. (1975) afirmaram que a imobilização reduz a quantidade de água e glicosaminoglicanas, tornando o tecido conjuntivo menos elástico e mais quebradiço, respondendo pelo aspecto descontínuo verificado. Venojärvi et al. (2004) observaram que o exercício promove um alinhamento mais funcional das fibras colágenas que compõem o tecido conjuntivo intramuscular; assim, a remobilização livre e por associação de exercícios terapêuticos apresenta um efeito reparador sobre o conjuntivo intramuscular.

Além disso, observou-se que exercícios com maior intensidade, com os parâmetros realizados em G3, não se mostraram mais eficazes na recuperação tanto da fibra quanto do tecido conjuntivo. Assim, como já proposto por Caierão, Teodori e Minamoto (2007), a mobilização, seja livre ou forçada, é benéfica no remodelamento do músculo estriado esquelético.

Cabe ressaltar que profissionais de saúde devem estar cientes dessas alterações causadas sobre a morfologia da fibra e do tecido conjuntivo muscular, após um período de imobilização, o que constitui subsídio para um melhor atendimento terapêutico.

### **Conclusão**

Conclui-se que a imobilização afeta o tecido muscular, tanto a morfologia das fibras musculares, quanto o tecido conjuntivo intramuscular do tibial anterior. A remobilização livre e por exercícios terapêuticos causou melhora nos aspectos morfológicos da fibra muscular, assim como no tecido conjuntivo intramuscular.

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fornecimento da bolsa de Mestrado; à UNIOESTE e ao Programa de Mestrado em Biociências e Saúde, pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa.

### **Referências**

BARONI, B. M.; GALVÃO, A. Q.; RITZEL, C. H.; DIEFENTHAELER, F.; VAZ, M. A. Adaptações neuromusculares de flexores dorsais e plantares a duas semanas de imobilização após entorse de tornozelo. **Rev Bras Med Esporte**, v. 16, n. 5, p. 358-362, 2010.

BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1215-1265, 2000.

BRITO, M. K. M.; CAMARGO FILHO, J. C. S.; VANDERLEI, L. C. M.; TARUMOTO, M. H.; DAL PAI, V.; GIACOMETTI, J. A. Geometrical dimensions of fibers from the soleum muscle in rats exercised on treadmill: the importance of the analysis by means of digitalized images. **Rev Bras Med Esporte**, v. 12, n. 2, p. 103-107, 2006.

CAIERÃO, Q. M.; TEODORI, R. M.; MINAMOTO, V. B. A influência da imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. **Rev Fisioter Movimento**, v. 20, n. 1, p. 87-92, 2007.

CORNACHIONE, A. S.; CAÇÃO-BENEDINI, L. O.; BENEDINI-ELIAS, P. C. O.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Effects of 40 min of maintained stretch on the soleus and plantaria muscles of rats applied for different periods of time after hindlimb immobilization. **Acta Histochem**, v. 115, n. 5, p. 505-511, 2013.

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Rev Bras Zootecnia**, v. 36, supl. Especial, p. 21-31, 2007.

DESMOULIÈRE, A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. **Cell Biol Int**, v. 19, p. 471-476, 1995

FERNANDES, T.; SOCI, U. P. R.; ALVES, C. R.; CARMO, E. C.; BARROS, J. G.; OLIVEIRA, E. M. Determinantes moleculares da hipertrofia do músculo esquelético mediados pelo treinamento físico: estudo de vias de sinalização. **Rev Mackenzie Edu Fís Esporte**, v. 7, n. 1, p. 169-188, 2008.

GABBIANI, G. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. **Boll Zoologia**, v. 60, n. 4, p. 399-401, 1993.

GAFFURI, J.; MEIRELES, A.; ROCHA, B. P.; ROSA, C. T.; ARTIFON, E. L.; SILVA, L. I.; MOREIRA, N. B.; BERTOLINI, G. R. F. Avaliação do exercício físico como fator de analgesia em um modelo experimental de cialgia. **Rev Bras Med Esporte**, v. 17, n. 2, p. 115-118, 2011.

GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318-331, 2011.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, v. 91, p. 534-551, 2001.

HOOD, D. A.; IRRCHER, I.; LJUBICIC, V.; JOSEPH, A. M. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. **J Exp Biol**, v. 209, p. 2265-2275, 2006.

