

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

ANDRÉ HEBLING
Biomédico

**ESTUDO HISTOQUÍMICO DA
ENZIMA NADH-TR NO MÚSCULO
FRONTAL DO COELHO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Buco-Dental.

Piracicaba

- 2001 -

i

UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTR.

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

ANDRÉ HEBLING
Biomédico

ESTUDO HISTOQUÍMICO DA ENZIMA NADH-TR NO MÚSCULO FRONTAL DO COELHO

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 14/03/02

Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Buco-Dental.

Orientadora: Profa. Dra. Heloisa A. de Lima Castro

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Heloisa A. de Lima Castro

Prof. Dr. Sérgio R. Peres Line

Prof. Dr. Luiz Antonio de Lima Resende

Piracicaba

- 2001 -

UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
H3542
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50099
PROC 16-837/02
C _____ DY _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 30/07/02
Nº CPD _____

CM00171070-0

BIB ID 249036

Ficha Catalográfica

H3566

H3542

Hebling, André.

Estudo histoquímico da enzima NADH-TR no músculo frontal do coelho. / André Hebling. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001. xii, 39f. : il.

Orientadora : Profª Drª Heloisa A. de Lima Castro.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anestésicos. 2. Histoquímica. 3. Face - Músculos. 4. Crânio. 5. Morfologia. 6. Enzimas. I. Castro, Heloisa A. de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 14 de Dezembro de 2001, considerou o candidato ANDRÉ HEBLING aprovado.

1. Profa. Dra. HELOISA AMELIA DE LIMA CASTRO

2. Prof. Dr. LUIZ ANTONIO DE LIMA RESENDE

3. Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

20234963

A meus pais,

DORIVAL e CACILDA,

que carinhosamente acompanham minha evolução.

À CRISTIANE,
esposa e companheira,
que fez com o seu amor
e dedicação o estímulo
maior de minha carreira.

À Profa. Dra. **HELOISA AMÉLIA DE LIMA CASTRO,**

pela atenção, carisma,

paciência e orientação

na condução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. **EDUARDO HEBLING**,

irmão e companheiro,

pelo incentivo e apoio à carreira docente.

Ao Prof. Dr. **CARLOS ROBERTO HOPPE**

FORTINGUERRA

(*“in memória”*),

pela amizade, pelos conselhos

e ensinamentos.

“A mais pura glória do mestre consiste não em formar discípulos
que o sigam, mas forjar sábios que o superem”

(Ramon Y. Cajal)

AGRADECIMENTOS

Nessa oportunidade, gostaríamos de ressaltar nossa gratidão a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram na elaboração deste trabalho e na nossa formação como docente.

Ao Prof. Dr. **LUIZ ANTONIO DE LIMA RESENDE**, pelo apoio constante durante os nossos trabalhos.

Ao Prof. Dr. **FAUSTO BÉRZIN**, pelos conselhos, estímulo e ensinamentos.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental pelos ensinamentos ministrados, pela amizade, pelo incentivo e gratificante convivência.

À bibliotecária **HELOÍSA**, pelo auxílio na obtenção das referências bibliografias.

Ao amigo **JOÃO BATISTA LEITE**, técnico do laboratório de Anatomia, pelo auxílio dado durante os experimentos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, **RENÊ, RUBENS, PAULO, GILSON, ANAMARIA, DELAINE, EDUARDO e FERNANDO**, pela amizade e convivência.

A todos os meus familiares pelo constante incentivo em minha formação profissional.

SUMÁRIO

	p.
Lista de Ilustrações	1
Lista de Abreviaturas	3
Resumo	4
Abstract	5
1. Introdução	6
2. Revisão da Literatura	8
2.1 - Uso de Modelos Animais em Pesquisa	8
2.2 - Características Anatômicas do Músculo Frontal	10
2.3 - Estudos da Histoquímica dos Músculos	12
3. Proposição	20
4. Material e Métodos	21
4.1 - Seleção da Amostra	21
4.2 - Delineamento do Estudo	21
4.3-Obtenção da Amostra	22
4.4- Preparo da Amostra	23
4.5 – Morfometria	23
4.6 – Análise Estatística	24
5. Resultados	25
6. Discussão	31
7. Conclusão	33
Referências Bibliográficas	34
Apêndice	
Anexo	

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas	p.
Tabela 1: Distribuição numérica e percentual dos tipos de fibras musculares encontradas	25
Tabela 2: Distribuição numérica e percentual dos tipos de fibras musculares encontradas nos animais da amostra	38

Lista de Figuras	p.
Figura 1: Microfotografia da amostra 1 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	26
Figura 2: Microfotografia da amostra 2 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	26
Figura 3: Microfotografia da amostra 3 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	27
Figura 4: Microfotografia da amostra 4 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	27
Figura 5: Microfotografia da amostra 5 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	28
Figura 6: Microfotografia da amostra 6 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	28
Figura 7: Microfotografia da amostra 7 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	29
Figura 8: Microfotografia da amostra 8 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	29
Figura 9: Microfotografia da amostra 9 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	30
Figura 10: Microfotografia da amostra 10 mostrando a diferenciação entre as fibras: A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X)	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Apud	Em
A.O	Aumento Óptico
et al.	Colaboradores
N₂	Nitrogênio
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Fosforase
NADH-TR	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Tetra-zolium Redutase
ATPase	Adenosina Trifosfatase
pH	Concentração de íons hidrogênio
m-ATPase	ATPase miofibrilar
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
UI	Unidade internacional
Op. Cit	Na obra citada
s.d.	Sem data
s.l.	Sem local
s.n.t.	Sem anotações tipográficas

RESUMO

O músculo frontal humano possui dois ventres, compondo, juntamente com o músculo occipital e a gálea aponeurótica, o músculo occipitofrontal; sendo um músculo estriado esquelético, o músculo frontal pode apresentar fibras musculares com alta intensidade de oxidação (tipo I) e com baixa intensidade de oxidação (tipo II). O uso de processo histoquímico, por meio de reações químicas orgânicas ou inorgânicas, permite obter um produto visível à microscopia óptica. O objetivo desse trabalho foi determinar, por meio de processo histoquímico de reação de Nicotinamide Adenine Dinucleotide Tetrazolium Redutase (NADH-TR) associado a morfometria, a distribuição histoquímica do número de fibras do tipo I e II do músculo frontal de coelhos da raça Norfolk inglesa, do sexo feminino, com idade de seis a oito meses, pesando de 2,8 a 3,1 Kg. Do total de 1010 fibras estudadas, o percentual de fibras encontradas foi de 33,8 % para o tipo I, de 17,4 % para o tipo II A e de 48,8 % para o tipo II B. A maioria das fibras encontradas era do tipo II, demonstrando a intensa atividade desse músculo na mímica facial. As fibras do tipo II apresentam baixa intensidade oxidativa, sendo assim, passíveis de sofrerem fadiga muscular. Esses achados podem auxiliar nos estudos de miopatias que possam ocorrer nesse músculo.

ABSTRACT

The human frontal muscles has two bellies, forming, together with the occipital muscle and the aponeurotic galea, the occipitofrontal muscle. Being a striated skeletal muscle, the frontal muscle can show muscular fibers with high intensity oxidation (type I) and with low intensity oxidation (type II). A histochemical process using organic and inorganic chemical reactions allows us to obtain a product that is visible through optical microscopy. The purpose of this paper is to determine, by means of the histochemical process of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Tetra-zolium Reductase (NADH-TR) reaction associated to morphometrics, the histochemical distribution of the number of the type I and II frontal muscle fibers of female, six to eight months old, 2.8 to 3.1 Kg English Norfolk rabbits. In 1010 fibers studied, we found 33.8% type I, 17.4% type IIA and 48.8% type IIB. The majority of fibers were type II, demonstrating this muscle's intense activity during facial mimicking. Type II fibers showed a reduced oxidative intensity, which made them subject to muscular fatigue. These findings may be of help in the study of myopathies that may occur in this muscle.

1. Introdução

O uso de modelos animais, na compreensão da fisiologia, da anatomia, do uso de terapias e de inúmeras patologias do ser humano, faz parte do histórico do desenvolvimento das ciências biomédicas aplicadas aos homens. Na área da Ciência da Anatomia, o coelho tem sido utilizado como modelo em experimentos por apresentar alguns pontos de sua anatomia semelhantes aos dos homens (ROLLIN & KESEL, 1990). Em relação a sua anatomia muscular, o coelho apresenta a musculatura mímica da face similar a do homem, sobretudo a musculatura dos terços frontal e médio da face, podendo ser utilizado como modelo animal no estudo de algumas patologias que envolvam ou ocorram nesses músculos (ROLLIN & KESEL, 1990).

A histoquímica é o ramo da ciência cujos métodos possibilitam o estudo da identificação, localização e concentração de enzimas presentes nos tecidos, células e organelas. Os diferentes métodos histoquímicos baseiam-se na identificação visual de produtos finais de reação, gerados a partir dos substratos, mediante a ação catalítica do tipo de enzima presente. A localização e demonstração dessas enzimas são úteis como marcadores morfológicos e como reveladores da função da célula ou tecido, possibilitando assim o diagnóstico histopatológico de muitas alterações ou doenças (DUBOWITZ, 1985).