JÓZSA, L.; KANNUS, P.; THÖRING, J.; REFFY, A.; JÄRVINEN, M.; KVIST, M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue: a morphometric and microscopy study in rat calf muscles. **J Bone Joint Surg Br**, v. 72b, n. 2, p. 293-297, 1990.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; JÄRVINEN, T. L. N.; KVIST, M.; VIENO, T.; JÄRVINEN, T. A. H.; NATRI, A.; JÄRVINEN, M. Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. **J Appl Physiol**, v. 84, p. 1418-1424, 1998.

LIMA, S. C.; CAIERÃO, Q. M.; DURIGAN, J. L. Q.; SCHWARZENBECK, A.; SILVA, C. A.; MINAMOTO, V. B.; GUIRRO, R. R. J. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. **Rev Bras Fisioter**, v. 11, n. 4, p. 297-302, 2007.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter – Bases da Histologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

PURSLOW, P. P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality – Review. **Meat Sci**, v. 70, p. 435-447, 2005.

PURSLOW, P. P. Muscle fascia and force transmission. **J Bodyw Mov Ther**, v. 14, p. 411-417, 2010.

PURSLOW, P. P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comp Biochem Physiology Part A**, v. 133, p. 947-966, 2002.

ROCHA, W. A.; GOBBI, G. A.; ARAUJO, V. F.; SANTUZZI, C. H.; COUTINHO, G. C.; NOGUEIRA, B. V.; GONÇALVES, W. L. S. Alterações morfofuncionais musculares em resposta ao alongamento passivo em modelo animal de imobilização prolongada de membro posterior. **Rev Bras Med Esporte**, v. 16, n. 6, p. 450-454, 2010.

SAKAKIMA, H. Effects of immobilization and subsequent low and high frequency treadmill running on rat soleus muscle and ankle joint movement. **J Phys Ther Sci**, v. 16, p. 43-48, 2004.

SATO, S.; SHIRATO, K.; TACHIYASHIKI, K.; IMAIZUMI, K. Muscle plasticity and  $\beta$ 2-adrenergic receptors: adaptative responses of  $\beta$ 2-adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

SHAH, S. B.; PETERS, D.; JORDAN, K. A.; MILNER, D. J.; FRIDÉN, J.; CAPETANAKI, Y.; LIEBER, R. L. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. **J Exp Biol**, v. 204, p. 1703-1710, 2001.

VENOJÄRVI, M.; KVIST, M.; ATALAY, M.; JOZSA, L.; KALIMO, H. Recovery from immobilization: responses of fast-twitch muscle fibres to spontaneous and intensive exercise in rat calf muscles. **Pathophysiology**, v. 11, n. 1, p. 17-22, 2004.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **J Anat**, v. 138, p. 343-504, 1984.

WOO, S. L.; MATTHEWS, J. V.; AKESON, W. H.; AMIEL, D.; CONVERY, F. R. Connective tissue response to immobility: correlative study of biomechanical measurements of normal and immobilized rabbit knees. **Arthritis Rheum**, v. 18, n. 3, p. 257-264, 1975.

ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. **Med Hypotheses**, v. 69, p. 310-321, 2007.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

## 10 ANEXOS

### 10.1 Normas para publicação da Brazilian Journal of Medical and Biological Research

#### Preparation of Research Manuscripts

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research publishes original research articles of outstanding scientific significance. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a limited number of experiments. The key criteria are that the research demonstrates clearly its novelty, its importance to a particular field as well as its interest to those outside that discipline, and conclusions that are justified by the data.

#### Text format

The text of a manuscript can only be accepted as a Microsoft Word file as a "doc".

- Each page should contain the page number in the upper right-hand corner starting with the title page as page 1.
- Report all measurements in Système International, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) and standard units where applicable (see below).
- Do not use abbreviations in the title or abstract and limit their use in the text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures must be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.
- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and country or electronic address of the manufacturer should be given in parentheses in the text.

Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources: *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 7th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006; *Medical Style and Format*. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD. The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (<http://www.icmje.org/>).

The writing style should be concise and accessible. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

Although we encourage submissions from around the globe, we require that manuscripts be submitted in American English. As a step towards overcoming language barriers, we encourage authors to seek the assistance of professional services available on the site.

#### Abbreviations

Abbreviations should be kept to a minimum. Define all abbreviations upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

- Explain all abbreviations in the text, figure and table legends when they first appear. Keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 mL, not 3 milliliters (mL)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Use abbreviations in figures and tables to save space, but they must be defined in the legend.

### **Nomenclature**

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature. We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible:

We strongly encourage the use of SI units. If you do not use these exclusively, please provide the SI value in parentheses after each value. Examples:

- s for second
- min for minute
- h for hour
- L for liter
- m for meter
- kDa for mass in kilodaltons
- 5 mM rather than  $5 \times 10^{-3}$  M or 0.005 M

Species names should be italicized (e.g., ***Homo sapiens***).

Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., HUGO for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text.

The Recommended International Non-Proprietary Name (rINN) of drugs should be provided.

### **Manuscript categories**

Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a Full-length Paper, Short Communication, Review Article, Concepts and Comments, Case Report, Overview.

### **Full-length paper**

Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis; the experimental design and methods used (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study, and a section placing the results in the context of published literature.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions
- no more than 40 references (without exceptions)

### **Organization of the Manuscript**

Most articles published in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research will be organized into the following sections: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Key words, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, Tables with legends and footnotes, Figure legends and Figures. Uniformity in format will facilitate the experience of readers and users of the journal. Continuous page numbers are required for all pages including figures. There are no specific length restrictions for the overall manuscript or individual sections. However, we urge authors to present and discuss their findings concisely. We recognize that some articles will not be best presented in our research article format. If you have a manuscript that would benefit from a different format, please contact the editors to discuss this further.

### **Title Page**

#### **Title**

The title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.

Example:

**Single-step purification of crotopotin and crotoactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing**

Please also provide a brief "running title" of approximately 60 characters.

Example:

**Purification of crotopotin and crotoactine**

#### **Authors and Affiliations**

Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions). Institution(s) (Department, Faculty, University, city, state, country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil).

Example:

**A.S. Aguiar<sup>1</sup>, A.R. Melgarejo<sup>1</sup>, C.R. Alves<sup>2</sup> and S. Giovanni-De-Simone<sup>2,3</sup>**

**<sup>1</sup>Divisão de Animais Peçonhentos, Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ, Brasil**

**<sup>2</sup>Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil**

**<sup>3</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil**

**One of the authors** should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the summary of the author contributions to the study are accurate and complete. If the article has been

submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed after the Acknowledgments.

**Corresponding author:** Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of author to whom correspondence should be sent.

**Acknowledgment** of research grants and fellowships (agency and grant number).

### **Key Words**

A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. A capital letter should be used for the first letter of each key word, separated by a semicolon. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see [http://www.scielo.br/bjmbr;articles search/subject](http://www.scielo.br/bjmbr;articles%20search/subject)) to index published articles.

### **Running title**

This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.

### **Abstract**

Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data, to be appreciated by the reader. The Brazilian Journal publishes unstructured abstracts.

The abstract should briefly and clearly present the problem, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions. It should mention the techniques used without going into methodological detail and mention the most important results. Abbreviations should be kept to a minimum and should be defined in both the Abstract and text.

Please do not include any reference citations in the abstract. If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.

The abstract should not exceed 250 words and should be written as a single paragraph double-spaced on a separate page following the title page.

Please see <[http://www.bjournal.com.br/writing\\_a\\_good\\_abstract.html](http://www.bjournal.com.br/writing_a_good_abstract.html)> for suggestions on writing a good abstract

### **Introduction**

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the introduction, think of readers who are not experts in this field. This should state the purpose of the investigation and justification for undertaking the research and relationship to other work in the field. An extensive listing or review of the literature should not be used. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about what was achieved.

### **Material and Methods**

Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated.

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. We encourage authors to submit, as separate files, detailed protocols for newer or less well-established methods. These will be linked to the article and will be fully accessible.

**Results**

The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. In some situations, it may be desirable to combine Results and Discussion into a single section. The Results section should provide results of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but a description of experiments that are peripheral to the main message of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supplemental files; these are published online alongside the accepted article. The Results section should be written in past tense.

**Discussion**

The purpose of the Discussion is to identify new and relevant results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text, especially in Results, may be cited but all of the results should not be repeated in detail in the Discussion. The Discussion should spell out the major conclusions and interpretations of the work including some explanation of the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The Discussion should be concise and tightly argued. If warranted, the Results and Discussion may be combined into one section.