A grande concentração de enzimas oxidoreductases nos tecidos musculares, sobretudo as do tipo diaforase, como as Nicotinamide Adenine Dinucleotide Tetra-zolium Redutase (NADH-TR), permite o uso de métodos histoquímicos em experimentos nestes

tecidos (DUBOWITZ & BROOKE, 1973). A aplicação desses métodos no estudo do tecido muscular esquelético possibilitou a evidenciação de dois ou mais tipos de fibras. Na prática, a análise da sua morfologia, tamanho, ocorrência e reatividade têm fornecido valiosa colaboração no diagnóstico de numerosas miopatias (DUBOWITZ, 1985).

As fibras musculares podem ser classificadas em tipo I, reação oxidativa forte, e tipo II, reação oxidativa fraca. O uso de método histoquímico de evidenciação da enzima NADH-TR possibilita a evidenciação das fibras musculares, onde as fibras do tipo I reagem fortemente e as fibras do tipo II reagem de forma fraca (DUBOWITZ, 1985).

O músculo frontal atua na mímica facial, formando, em conjunto com o músculo occipital, o músculo occipitofrontal, por meio da união através da gálea aponeurótica (FIGÚN, 1986; GARDNER et al., 1988; DI DIO, 1999).

A ausência de estudos histoquímicos sobre esse músculo na revista da literatura justificou a execução desse trabalho, que teve como objetivo quantificar, por meio de morfometria, os feixes musculares dos tipos I e II do músculo frontal de coelhos, com a finalidade de fornecer subsídios para a compreensão de processos patológicos que envolvam este músculo.

2. Revisão da Literatura

2.1 - Uso de Modelos Animais em Pesquisa

Modelo pode ser definido como aquilo que serve de objeto de imitação; algo, coisa ou pessoa que é parecida ou é a imagem de outra. Etimologicamente, a palavra animal deriva do latim *anima*, que significa sopro, espírito, princípio vital; derivando a palavra *animalis*, que significa ser vivente, animado (DICIONÁRIO LAROUSSE CULTURAL DA LÍNGUA PORTUGUESA, 1999). Conseqüentemente, combinando as duas definições, modelo animal pode ser definido como um objeto animado de imitação, uma “imagem do homem” (ou de outras espécies), usado para investigar uma circunstância fisiológica ou patológica em questão (SVENDSEN & HAU, 1994).

O histórico do desenvolvimento das ciências biomédicas aplicadas aos homens demonstra o uso de modelos animais na compreensão da fisiologia, da anatomia, do uso de terapias e de inúmeras patologias do ser humano (ROLLIN & KESEL, 1990).

A extrapolação dos resultados de experimentos em modelos de espécies não humana para o ser humano tem sido motivo de inúmeras controvérsias nas diferentes ciências biomédicas. Vários conceitos históricos colaboraram para o surgimento dessas controvérsias. Galen, um médico e filósofo grego que viveu no século II, foi um dos primeiros a estudar a fisiologia e anatomia experimental em animais, afirmando que as funções corpóreas desses eram iguais as dos homens. Esse fato colaborou com o

surgimento das proibições dogmáticas da Igreja Católica proibindo as dissecações de corpos humanos após a morte durante a Idade Média. O desenvolvimento de nossa cultura atual e da ciência como um todo possibilitou a eliminação dessas proibições. Entretanto, estudos como os de Claude Bernard, sobre a fisiologia das doenças, e os de Louis Pasteur e de Robert Koch, sobre o papel dos microorganismos nas doenças, ajudaram a popularizar o uso de modelos animais em experimentos de saúde (SVENDSEN & HAU, 1994).

Modelos animais podem esclarecer achados similares ou mesmo reproduzir ocorrências ou patologias que acometem os homens. Esses resultados, entretanto, podem ser aplicados aos homens quando utilizado modelo animal correto. Na área da Ciência da Anatomia, os modelos animais mais utilizados em experimentos são macacos, porcos, ovelhas e coelhos, que reproduzem modelos com fisiologia e anatomia semelhantes aos dos homens, apresentando alguns órgãos, tecidos, ossos e músculos com características similares (ROLLIN & KESEL, 1990).

O coelho é um modelo animal muito utilizado em pesquisas por ser um animal domesticado, dócil, de pequeno porte e de fácil reprodução (ROLLIN & KESEL, 1990; SVENDSEN & HAU, 1994). Além disso, o coelho apresenta hábitos sociais, convivendo em família e com outros de sua espécie. Pode assim, ser criado em gaiola, facilitando o seu manejo (ROLLIN & KESEL, 1990).

Em relação a sua anatomia muscular, o coelho apresenta a musculatura mímica da face similar a do homem, sobretudo a musculatura dos terços frontal e médio da face,

podendo ser utilizado como modelo animal no estudo de algumas patologias que envolvam ou ocorram nesses músculos (ROLLIN & KESEL, 1990).

O uso de modelo animal em pesquisa deve respeitar as determinações éticas estabelecidas internacionalmente (SVENDSEN & HAU, 1994). No Brasil, estes princípios éticos também são adotados, devendo ser respeitados em estudos experimentais de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

2.2 – Características Anatômicas do Músculo Frontal

O músculo frontal, na sua embriologia, deriva do mesênquima do segundo arco braquial, sendo suprido pelo VII par do nervo craniano (TEN CATE, 1985).

O músculo epicrânio ou occipitofrontal é uma vasta lâmina musculotendinosa que reveste o vértice e as faces laterais do crânio, desde o osso occipital até a sobrancelha. Consiste de delgados e amplos ventres musculares – dois ventres frontais e dois ventres occipitais - reunidos por uma extensa aponeurose intermediária, a gálea aponeurótica (GRAY, 1979; CASTRO, 1985; FIGÚN, 1986).

A gálea aponeurótica reveste a parte superior do crânio entre os ventres frontal e occipital do músculo occipitofrontal. Em adição a suas conexões com estes ventres musculares, esta está inserida atrás, entre os dois occipitais, na protuberância occipital externa e na linha nuchal supra do osso occipital. Na frente, forma um prolongamento estreito e curto entre os dois frontais. De cada lado recebe a inserção do temporoparietal;

neste ponto perde seu caráter aponeurótico e se continua com a fáscia temporal por meio de um estrato de tecido areolar laminado (FIGÚN, 1986; GARDNER et al., 1988; DI DIO, 1999).

O ventre frontal do músculo occipitofrontal, de forma quadrilátera, é mais amplo que o ventre occipital e seus fascículos são mais longos, mais finos e de cor mais pálida, não possuindo inserções ósseas (TESTUT & LATARJET, 1975; GRAY, 1995). Suas fibras médias são contínuas com as do músculo prócero; as fibras intermediárias se fundem com as do músculo corrugador e do músculo orbicular do olho; suas fibras laterais também se fundem com este último músculo, sobre o processo zigomático do osso frontal. As fibras musculares se dirigem para cima e atingem a gálea aponeurótica abaixo da sutura coronal. As margens médias dos músculos dos dois lados se reúnem por certa distância acima da raiz do nariz (TESTUT & LATARJET, 1975; GARDNER et al., 1988; SNELL, 1995).

O ventre occipital, também de forma quadrilátera, se origina por curtas fibras tendinosas dos dois terços laterais da linha nuchal superior do osso occipital e da parte mastoídea do osso temporal. Os fascículos musculares tomam um trajeto paralelo e ascendente na direção do vértice, terminando na gálea aponeurótica. Entre os músculos dos dois lados, há um considerável intervalo, embora variável, ocupado pelo prolongamento da gálea (GRAY, 1979; GARDNER et al., 1988; SPENCE, 1991).

Segundo BÉRZIN (1974), os ventres occipital e frontal do músculo occipitofrontal tem ação independente um do outro, a despeito da gálea aponeurótica. O ventre frontal, além de elevar o supercílio homolateral, traciona concomitantemente a gálea aponeurótica

para frente e, conseqüentemente, é o responsável pela formação de rugas transversais na região frontal. O ventre occipital é o responsável pela tração da gálea aponeurótica para trás, além de ser ativo no sorriso, podendo ou não participar em movimentos do pavilhão da orelha. Segundo o autor, eventualmente, o ventre occipital pode agir durante a elevação do supercílio homolateral, mas essa sua função não é fornecer, ponto fixo ao ventre frontal, através da gálea aponeurótica. Essa constatação está em oposição ao trabalho de LANG & RICKER (1970), segundo citações de BÉRZIN (1970), que relatam que a gálea aponeurótica, que serve de tendão intermediário aos dois ventres do músculo occipitofrontal, não é rígida e sim passível de extensão, porque apresenta em suas estruturas fibras elásticas paralelas a fibras colágenas.

O suprimento sangüíneo dos ventres frontais e dos ventres occipitais são dados por veias e artérias superficiais ramos da veia facial e da artéria carótida externa, respectivamente. Quanto à inervação, esta é realizada pelos ramos do nervo facial: o ramo auricular posterior supre o ventre occipital; e o ramo frontal supre o ventre frontal desse músculo (SICHER, 1975; FIGÚN, 1986).