**Acknowledgments**

When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues. People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments, along with their contributions. Donations of animals, cells, or reagents should also be acknowledged. You must also ensure that anyone named in the Acknowledgments agrees to being so named. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged on the title page.

**Figures**

Figures must be submitted in high-resolution version (600 dpi). Please ensure that the files conform to our Guidelines for Figure Preparation when preparing your figures for production.

**Preparing figure files for submission**

Brazilian Journal of Medical and Biological Research encourages authors to use figures where this will increase the clarity of an article. The use of color figures in articles is free of charge. The following guidelines must be observed when preparing figures. Failure to do so is likely to delay acceptance and publication of the article.

- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be provided as separate files in Word (.doc).
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figure titles and legends should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text. An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without moving back and forth between

this window and the relevant parts of the text. Each legend should have a concise title of no more than 15 words. The legend itself should be succinct, while still explaining all symbols and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods.

- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements, when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see Guidelines for figures.
- Individual figure files should not exceed 5 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere. In order for all figures to be open-access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non-open-access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

### **Supported file types**

The following file formats can be accepted. Detailed information for each file type can be found by clicking on individual links.

- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)
- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)

### **Micrographs should be treated like photographs with the following additional guidelines**

- Details of the magnification should be given as a magnification bar
- Details of any stains used and the method of preparation the sample should be given in the figure legend or in the Methods section.
- Detailed information about the microscope used should be included in the figure legend or in the Methods section.
- The type of camera, photographic software and details of any subsequent image manipulation should be given in the article text.

### **Tables**

- Tables must be submitted in word (.doc) or Excel (.xls).
- Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text.
- Tables must have a concise and descriptive title.
- All explanatory information should be given in a footnote below the table. Footnotes should be used to explain abbreviations and provide statistical information.
- All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text.
- Tables must be understandable without referring to the text.
- Each table should be submitted in a separate file. They should be uploaded after the manuscript file, in numerical order. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible.
- Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.

- Adapting/Reproducing Tables and Relevant Permissions. Acknowledgments of original sources of copied material should be given as a reference in the table footnote.
- Tables in Excel must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables.

### References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Meeting abstracts, conference talks, or papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only. All personal communications should be supported by a letter from the relevant authors. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references which are easily available in English should be cited.

The BJMBR uses the numbered citation (citation-sequence) method. References are listed and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in parentheses. Multiple citations within a single set of parentheses should be separated by commas without a space (1,5,7) . Where there are more than three sequential citations, they should be given as a range. Example: "...has been shown previously (4–9)." Make sure the parts of the manuscript are in the correct order before numbering the citations.

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For all references, list the first 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages, The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)). Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details. If the author uses the program "Reference Manager", copy the file containing the style of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research and place it in the folder of "Styles". When submitting the manuscript, send the file produced in Reference Manager (".rmd" and ".rmx" ) as an attachment. Please use the following style for the reference list:

**Published Papers.** First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation in italics), Year, Volume, Complete Pages.

Lammers AE, Hislop AA, Flynn Y, Haworth SG. The 6-minute walk test: normal values for children of 4-11 years of age. **Arch Dis Child** 2008; 93: 464-468.

Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Belin de CE, et al. Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2008; 28: 1627-1633.

National Heart Lung and Blood Institute. Global Initiative for Asthma (GINA). **Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO Workshop Report**. Bethesda: National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute publication No. 02-3659; 2006.

**Article accepted for publication but not yet published.** First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem** 2005 (in press).

**Electronic Journal Articles** (Online Journals). Ensure that URLs are active and available.

American Academy of Ophthalmology. Diabetic retinopathy disease severity scale. **Am Acad**

**Ophthalmol** [http://www.aao.org/education/library/recommendations/international\\_dr.cfm](http://www.aao.org/education/library/recommendations/international_dr.cfm); 2005. Accessed 11 August 2006.

Simon JA, Hudes ES. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. **JAMA** <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/24/2289>; 1999. Accessed 11 August 2006.

**Internet Communication**. Ensure that URLs are active and available.

Brasil. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade: pesquisa da população brasileira. <http://www.abeso.org.br>. Accessed February 22, 2008.