2.3 – Estudos da Histoquímica dos Músculos

A histoquímica ou histoenzimologia é um ramo da ciência cujos métodos possibilitam o estudo da identificação, localização e a concentração (maior/menor atividade) de determinada enzima presente nos tecidos, células e organelas. Os diferentes

métodos histoquímicos baseiam-se na identificação visual de produtos finais de reação, gerados a partir dos substratos, mediante a ação catalítica do tipo de enzima presente. Algumas enzimas são extremamente lábeis, exigindo cuidados especiais quanto aos fatores temperatura, pH, concentração dos substratos, dos sistemas tampões e fixação. (DUBOWITZ, 1985).

Embora os cortes de tecidos animais e vegetais obtidos em inclusão em parafina sejam úteis e muito utilizados na rotina histológica, estes são de pouco valor para a Histoenzimologia, uma vez que as enzimas, na sua maioria, são desnaturadas durante o processamento. Por este motivo, a maior parte das reações enzimáticas são realizadas a partir de cortes obtidos após congelamento. A obtenção de cortes excelentes por meio de micrótomos criostatos é fundamental para o sucesso do uso dessa técnica (DUBOWITZ, 1985).

Durante o processo de congelamento, o conteúdo de água no tecido é solidificado, tornando o tecido rígido em grau suficiente para servir de suporte para o tecido, permitindo assim, a obtenção de cortes histológicos. No entanto, a formação de cristais de gelo no interior dos tecidos e sua subsequente sublimação (dissolução) no processo de microtomia e descongelamento proporcionam lesões morfológicas, químicas e de difusão. Apesar disso, muitas enzimas de interesse são conservadas e podem ser demonstradas pelos métodos histoenzimológicos existentes. Quanto mais rápida for a velocidade de congelamento, menores serão as dimensões dos cristais de gelo. Tecidos recém colhidos e destinados à demonstração da atividade oxidativa devem ser congelados imediatamente, evitando a

formação de cristais de gelo. O congelamento dos tecidos a baixas temperaturas pode ser realizado por agentes congelantes como o isopentano resfriado a -150°C com nitrogênio, gelo seco (-60° a -70°C), N-Hexana resfriada a -70°C em nitrogênio, aerossóis e sprays (-50°C), entre outros (DUBOWITZ, 1985).

O uso de nitrogênio (N_2) permite um rápido congelamento, com baixa condutividade térmica. Durante a imersão do bloco no N_2 , forma-se uma camada de vapores de N_2 ao redor da peça, reduzindo a transferência de calor do bloco para o N_2 líquido e permitindo transferências térmicas. Por esse motivo, outros líquidos congelantes como o isopentano e a N-Hexana são mais eficientes e, portanto, mais recomendados (DUBOWITZ, 1985).

As enzimas podem ser encontradas nas organelas intracelulares (Complexo de Golgi, lisossomos e mitocôndrias), no citosol, ao longo das fibras nervosas, entre outras estruturas. A localização e demonstração dessas enzimas são úteis como marcadores morfológicos e como reveladores da função da célula ou tecido, possibilitando assim o diagnóstico histopatológico de muitas alterações ou doenças (DUBOWITZ, 1985).

As enzimas podem ser classificadas em oxidoreductases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (DUBOWITZ, 1985).

As enzimas oxidoreductases constituem grande e importante grupo de enzimas. Originalmente, eram classificadas como oxidases e desidrogenases, sendo freqüentemente referidas como enzimas oxidativas. Na classe das oxidoreductases estão incluídas: 1) Oxidases: que catalisam a oxidação de um substrato na presença de oxigênio; 2)

Peroxidasas: que catalisam a oxidação de um substrato removendo hidrogênios, os quais se combinam com a água; 3) Desidrogenases: que catalisam a oxidação de um substrato removendo hidrogênios, cujos elétrons são captados por um aceptor; e 4) Diaforases: que catalisam a oxidação da Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) e da Nicotinamide Adenine Dinucleotide Fosforase (NADPH), removendo hidrogênios cujos elétrons são captados por um aceptor (DUBOWITZ, 1985).

A presença de enzimas oxidoreductases é marcante nos tecidos musculares, sobretudo as do tipo diaforase, como as Nicotinamide Adenine Dinucleotide Tetra-zolium Redutase (NADH-TR) (DUBOWITZ & BROOKE, 1973).

Na demonstração de grande número de enzimas oxidativas são utilizados sais de tetrazólios. Estes sais são compostos incolores e, quando solúveis em água, captam hidrogênios resultantes do substrato, sofrendo redução e formando microcristais de formazana. Estes permitem a coloração da enzima e são insolúveis em água. Os sais de tetrazólio formam combinações reversíveis permitindo o transporte de elétrons, produzindo depósitos de formazana nos sítios de atividade enzimática (PEARSE, 1972).

A aplicação de métodos histoenzimológicos no estudo do tecido muscular esquelético possibilitou a evidenciação de dois ou mais tipos de fibras. Na prática, a análise da sua morfologia, tamanho, ocorrência e reatividade têm fornecido valiosa colaboração no diagnóstico de numerosas miopatias (DUBOWITZ, 1985).

Embora o assunto seja complexo, as fibras musculares são classificadas em tipo I e tipo II, dependendo da intensidade da reação ATPase miofibrilar. A incubação de cortes

obtidos em criostato, em meio de incubação pH 9,4, revela reação de fraca a negativa nas fibras tipo I e forte nas do tipo II. A demonstração de uma ou mais enzimas mitocondriais, como a NADH-TR, revela padrão de reação oposta, isto é, as fibras tipo I reagem fortemente, porém nas do tipo II, a reação é fraca (DUBOWITZ, 1985).

Se a reação ATPase miofibrilar (m-ATPase) é realizada após a pré-incubação dos cortes em pH 4,2 ou 4,6 (em tampão), as fibras tipo II podem ser subdivididas em tipo IIA, IIB e IIC. Desta feita, para uma adequada visualização das fibras são colocadas três séries de cortes histológicos, os quais após pré-incubação nos meios a pH 4,2, 4,6 e 9,4, são submetidos simultaneamente ao mesmo meio de incubação para mATPase, pH 9,4. Além disso, cortes subseqüentes são submetidos à reação para fosforilase. As fibras tipo I reagem fracamente, enquanto que a reação será intensa nas do tipo II. Nesta seqüência poderão ser efetuadas várias reações com a vantagem de avaliar o comportamento morfológico e enzimológico dos tipos de fibras em sucessivos cortes histológicos. Ex: a atividade da fosforilase no músculo esquelético é deficiente na doença de McArdle, sendo, contudo, normal no músculo liso dos vasos sanguíneos (DUBOWITZ, 1985).

Historicamente, DUBOWITZ & BROOKE (1973) comentam que LORENZINI, em 1678, havia diferenciado cores nos músculos, referindo-os como vermelhos e brancos. RANVIER (1874), por meio de estudo em coelhos, estabeleceu um tipo de fibra através da coloração do músculo em relação à velocidade de contração do mesmo; sendo de cor vermelha a de contração lenta e de cor branca a de contração rápida.

Após o advento da histoquímica, no final do século XIX, surgiram as correlações morfo-funcionais, ou seja, a relação entre a morfologia tecidual e sua função. Com o advento da citoquímica e histoquímica, foi possível confirmar o empirismo e as observações relatadas anteriormente. Com a determinação de sistemas enzimáticos, além da identificação dos constituintes químicos, foi possível correlacionar a atividade funcional de fibras individuais com a sua morfologia (DUBOWITZ, 1985).

O princípio da citoquímica e histoquímica é baseado em um processo derivado de reações bem estabelecidas em química orgânica ou inorgânica, que é usado para fornecer um produto de reação visível ao microscópio óptico (DUBOWITZ & BROOKE, 1973; PEARSE, 1980; WERNECK, 1981; DUBOWITZ et al., 1985).

Dentre as enzimas de particular interesse no estudo do músculo, tem-se aquelas relacionadas com a síntese e degradação do glicogênio (fosforilases), aquelas relacionadas à produção de energia (oxirredutases ou desidrogenases ligadas ao ciclo do ácido cítrico), as hidrolases (ATPases), além das enzimas que oxidam as coenzimas reduzidas (tetrazol redutases) (DUBOWITZ & BROOKE, 1973; PEARSE, 1980; DUBOWITZ et al., 1985).

As fibras musculares foram diferenciadas pela histoquímica por NACHMIAS & PADYKULA (1958), através da atividade da desidrogenase succínica, em ratos.

Os trabalhos pioneiros na classificação das fibras musculares basearam-se na utilização de diferentes reações oxidativas, como desidrogenase succínica, citocromo C oxidase e DPNH-diaforase (OGATA, 1958 a,b,c), que indicaram a existência de 3 tipos de fibras musculares, as de contração lenta, ou vermelhas, as de contração rápida, ou brancas,

e as intermediárias. STEIN & PADYKULA (1962), reconheceram três tipos de fibras (A, B, C), baseados na distribuição e tamanho das mitocôndrias, através da reação da desidrogenase succínica.

DUBOWITZ & BROOKE (1973), e PEARSE (1980), estudaram as reações da miofosforilase e das enzimas oxidativas, também estabelecendo os três tipos fibras.