Information behaviour of the researcher of the future, CIBER Report. <http://www.bl.uk/news/2008/pressrelease20080116.html>.

CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.

CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I". <http://fomentonacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

#### **Audiovisual Material**

**Physician's Desk Reference (PDR)**. Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

#### **Computer Program**

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. **Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers**. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.

**Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)**. Version 12.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

#### **Patent**

Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

**Book, Whole**. Authors, Book title, Edition, City, Publisher, Year.

American College of Sports Medicine. **Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan; 2007.

**Book, Chapter**. Authors, Chapter Title, Editors, Book title, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

Kronfol A. Behavioral effects of cytokines: a psychiatrist's perspective. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA (Editors), **Cytokines stress and immunity**. London: CRC Press; 2007. p 1-16.

Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), **Plants that fight cancer**. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.

#### **Report**

WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). **Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury**. Geneva: World Health Organization; 1991.

National Commission on Sleep Disorders Research. **Wake up America: a national sleep alert**. Washington: Government Printing Office; 1993.

**Thesis**

Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypriformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

**Conference, Symposium Proceedings.** Cite papers only from published proceedings. Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. **Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology**. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

**"Unpublished results", "Personal communication" and "Submitted papers"**.

Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list.

(Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results).

It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication" is cited.

**Abstract.** First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages (Abstract).

Lima SM, Bonci DM, Grotzner SR, Ribeiro CA, Ventura DF. Loss of amacrine cells in MeHg-treated retinæ in a tropical fish. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2003; 44: E-5172 (Abstract).

## 10.2 Normas para publicação da Revista Brasileira de Medicina do Esporte

### Forma e preparação de manuscritos

O artigo submetido deve ser digitado em espaço duplo, fonte arial 12, papel tamanho A4 ou ofício, com margens de 2,5cm, sem numerar linhas ou parágrafos, e numerando as páginas no canto superior direito. Gráficos e tabelas devem ser apresentados no final do artigo em páginas separadas, assim como as legendas das figuras. As figuras devem ser incluídas em arquivos individuais. No corpo do texto deve-se informar os locais para inserção dos gráficos, tabelas ou figuras. Os manuscritos que não estiverem de acordo com as instruções a seguir em relação ao estilo e formato serão devolvidos sem revisão pelo Conselho Editorial.

### FORMATO DOS ARQUIVOS

- ◆ Para o texto, usar editor de texto do tipo Microsoft Word para Windows ou equivalente
- ◆ Não enviar arquivos em formato PDF ◆ As figuras deverão estar nos formatos jpg ou tif. Deverão estar incluídas no arquivo Word, mas também devem ser enviadas separadamente (anexadas durante a submissão do artigo como documento suplementar).

### ARTIGO ORIGINAL

Um artigo original deve conter no máximo 30 (trinta) referências e 20 (vinte) páginas incluindo referências, figuras e tabelas, e ser estruturado com os seguintes itens, cada um começando por uma página diferente:

**Página título:** deve conter (1) o título do artigo, que deve ser objetivo, mas informativo; (2) nomes completos dos autores; áreas de formação dos autores; instituição(ões) de origem, com cidade, estado e país, se fora do Brasil; (3) nome do autor correspondente, com endereço completo e e-mail. A titulação dos autores não deve ser incluída.

**Resumo:** deve conter (1) o resumo em português, com não mais do que 300 palavras, estruturado de forma a conter: introdução e objetivo, métodos, resultados e conclusão; (2) três a cinco palavras-chave, que não constem no título do artigo. Usar obrigatoriamente termos do *Medical Subject -Headings, do Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>); (3) o resumo em inglês (abstract), representando a versão do resumo para a língua inglesa; (4) três a cinco palavras-chave em inglês (keywords).

**Introdução:** deve conter (1) justificativa objetiva para o estudo, com referências pertinentes ao assunto, sem realizar uma revisão extensa; (2) objetivo do artigo.

**Métodos:** deve conter (1) descrição clara da amostra utilizada; (2) termo de consentimento para estudos experimentais envolvendo humanos; (3) identificação dos métodos, aparelhos (fabricantes e endereço entre parênteses) e procedimentos utilizados de modo suficientemente detalhado, de forma a permitir a reprodução dos resultados pelos leitores; (4) descrição breve e referências de métodos publicados, mas não amplamente conhecidos; (5) descrição de métodos novos ou modificados; (6) quando pertinente, incluir a análise estatística utilizada, bem como os programas utilizados. No texto, números menores que 10 são escritos por extenso, enquanto que números de 10 em diante são expressos em algarismos arábicos.