GUTH & SAMAHA (1969), pesquisando comportamento das fibras musculares em pH ácido e básico, na reação da miosina ATPase, conseguiram identificar fibras de contração rápida e lenta, através da labilidade ou estabilidade aos meios ácido e básico, além da relação da inervação com o tipo de fibra muscular. Segundo estes autores, as propriedades fisiológicas e bioquímicas das fibras musculares seriam reguladas pela inervação.

BROOKE & KAISER (1971), aumentando o tempo e valores de pH para a reação da ATPase miofibrilar, obtiveram uma subdivisão das fibras já classificadas anteriormente, em fibras do tipo I, IIA, IIB e IIC, esta última definida no pH mais ácido (4.3).

PETER et al. (1972 a e b), propuseram associação de informações bioquímicas, histoquímicas e fisiológicas, que em conjunto, caracterizam os três tipos de fibras musculares. A nomenclatura utilizada por estes autores associa “slow oxidative”, para fibras do tipo I, “fast oxidative glycolitic”, para fibras do tipo IIA, e “fast glycolitic” para fibras do tipo IIB.

DAVIES & GUNN (1972), encontram forte atividade de desidrogenase succínica em aproximadamente 60% das fibras, dentre 1605 fibras estudadas, de três coelhos.

BURKE et al. (1973), estudaram a relação da inervação motora com o padrão da histoquímica muscular. Conceituaram que todas as fibras musculares de uma mesma unidade motora, dependente de um único axônio, seriam histoquimicamente idênticas.

A diferenciação dos três tipos de fibras musculares, pela reação oxidativa do NADH-TR, é a mais comumente utilizada (DUBOWITZ & BROOKE, 1973). Porém não há só uma reação que determine todas as características bioquímicas, fisiológicas e histoquímicas do músculo, havendo grande variabilidade entre músculos de um mesmo animal e entre diferentes animais (OGATA, 1958 a, b e c; NISHIAMA, 1966; YELLIN & GUTH, 1970; BARNARD et al., 1971; DAVIES & GUNN, 1972; YELLIN, 1972; PETER et al., 1972; ARIANO, 1973; ENGEL, 1974).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi quantificar morfometricamente os feixes musculares dos tipos I, IIA e IIB do músculo frontal de coelhos com a finalidade de fornecer subsídios para a compreensão de processos patológicos neste músculo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Seleção da Amostra

Foram estudados 10 (dez) coelhos fêmeas adultos da raça Norfolk inglesa, de 6 a 8 meses de idade, com pesos variando de 2,8 a 3,1 Kg, mantidos em cativeiro, alimentados com ração apropriada e água *ad libitum*.

4.2 - Delineamento do Estudo

As dissecações, biópsias e histoquímica dos músculos frontais dos animais selecionados foram realizadas no Laboratório Experimental do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual de São Paulo - UNESP. A contagem morfométrica das fibras musculares foi realizada no Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, por três pessoas distintas.

A coleta do material foi realizada no ventre esquerdo do ramo frontal por meio das seguintes etapas: anestesia, sacrifício, dissecação e remoção das amostras.

O manejo dos animais foi realizado segundo princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (ANEXO 1).

4.3- Obtenção das Amostras

Para o procedimento anestésico, o animal foi colocado no interior de uma caixa de madeira apropriada, contendo uma passagem circular, para injeção endovenosa de drogas na veia superficial da orelha. A caixa contendo o animal foi pesada, apresentando 1,93 Kg. Após a subtração do peso da caixa, o peso do animal foi determinado, para permitir o cálculo da dose de anestésico a ser ministrada. O conjunto de seringa (10 ml) e agulha (20X4) descartáveis foi montado para a aplicação da solução anestésica de Hypnol a 3%, na posologia de 30 mg/Kg de peso. Após alguns minutos, o animal encontrava-se totalmente anestesiado, sendo removido da caixa e sacrificado.

O sacrifício do animal foi realizado por secção de vasos sangüíneos arteriais e venosos da região inguinal, para choque hipovolêmico e morte, após injeção endovenosa de 3.000 UI de heparina. O uso de heparina teve por objetivo a incoagulabilidade do sangue, para saída de praticamente todo o sangue do animal pelos cortes, facilitando a visualização das estruturas anatômicas nos procedimentos de dissecação.

Em cada animal, foi realizada dissecação, arrebatando as cârnadas de pele e anexos, evidenciando a musculatura frontal.

O próximo passo foi a biópsia de um fragmento do músculo frontal, padronizando esta retirada do ventre esquerdo do mesmo. A amostra do músculo removida, medindo aproximadamente 3X5 mm, foi disposta em uma placa de Petri, identificada e enviada imediatamente para o laboratório de histoquímica.

4.4 – Preparo das Amostras

As amostras de músculo foram manipuladas com cuidado para se evitar artefatos de técnica. Foram congeladas em n-hexana, resfriada a -70°C , com auxílio de nitrogênio líquido. A seguir, foram transferidas para câmara de criostato Leica modelo CM 1800, a -20°C , onde permaneceram por 40 minutos para equilíbrio térmico. Após isto, foram fixadas em suporte metálico com adesivo (Tissue-Tek-OCT), para obtenção de várias lâminas, contendo cortes histológicos de 8 a 10 micras de espessura, com uso de micrótomo. Os cortes foram conduzidos à estufa a 37°C , onde permaneceram por mais 10 minutos. A seguir, foram submetidos a reação histoquímica para identificação da enzima nicotinamida-dinucleotídeo tetrazolium redutase (NADH-TR), de acordo com os métodos descritos por DUBOWITZ et al (1985).

4.5 - Morfometria

Após a obtenção das lâminas, estas foram fotografadas em filme colorido com uso de um fotomicroscópio marca Zeiss, modelo Mc 80 DX, com aumento ótico de 10X. A fotografia da reação do NADH-TR, de cada um dos 10 animais selecionados, foi ampliada em cento e oitenta vezes e dividida em 4 quadrantes iguais, para facilitar a contagem e

identificação das fibras. O total de fibras tipo I, IIA e IIB, de cada quadrante, foi determinado. A soma dos totais de tipos fibrilares de cada quadrante determinou o número total de fibras da amostra.

4.6 – Análise Estatística

O número e o percentual de fibras do tipo I, IIA e IIB de cada animal foi somado e analisado por meio de estatística descritiva.

5. Resultados

Os resultados deste estudo, obtidos com o método morfométrico, estão apresentados na Tabela 1. Do total de 1010 fibras musculares encontradas, 33,8 % (n = 341) eram do tipo I e 66,20% (n = 669) eram do tipo II, sendo que 17,4% (n = 176) destas eram do tipo II A e 48,8 % (n = 493) eram do tipo II B (Tabela 1, Apêndice 1).

Tabela 1: Distribuição numérica e percentual dos tipos de fibras musculares encontrados.

Tipos de Fibras	Número	Percentual
I	341	33,8
II A	176	17,4
II B	493	48,8
TOTAL	1010	100,0

As Figuras 1 a 10 apresentam as microfotografias das lâminas das amostras estudadas (NADH-TR, A.O. = 180 X), demonstrando a distribuição dos diferentes tipos de fibras musculares. Podemos notar, em todas as figuras, uma discreta variação no diâmetro dos diferentes tipos de fibras (Figura 1 a 10).

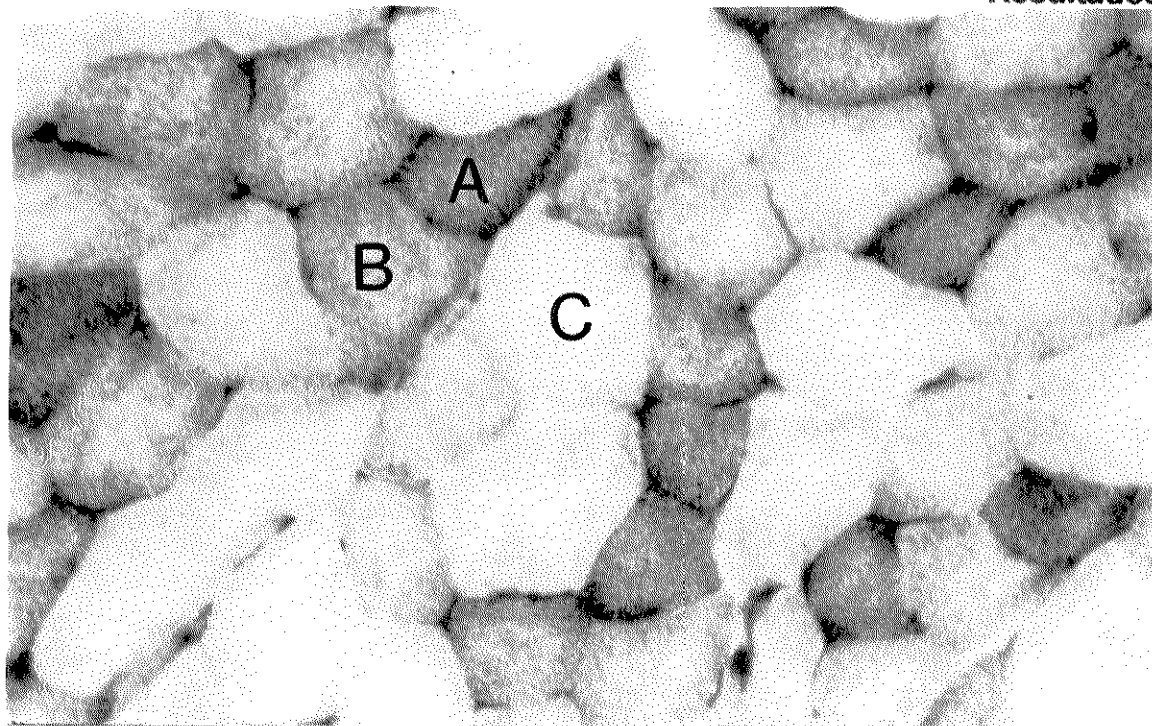


Figura 1: Microfotografia da amostra 1 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

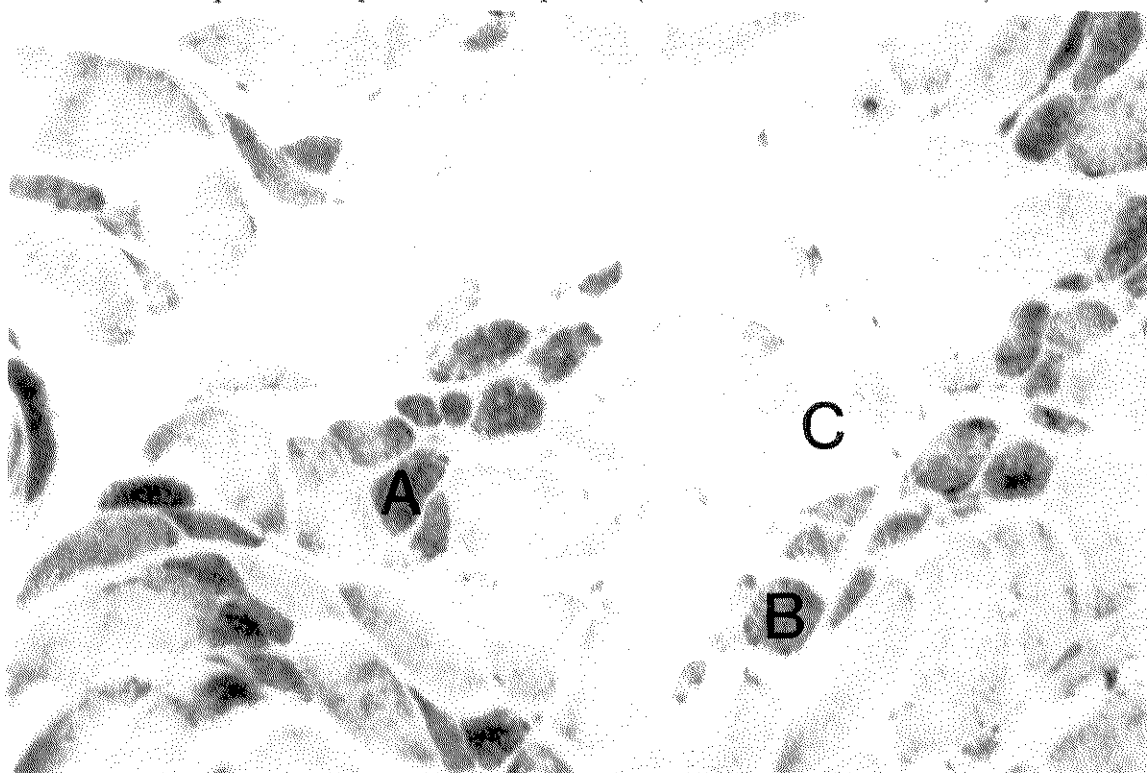


Figura 2: Microfotografia da amostra 2 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

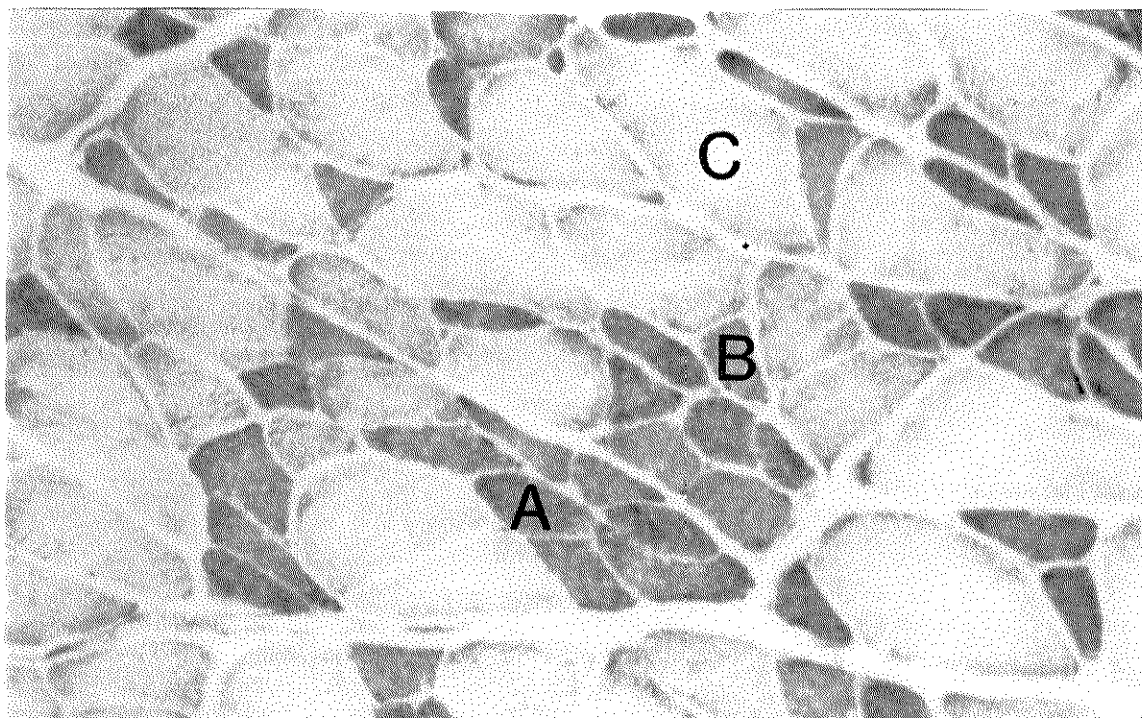


Figura 3: Microfotografia da amostra 3 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

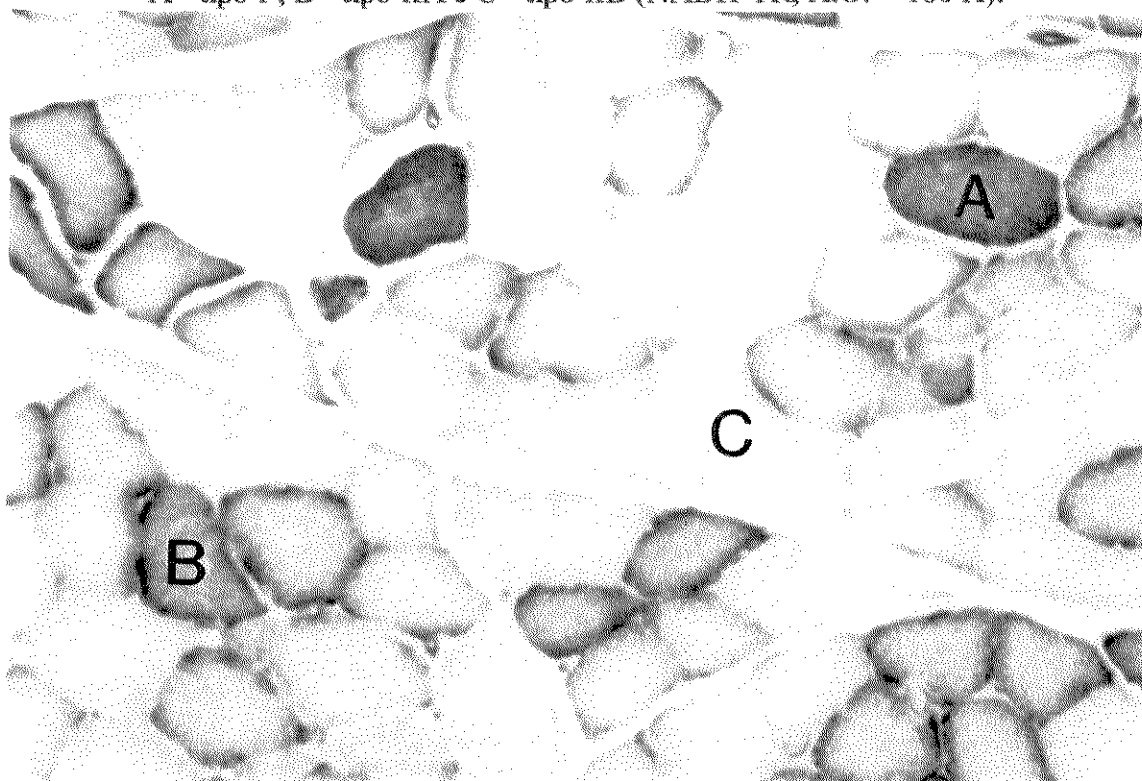


Figura 4: Microfotografia da amostra 4 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