**Resultados:** deve conter (1) apresentação dos resultados em sequência lógica, em forma de texto, tabelas e ilustrações; evitar repetição excessiva de dados em tabelas ou ilustrações e no texto; (2) enfatizar somente observações importantes.

**Discussão:** deve conter (1) ênfase nos aspectos originais e importantes do estudo, evitando repetir em detalhes dados já apresentados na Introdução e nos Resultados; (2) relevância e limitações dos achados, confrontando com os dados da literatura, incluindo implicações para futuros estudos; (3) ligação das conclusões com os objetivos do estudo; (4) conclusões que podem ser tiradas a partir do estudo; recomendações podem ser incluídas, quando relevantes.

**Agradecimentos:** deve conter (1) contribuições que justificam agradecimentos, mas não autoria; (2) fontes de financiamento e apoio de uma forma geral. Referências: as referências bibliográficas devem ser numeradas na sequência em que aparecem no texto, em formato sobrescrito entre parênteses. As referências citadas somente em legendas de tabelas ou figuras devem ser numeradas de acordo com uma sequência estabelecida pela primeira menção da tabela ou da figura no texto.

O estilo das referências bibliográficas deve seguir as regras do *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Intern Med 1997;126:36-47; <http://www.icmje.org>)*. Alguns exemplos mais comuns são mostrados abaixo. Para os casos não mostrados aqui, consultar a referência acima. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *Index Medicus (List of Journals Indexed: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>)*. Se o periódico não constar dessa lista, deve-se utilizar a abreviatura sugerida pelo próprio periódico. Deve-se evitar utilizar "comunicações pessoais" ou "observações não publicadas" como referências. Um resumo apresentado deve ser utilizado somente se for a única fonte de informação.

### Exemplos:

1) Artigo padrão em periódico (deve-se listar todos os autores; se o número ultrapassar seis, colocar os seis primeiros, seguidos por et al): You CH, Lee KY, Chey RY, Mrnguy R. Electrocardiographic study of patients with unexplained nausea, bloating and vomiting. *Gastroenterology* 1980;79:311-4. Goate AM, Haynes AR, Owen MJ, Farrall M, James LA, Lai LY, et al. Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet* 1989;1:352-5.

2) Autor institucional: The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.

3) Livro com autor(es) responsáveis por todo o conteúdo: Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2 nd rev. ed. London: S. Paul, 1986.

4) Livro com editor(es) como autor(es): Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug-induced headache*. New York: Springer-Verlag, 1988.

5) Capítulo de livro: Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974;457-72.

### TABELAS

As tabelas devem ser elaboradas em espaço 1,5, devendo ser planejadas para ter como largura uma (8,7cm) ou duas colunas (18cm). Cada tabela deve possuir um título sucinto; itens explicativos devem estar ao pé da tabela. A tabela deve conter médias e medidas de dispersão (DP, EPM etc.), não devendo conter casas decimais irrelevantes. As abreviaturas devem estar de acordo com as utilizadas no texto e nas figuras. Os códigos de identificação de itens da tabela devem estar listados na ordem de surgimento no sentido horizontal e devem ser identificados pelos símbolos padrão.

## **FIGURAS**

Serão aceitas fotos ou figuras em preto-e-branco. Figuras coloridas poderão ser publicadas quando forem essenciais para o conteúdo científico do artigo. Nestes casos, os custos serão arcados pelos autores. Para detalhes sobre ilustrações coloridas, solicitamos contactar diretamente a Atha Editora ([atharbme@uol.com.br](mailto:atharbme@uol.com.br)). Figuras coloridas poderão ser incluídas na versão eletrônica do artigo sem custo adicional para os autores. Os desenhos das figuras devem ser consistentes e tão simples quanto possível. Não utilizar tons de cinza. Todas as linhas devem ser sólidas. Para gráficos de barra, por exemplo, utilizar barras brancas, pretas, com linhas diagonais nas duas direções, linhas em xadrez, linhas horizontais e verticais. A RBME desestimula fortemente o envio de fotografias de equipamentos e animais. As figuras devem ser impressas com bom contraste e largura de uma coluna (8,7cm) no total. Utilizar fontes de no mínimo 10 pontos para letras, números e símbolos, com espaçamento e alinhamento adequados. Quando a figura representar uma radiografia ou fotografia sugerimos incluir a escala de tamanho quando pertinente.

## 10.3 Normas para publicação na Publicatio UEPG – Ciências Biológicas e da Saúde

### Diretrizes para Autores

#### 1. DAS NORMAS GERAIS

1.1 A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa (ISSN 1676- 8485), destina-se à publicação de trabalhos de pesquisa básica e aplicada. A maioria das páginas da revista é reservada para: pesquisa original; observações clínicas com análise e discussão; relatos de casos ou reuniões clínicas, com discussões; estatísticas epidemiológicas, com análises e discussões; descrições ou avaliações de métodos ou procedimentos nas áreas de Ciências Biológicas e da Saúde. São aceitos artigos de revisão e comunicações breves.

1.2 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico. A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde reserva todos os direitos autorais do trabalho publicado, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução com devida citação de fonte.

1.3 A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde receberá para publicação trabalhos redigidos em português e/ou inglês, ficando os textos dos mesmos sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião dos Editores Associados e do Corpo de Consultores.

1.4 Deverão constar, no final dos trabalhos, e-mail dos autores, e colaboradores.

1.5 A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde reserva o direito de submeter todos os originais à apreciação do Editor Associado e Corpo de Consultores, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência ou não da publicação, podendo, inclusive reapresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto e/ou para que os adaptem às normas editoriais da Revista. Nesse caso, o referido trabalho será reavaliado pelos consultores.

1.6 Caberá a cada autor de artigo, um exemplar da revista, como única indenização por direitos autorais.

1.7 Não serão publicadas fotos coloridas, a não ser em casos de absoluta necessidade e a critério da comissão editorial, com custos para os autores.

1.8 Todos os trabalhos que envolvam estudo com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com as normas internacionais para pesquisa em seres humanos.

#### 2. DA APRESENTAÇÃO DO ORIGINAL

Publicatio UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde  
Publicatio UEPG - Biological and Health Sciences

#### ESCLARECIMENTOS E NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Os originais destinados à Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde deverão ser redigidos de acordo com as seguintes normas:

2.1 Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial e digitados em folhas de papel tamanho A4 (210 mm X 297 mm com espaço 1,5cm e margem de 3cm de cada um dos lados, e margens

superior e inferior 2,5cm perfazendo o total de no máximo 30 páginas, incluindo as ilustrações (gráficos, tabelas, fotografias etc.). Utilizar fonte Times New Roman, tamanho 12, exceto para notas de rodapé e título que deverão apresentar corpo 9 e 14 respectivamente.

## 2.2 Ilustrações:

- devem ser de boa qualidade;
- em separado do texto, numeradas em algarismos arábicos.;
- legendas em folha à parte com indicação do local aproximado de inserção no corpo do texto;
- figuras digitais devem ser apresentadas em JPG - 300 dpi de resolução em CD);
- gráficos devem ser apresentados no programa Excel ou no Word;
- mantendo as devidas proporções, usar tamanho máximo de largura de 8,5 cm ou 17,5 cm x 23,5 cm.

## 2.3 Tabelas e quadros

- legendas serão colocadas na parte superior. Numeradas em algarismos arábicos, conforme norma ABNT NBR 14724 de 17/03/2011.
- usar tamanho máximo de largura de 8,5 cm ou 17,5 cm.

2.4 As notas devem ser reduzidas ao mínimo e digitadas em pé de página, numeradas a partir de 1. Se houver nota no título, ela receberá asterisco e não numeração. As notas não devem ser utilizadas para referência bibliográfica. Estas devem ser feitas no corpo do trabalho.

2.5 Recomenda-se anotar, no texto, os nomes compostos e dos elementos, ao invés de suas fórmulas ou símbolos; preferencialmente, os períodos de tempo, também por extenso, ao invés de números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica, por extenso e sublinhados, ao invés de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos, conforme as regras internacionalmente aceitas e os símbolos métricos, de acordo com a legislação brasileira vigente.

2.6 No preparo do original, deverá ser observada a seguinte estrutura:

### a) Cabeçalho:

Título do artigo e subtítulo (quando os artigos forem em PORTUGUÊS, colocar título e subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em INGLÊS, colocar título e subtítulo em inglês e português).

Nome do(s) autor(es) - Com indicação da instituição de origem. Endereço, e-mail, telefone e fax do autor principal, e e-mail dos demais autores.

### b) Resumo

Consiste na apresentação concisa dos pontos relevantes do texto, com as principais conclusões, em no máximo 250 palavras.

c) Palavras-chave- Correspondem às palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo. No máximo 5.

d) Abstract- Consiste na apresentação concisa, em inglês, dos pontos relevantes do texto, com as principais conclusões, e deve conter, no máximo, 250 palavras.

e) Keywords- Correspondem às palavras ou expressões em inglês que identificam o conteúdo do artigo. No máximo 5.

f) Texto- Introdução, material e método, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos (quando houver).

g) Referências- Observar a norma ABNT para as referências NBR-6023/2002. As referências

deverão estar ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do autor. As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados deverão estar de acordo com as normas internacionais.

Obs.: A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos em andamento e os não publicados não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas, mas citados em notas de rodapé.

Alguns exemplos de referências bibliográficas:

Livro com um autor:

SANTI, V.

Livro com dois autores, elencar os nomes:

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R.

Livro com três autores, elencar os nomes conforme a ordem que aparecem na publicação, separados por ponto e vírgula:

ALMEIDA, J. C.; VARGAS, F.; LOBATO, M. L.

Mais de três autores, indica-se apenas o primeiro, seguido da expressão "et al."

CORREA, C. P. et al.

Capítulo de livro

STAHL, S. S. Marginal lesion. In: GOLDMAN, H. M.; COHEN, D. W. **Periodontal therapy**. 5.ed. St. Louis: Mosby, 1973. p. 94-98.

Tese

JANSEN, J. L. **Modificação da superfície de partículas sólidas através de tensoativos não iônicos em solução aquosa**: adsolubilização de esteróides, ácidos barbitúricos e outras moléculas ativas. Paris, 1995. 734 p. Tese (Doutorado em) - Université de Paris-Sud.

Artigo de periódico

TAKEDA, I. J. M.; GUERRERO, R. T. Fungos endófitos do gênero *Xylaria* em *Ilex paraguariensis* St. Hil (Aquifoliaceae). **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.1, n.3, p.109-125, 1997.

Maiores detalhes sobre referência, consultar norma NBR 6023/2002 ou o Manual de Normalização Bibliográfica para Trabalhos Científicos no

endereço: <http://ri.uepg.br:8080/riuepg//handle/123456789/441>

## 10.4 Parecer de aprovação do projeto



PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUACAO  
 COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
 RUA UNIVERSITÁRIA, 2069 – PREDIO DA BIBLIOTECA – CAMPUS DE CASCAVEL - JD. UNIVERISTÁRIO  
 FONE: (45) 3220-3272 E 3277 - CEP 85819-110 - CASCAVEL – PR



### Comitê de Ética no Uso de Animais

### CEUA/UNIOESTE

### PARECER DE APROVAÇÃO DE PROJETO

Protocolo de Experimentação Animal n°: **03012**

Título do Projeto: **Avaliação de parâmetros histomorfométricos do músculo sóleo e cartilagem articular de ratos Wistar, imobilizados em encurtamento e remobilizados com diferentes modalidades de exercícios terapêuticos.**

Solicitante: **Gladson Ricardo Flor Bertolini**

O projeto acima foi **aprovado**, conforme Ata 05-2012 em reunião ocorrida em 10-07-2012 realizada pelo Comitê de Ética no uso de animais, desde que seguido o protocolo proposto e avaliado por este Comitê.

Lembramos que, de acordo com as atribuições, o CEUA se resguarda do direito de realizar visitas aos locais onde os projetos serão executados com finalidade de acompanhamento.

Ao término da vigência do projeto, após o envio do relatório final, o coordenador receberá um Certificado de que o protocolo realizado seguiu os princípios da experimentação animal, de acordo com sua respectiva ata de aprovação em data especificada.

Cascavel, 10 de Julho de 2012.

Prof. Dr<sup>a</sup> Luciana Oliveira de Fariña  
 Coordenadora CEUA/UNIOESTE  
 Portaria 2861/2012-GRE