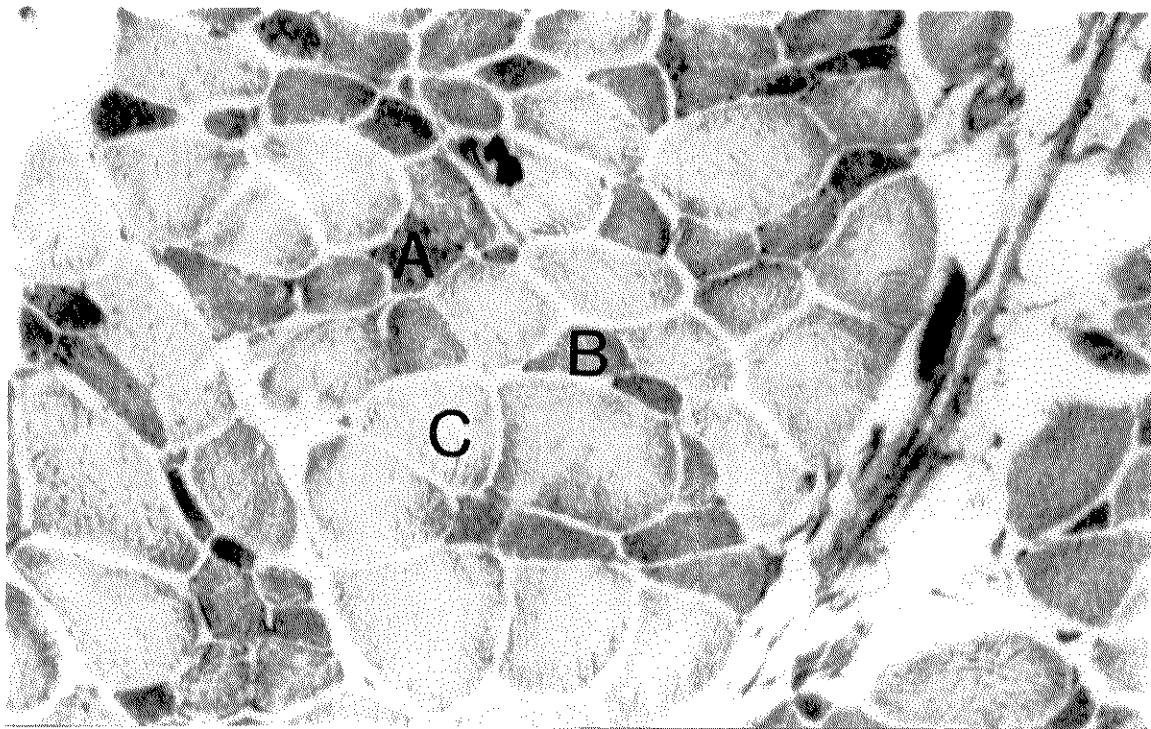


Figura 5: Microfotografia da amostra 5 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

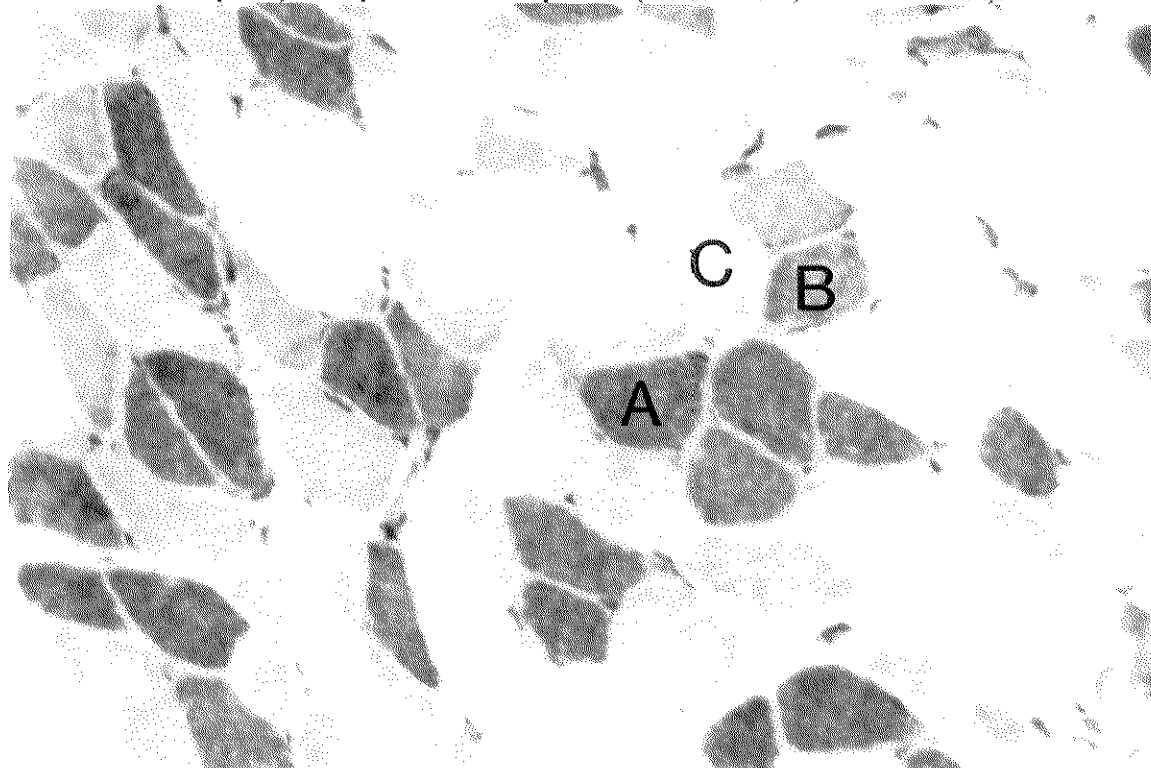


Figura 6: Microfotografia da amostra 6 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

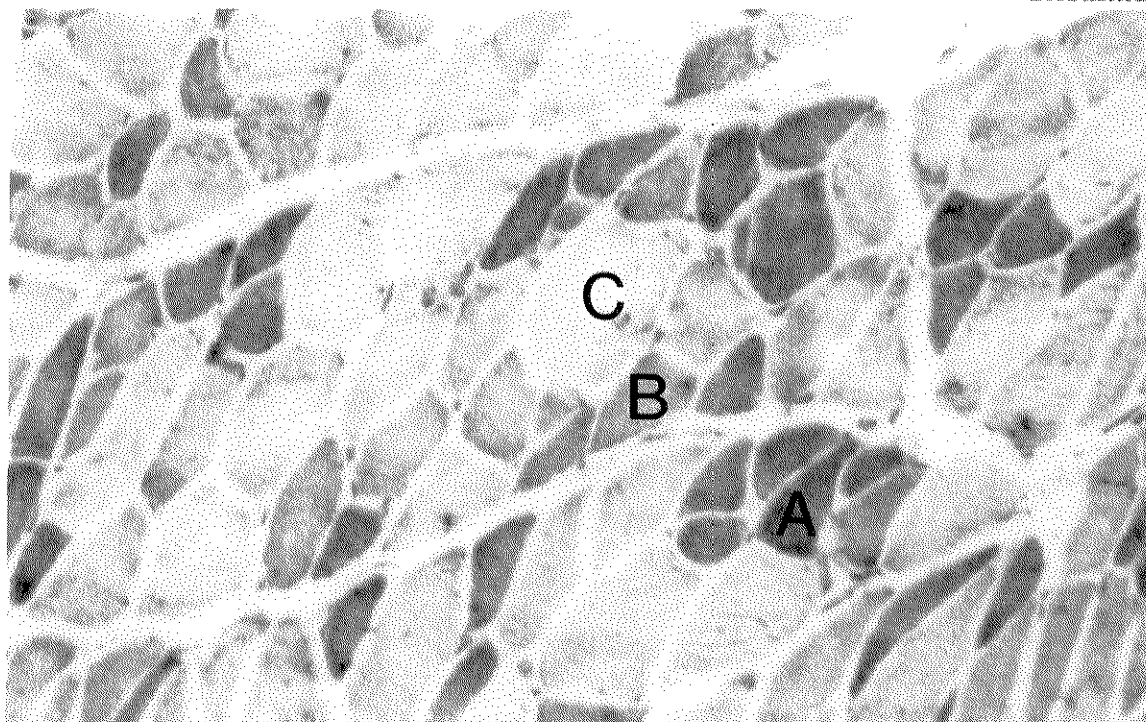


Figura 7: Microfotografia da amostra 7 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

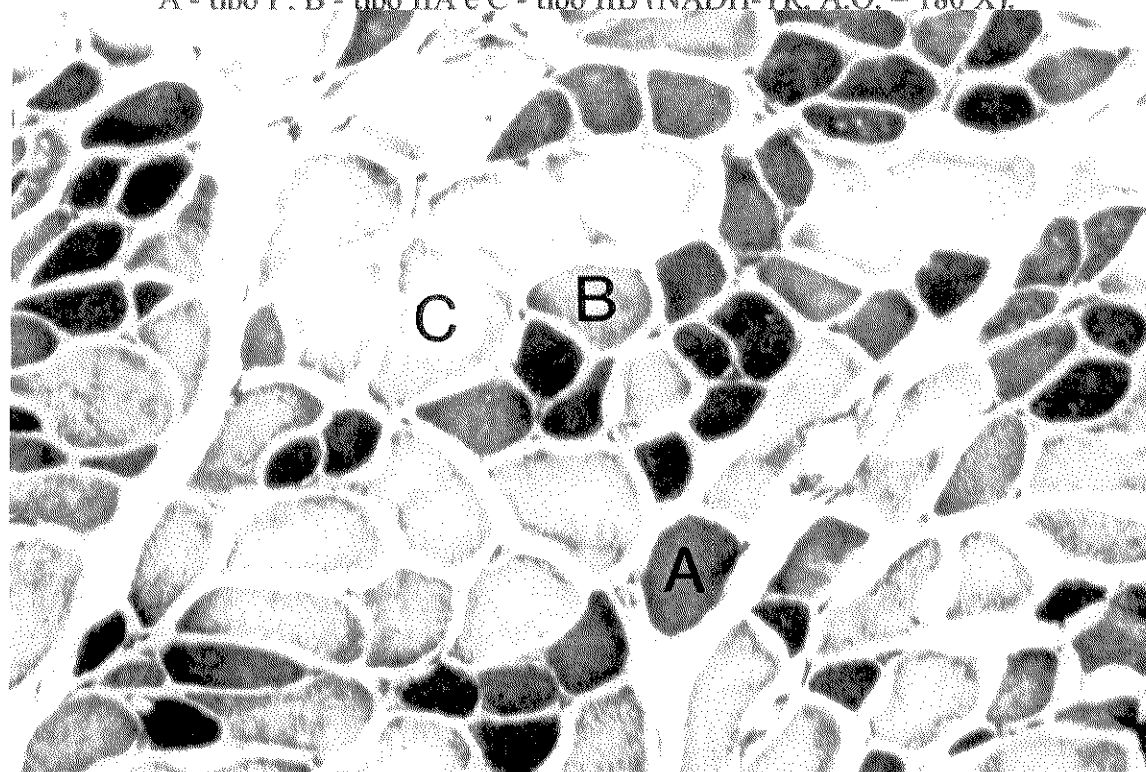


Figura 8: Microfotografia da amostra 8 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

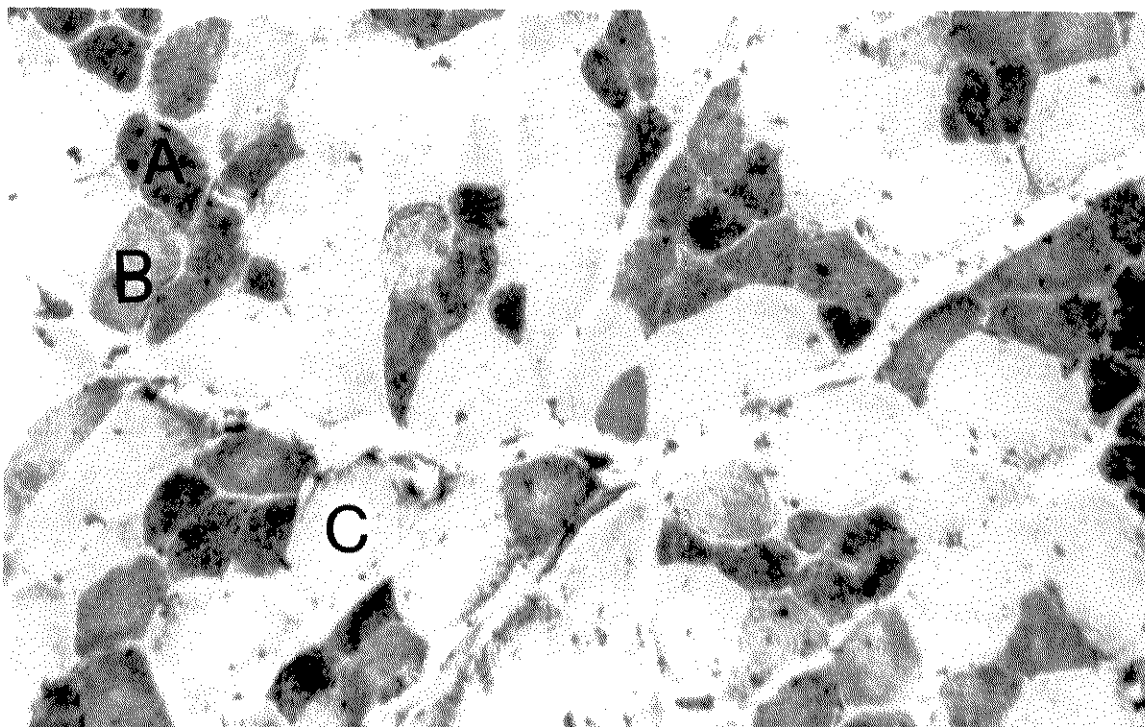


Figura 9: Microfotografia da amostra 9 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

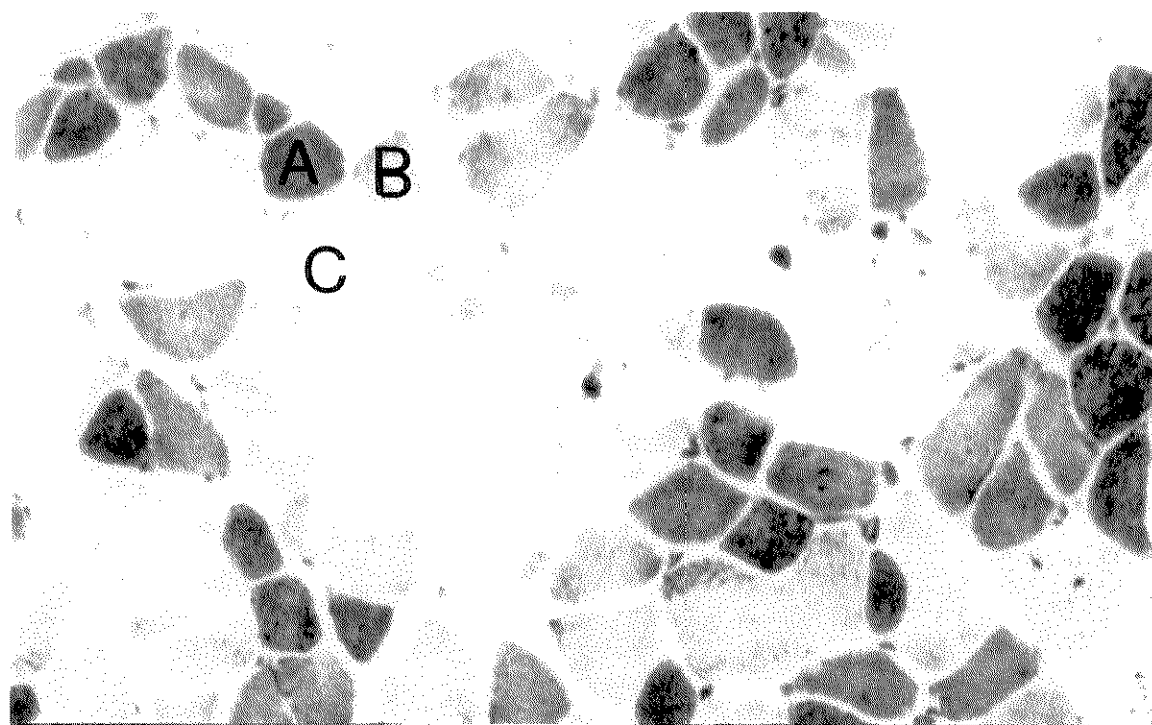


Figura 10: Microfotografia da amostra 10 mostrando a diferenciação entre as fibras:
A - tipo I ; B - tipo IIA e C - tipo IIB (NADH-TR, A.O. = 180 X).

6. DISCUSSÃO

Para que este estudo histoquímico do músculo frontal fosse realizado, foi selecionado um modelo animal experimental de fácil manuseio e que apresentasse características anatômicas e funcionais semelhantes às dos seres humanos. A escolha de coelhos adultos, com idade e pesos similares, favoreceu o processo de dissecação do músculo. O uso de coelhos da raça Norfolk inglesa, domesticados e habituados ao convívio em gaiolas, bem como a escolha de animais do sexo feminino, possibilitando manter mais de um animal em uma mesma gaiola, facilitou o manejo dos animais.

Como o músculo frontal faz parte dos músculos da mímica e possui uma atividade constante, a hipótese foi quantificar e classificar as fibras musculares existentes em seu ventre. A obtenção da amostra foi padronizada com remoção do ventre esquerdo do músculo frontal. Ambos os ventres desse músculo - o esquerdo e o direito - estão correlacionados com os ventres occipitais através da gálea aponeurótica, formando um músculo denominado de occipitofrontal ou epicrânio.

O estudo histoquímico do músculo frontal, assunto desta pesquisa, encontra-se em uma situação com poucas referências bibliográficas. A revista da literatura não permitiu encontrar nenhum trabalho quantificando as fibras desse músculo, por meio de processo histoquímico. Os únicos trabalhos que referem sobre os dois ventres desse músculo são

estudos eletromiográficos (LANG & RICKER, 1970; BÉRZIN, 1974). Com esta escassa literatura não foi possível o confronto de nossos resultados.

Do total de 1010 fibras musculares encontradas, 33,8 % (n = 341) eram do tipo I e 66,20% (n = 669) eram do tipo II, sendo que 17,4% (n = 176) destas eram do tipo II A e 48,8 % (n = 493) eram do tipo II B (Tabela 1, Apêndice 1). Podemos notar que a maioria das fibras encontradas era do tipo II. Esse achado era esperado, visto que esse músculo possui intensa atividade na mímica facial. As fibras do tipo II apresentam baixa intensidade oxidativa, sendo assim, passíveis de sofrerem fadiga muscular. Esse resultado pode auxiliar nos estudos de miopatias que possam ocorrer nesse músculo.

A diferenciação dos três tipos de fibras musculares, pela reação oxidativa do NADH-TR, é a mais comumente utilizada (DUBOWITZ & BROOKE, 1973; DUBOWITZ et al., 1985). Porém não há só uma reação que determine todas as características bioquímicas, fisiológicas e histoquímicas do músculo, havendo grande variabilidade entre músculos de um mesmo animal e entre diferentes animais. Há a necessidade de se associar reações histoquímicas, para boa diferenciação entre os tipos de fibras (OGATA, 1958 a, b e c; NISHIAMA, 1966; YELLIN & GUTH, 1970; BARNARD et al., 1971; DAVIES & GUNN, 1972; YELLIN, 1972; PETER et al., 1972; ARIANO, 1973; ENGEL, 1974). Sendo assim, outros estudos serão necessários para a quantificação dos tipos de fibras do músculo frontal envolvendo mais de um método histoquímico.

7. CONCLUSÃO

- 1- A proporção de fibras do tipo I do ventre frontal do músculo occipitofrontal de coelhas da raça Norfolk inglesa é de 33,8%;
- 2- A proporção de fibras do tipo IIA, e IIB é, respectivamente, 17,4% e 48,8%;
- 3- A proporção obtida de 48,8% de fibras do tipo IIB no ventre frontal é esperada, mas não está descrita na bibliografia consultada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. BÉRZIN, F. M. occipitofrontalis. Análise eletromiográfica e seu significado funcional. Piracicaba, 1973. 77p. Tese (Doutorado em Anatomia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
2. BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Muscle fiber types: how many and what kind? Arch Neurol, Chicago, v.23, n.4, p.369-379, Oct. 1970.
3. BURKE, R.E. *et al.* Physiological types of histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. J Physiol, Cambridge, v.234, n.3, p.723-748, Nov. 1973.
4. CASTRO, S.V. Anatomia fundamental. 3.ed. São Paulo : McGraw-Hill, 1985. p.115-116.
5. CUNNINGHAM, D. Manual de anatomia prática. 13.ed. São Paulo : Atheneu, 1976. v.3, p.8-9.
6. DI DIO, L.J.A. Tratado de anatomia aplicada. São Paulo : Póluss, 1999. v.1, p.201-202.
7. DICIONÁRIO LAROUSSE CULTURAL DA LÍNGUA PORTUGUESA. São Paulo : Nova Cultural, 1999. p.629.
8. DUBOWITZ, V.; BROOKE, M.H. Muscle biopsy: a modern approach. London : W.B. Saunders, 1973.

* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

9. DUBOWITZ, V.; SEWRY, C.A.; FITZSIMONS, R.B. Muscle biopsy: a practical approach. 2nd ed. London : Baillière Tindall, 1985. p.41-81.
10. ERHART, E.A. Elementos de anatomia humana. 5.ed. São Paulo : Atheneu, 1976. p.86-87.
11. FIGÚN, M.E. Anatomia bucal. 3.ed. São Paulo : Médica Panamericana, 1986. p.61-62.
12. GARDNER, E.; GRAY, D.J.; RAHILLY, R.O. Anatomia. 4.ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1988. p.623.
13. GRAY, H. Anatomia. 35.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1973. v.1, p.473-474.
14. GUTH, L.; SAMAHA, F.J. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. Ex Neurol, Orlando, v.25, p.138-152, 1969.
15. LANG, J.; RICKER, K. Bau und function des subgaleotischen verschiebewebes. [s.l. : s.n.], 1970. *Apud* BÉZIN, F. *Op. cit.* Ref. 1.
16. MADEIRA, M.C. Anatomia da face. 2.ed. São Paulo : Sarvier, 1997. p.62.
17. NACHMIAS, V.T.; PADYKULA, H.A. A histochemical study of normal and denervated red and white muscles of the rat. J Biophys Biochem Cytol, New York, v.4, p.47-54, 1958.
18. NISHIYAMA, A. Histochemical studies on the red and white and intermediate muscle fibers of some skeletal muscles. III - Histochemical demonstration of oxidate enzymes, phosphorylase and glycogen in respiratory muscle fibers. Acta Med Okayama, Okayama, v.20, n.3, p.137-146, June 1966.

19. OGATA, T. A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part I: Activity of the succinoxidase system in muscle fibers. Acta Med Okayama, Okayama, v.12, p.216-227, 1958a.
20. OGATA, T. A histochemical study of red and white muscle fibers. Part II: Activity of the cytochrome oxidase in muscle fibers. Acta Med Okayama, Okayama, v.12, p.228-232, 1958b.
21. OGATA, T. A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part III: Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibers. Acta Med Okayama, Okayama, v.12, p.233-240, 1958c.
22. PEARSE, A.G.E. Histochemistry: theoretical and applied. 14th ed. London : Churchill-Livingstone, 1980.
23. PETER, J.B. *et al.* Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochemistry, Washington, v.11, p.2627-2633, 1972.
24. RANVIER, J. 1874. *Apud* DUBOWITZ, V.; BROOKE, M.H. *Op. cit.* Ref. 8.
25. ROLLIN, B.E.; KESEL, M.L. The experimental animal in biomedical research: a survey of scientific and ethical issues for investigators. Boca Raton: CRC Press, 1990. v.1, p.4-5.
26. SICHER, H. Anatomia bucal. 6.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1975. p.87.
27. SNELL, R.S. Anatomia clínica. 5.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1995. p.631-632.
28. SPENCE, A.P. Anatomia humana básica. 2.ed. São Paulo : Manoele, 1991. p.204-205.

29. STEIN, J.M.; PADYKULA, H. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. Am J Anat, New York, v.110, p.103-124, 1962.
30. SVENDSEN, P.; HAU, J. Handbook of laboratory animal science: animal models. Boca Raton : CRC Press, 1994. v.2, p.2-3.
31. TEN CATE, T.A. Histologia bucal : desenvolvimento, estrutura e função. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1985. p.13-15.
32. TESTUT, L.; LATARJET, A. Tratado de anatomia humana. Barcelona : Salvat, 1975. v.1, p.785-788.
33. WERNECK, L.C. O valor da biópsia muscular em neurologia: análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica. Rev Bras Clin Ter, São Paulo, v.10, p.2-24, 1981. Edição especial.

APÊNDICE

Tabela 2: Distribuição numérica e percentual dos tipos de fibras musculares encontradas nos animais da amostra.

Tipos de Fibras	Animais										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
I	11 (17,0%)	36 (37,5%)	59 (50,0%)	3 (3,0%)	26 (27,3%)	31 (31,3%)	52 (44,0%)	24 (27,5%)	58 (50,8%)	41 (34,2%)	341 (33,8%)
II A	20 (30,7%)	14 (14,5%)	13 (11,0%)	32 (32,7%)	23 (24,2%)	8 (8,1%)	14 (12,0%)	17 (19,5%)	14 (12,2%)	21 (17,5%)	176 (17,4 %)
II B	34 (52,3%)	46 (48,0%)	46 (39%)	63 (64,3%)	46 (48,5%)	60 (60,6%)	52 (44,0%)	46 (53,0%)	42 (37,0%)	58 (48,3%)	493 (48,8 %)
TOTAL	65 (100%)	96 (100%)	118 (100%)	98 (100%)	95 (100%)	99 (100%)	118 (100%)	87 (100%)	114 (100%)	120 (100%)	1010 (100%)

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP****ANEXO****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 266 - 1, sobre "Estudo histo-
químico do músculo frontal do coelho

sob a responsabilidade de Profa. Dra. Heloisa A. de
Lima Castro está

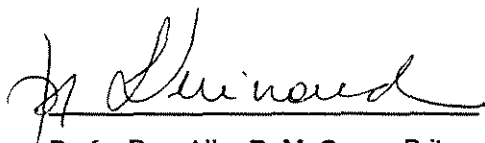
de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo
Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela
Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de
05, 07, 2001. Este certificado expira em 05, 07, 2002

CERTIFICATE

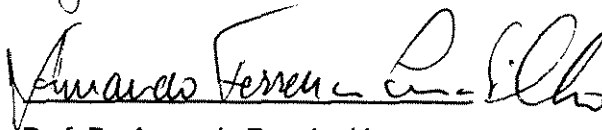
We certify that the protocol nº, entitled "

is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the
Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by
the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of
Campinas - UNICAMP) on 05, 07, 01. This certificate expires on 05, 07, 2002
(d) (m) (y)

Campinas, 05 de julho de 2001



Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP



Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP