

MÁRCIO ESPÍNDOLA PATRIANOVA

**ESTUDO HISTOQUÍMICO DO MÚSCULO
DIAFRAGMA DO COELHO**

FOP – UNICAMP

1999

MÁRCIO ESPÍNDOLA PATRIANOVA

ESTUDO HISTOQUÍMICO DO MÚSCULO DIAFRAGMA DO COELHO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da UNICAMP,
para obtenção do grau de Mestre em Ciências.
Área : Biologia e Patologia Buco-Dental.

Orientador:

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

Prof. Dr. Luiz Antonio de Lima Resende

CPG 08/11/1999

Assinatura do Orientador

FOP – UNICAMP

1999



20001836

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex
TOMBO BC/	40193
PROG.	278/20
O	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/04/00
N.º CPU	

CM-00135995-7

Ficha Catalográfica

P274e Patrianova, Márcio Espíndola.
 Estudo histoquímico do músculo diafragma do coelho. / Márcio Espíndola Patrianova. – Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.
 65p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Luiz Antonio de Lima Resende.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Histoquímica. 2. Músculos. I. Resende, Luiz Antonio 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 10 de Setembro de 1999, considerou o candidato MARCIO ESPINDOLA PATRIANOVA aprovado.

1. Prof. Dr. LUIZ ANTONIO DE LIMA RESENDE

2. Profa. Dra. HELOISA AMELIA DE LIMA CASTRO

3. Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LIME

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio de Lima Resende, pela atenção e habilidade com que conduziu nosso trabalho.

À Profa. Dra. Heloisa Amélia de Lima Castro, pelo apoio constante.

Ao Magnífico Reitor da Universidade do Vale do Itajaí, Dr. Edison Vilella, pelo grande incentivo nesta caminhada.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UNIVALI, pelo apoio.

Ao Coordenador do Centro de Ciências da Saúde da UNIVALI, Msc. Telmo Mesadri, pelo incentivo.

O Prof. Dr. Hercílio Pedro da Luz, meu mestre.

Ao Prof. Cláudio José Amante, pelas palavras sábias.

Aos colegas do Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental pela grande amizade.

Aos amigos Fábio Remôa e Andréia Bonzi, pela amizade e companheirismo.

Ao amigo João, da Anatomia da FOP.

Aos colegas da grande família anatômica da UNIVALI.

À Senhora Nair Bastos Granner, a tia Nina, e família, pela agradável companhia.

Aos meus familiares e a todos que direta e indiretamente estiveram presentes nesta jornada.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Doutor **Carlos Roberto Hoppe Fortinguerra**,
pelo apoio constante, e pelos trabalhos como Co-Orientador desta tese,
meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A histoquímica baseia-se em reações bem estabelecidas em química orgânica ou inorgânica, usadas para dar um produto visível à microscopia óptica.

Este trabalho teve por objetivo estudo normativo do músculo diafragma de coelhas da raça Norfolk inglesa. A porção costal do músculo diafragma foi estudada pela histoquímica, em diferentes reações, incluindo-se a reação do NADH-TR, com o objetivo de se determinar a distribuição histoquímica de fibras do tipo I, IIA e IIB.

Dentre 1037 fibras estudadas, o percentual de distribuição histoquímica observado foi de fibras tipo I, 57,3 %; tipo IIA, 19,2 %; tipo IIB, 23,4 %.

Conforme o esperado, o músculo diafragma da coelha, por sua atividade contínua na respiração do animal, apresenta-se com grande proporção de fibras do tipo I, resistentes à fadiga.

SUMMARY

The histochemistry came from well established organic and inorganic chemical reactions, used for observation of visible products on optic microscopie.

This work had as objective the assestment of the normative histochemical data in the costal portion of the diaphragm muscle from Norfolk english rabbits.

The muscle specimens were processed by different histochemical reactions, and the normal distribution of I, IIA and IIB muscle fibers were established from analysis of the NADH-TR reaction.

From 1,037 muscle fibres counted, we found 57,3 % of the type I, 19,2 % of the type IIA and 23,4 % of the type IIB. These results are expected, because the diaphragm muscle has a continuous activity during all the life of the animals, and so, need a high proportion of the oxidative type I fibres, resistant to the fatigue.

SUMÁRIO

1. - Introdução	1
2. - Revisão da literatura	4
3. - Objetivos	13
4. - Material e Métodos	15
5. - Resultados	20
6. - Discussão	52
7. - Conclusões	56
8. - Referências bibliográficas	58

1 - INTRODUÇÃO

Segundo Slatter (1993), a embriologia do diafragma tem início com o aparecimento de septo transversal, que divide o pericárdio da cavidade peritoneal. O septo se origina na região cervical e depois migra caudalmente até a região de L₁, sendo que isto explica a persistência da inervação do diafragma, pelos nervos frênicos, a partir da região cervical, na maioria dos animais. A medida em que as cavidades pleurais aumentam, os mioblastos da parede corporal migram e invadem a borda periférica do diafragma para formar a porção costal do músculo.

O diafragma do coelho é uma bainha músculo-tendínea que separa a cavidade torácica da abdominal. É dividido em 3 porções, lombar, costal e external (Craigie, 1948; Slatter, 1993; Orton, 1995).

A porção lombar consiste de 2 feixes musculares e fibrosos, a crura, sendo o direito maior e mais forte que o esquerdo, emergindo dos processos espinhosos anteriores das primeiras 3 vértebras lombares (Slatter, 1993). A porção costal origina-se das superfícies internas das regiões posteriores das costelas, por prolongamentos separados por pequenas áreas aponeuróticas triangulares. A porção esternal origina-se do processo xifóide do osso esterno. A inserção do diafragma é representada por uma porção central tendínea própria, ou centro tendíneo, em forma aproximada de y, aderida aos pulmões e pericárdio, para onde convergem radialmente as fibras musculares das porções costal e esternal. A conexão da porção lombar é assimétrica, com as 2 crura passando ventralmente à artéria aorta para terminar à esquerda do plano mediano (Craigie, 1948; Slatter, 1993).

Na superfície posterior do diafragma podem ser identificados os ligamentos falciformes, coronários e triangulares esquerdos, o hiato aórtico, o hiato esofágico, o forame da veia cava inferior, as artérias frênicas superiores, ramos diretos da artéria aorta, e as veias frênicas inferiores. As artérias frênicas fazem anastomoses com os ramos frênicos das artérias intercostais 10^a, 11^a e 12^a. No

hiato aórtico passam a artéria aorta, veias ázigos e hímiazigos, e cisterna lombar do ducto torácico. Os nervos esplâncnicos e o tronco simpático, de cada lado, passam do tórax para o abdômen entre a porção lateral dos músculos crurais e a 13ª costela.

As principais patologias dos músculo diafragma são as hérnias diafragmáticas, congênicas ou pós-traumáticas (Slatter, 1993; Hickman, 1995; Orton, 1995). Os defeitos diafragmáticos são usualmente diagnosticados por métodos radiológicos. A injeção intraperitoneal de contraste delimita bem os contornos diafragmáticos (Fowler, 1993).

Além de crucial para a respiração dos animais, o músculo diafragma, ao se contrair, contribui para com o fluxo de linfa pelo ducto torácico (Slatter, 1993).

Segundo De Troyer et al (1981), estimulações elétricas separadas das porções costal e lombar do diafragma evidenciam importantes diferenças funcionais na expansão do gradil costal, que depende mais da porção costal, enquanto a porção lombar teria uma função predominantemente expiratória. Observações semelhantes foram feitas por Kilarski & Sjöström (1990), e vários autores já demonstraram diferenças funcionais entre as 3 porções do músculo diafragma (Farkas & Rochester, 1988), donde o grande interesse do estudo histoquímico das fibras que o compoem.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

O estudo da musculatura esquelética apresenta duas fases. Uma antes e outra depois do advento da histoquímica.

Dubowitz & Brooke (1973), fazendo um retrospecto histórico, comenta sobre pesquisadores como Lorenzini, que em 1678 havia identificado diferenças na cor do músculo, referindo-os como vermelhos e brancos.

Somente a partir do final do século XIX surgiu correlação morfo-funcional.

Ranvier (1874), correlacionou a fisiologia da velocidade de contração com a cor do músculo do coelho, estabelecendo um tipo de fibra de contração lenta, de cor vermelha, e outro, de contração rápida, de cor branca.

Bullard (1919), diferenciou 2 tipos de fibras musculares no diafragma do gato pelo sudam III.

Com o advento da citoquímica e histoquímica, foi possível confirmar o empirismo e as observações relatadas anteriormente. Com a determinação de

sistemas enzimáticos, além de constituintes químicos, tornou-se possível correlacionar a atividade funcional de fibras individuais com a sua morfologia.

O princípio da citoquímica e histoquímica baseia-se 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; Dubowitz et al, 1985; Pearse, 1980; Werneck, 1981).

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; Dubowitz et al., 1985; Pearse, 1980].

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 3 tipos de 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,b), propuseram associação de informações bioquímicas, histoquímicas e fisiológicas, que, em conjunto, caracterizam os 3 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.

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, dependentes de um único axônio, seriam histoquimicamente idênticas.

A diferenciação dos 3 tipos de fibras musculares, pela reação oxidativa do NADH-TR, é a mais comumente utilizada (Dubowitz & Brooke, 1973). Porém, não há uma só 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,c; Nishiyama, 1966; Yellin & Guth, 1970; Yellin, 1972; Barnard et al., 1971; Petter et al, 1972; Ariano, 1973; Engel, 1974).

Gauthier & Padykula (1966), estudaram o diafragma de 36 diferentes espécies, escalonadas pelo peso e tamanho dos animais, em amostras colhidas preferencialmente do diafragma costal direito, processadas pela reação do sudan black. Encontraram predomínio de fibras do tipo I, em animais pequenos, como rato e coelho, e predomínio de fibras do tipo II em animais maiores, como homem e vaca.

Yellin (1972), utilizando as reações da desidrogenase succínica e miosina ATPase, encontraram diferenças na reatividade enzimática das fibras musculares do diafragma em relação ao músculo tibial anterior. Em seus achados, a clara diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB, no tibial anterior, não foi possível no diafragma.

Lieberman et al (1973), encontraram, no diafragma humano, uma média de 55 % de fibras do tipo I, 21 % de fibras do tipo IIA e 24 % de fibras do tipo IIB.

Riley & Berger (1979), estudando biópsias de diferentes porções do diafragma de 6 gatos, encontraram 50 % de fibras do tipo I, 37 % de fibras do tipo IIA e 13 % de fibras do tipo IIB.

Metzger et al (1985), através das reações histoquímicas NADH-TR e miosina ATPase, encontraram, no diafragma do rato, 40 % de fibras do tipo I, 27 % de fibras do tipo IIA e 34 % de fibras do tipo IIB (mas a soma dos percentuais fornecidos por estes autores daria 101 %).

Cobb et al (1994), utilizando as reações NADH-TR e miosina ATPase, encontram 66 % de fibras do tipo I na região costal do diafragma do cavalo.

Os dados existentes sobre histoquímica do músculo diafragma do coelho são escassos.

Davies & Gunn (1972), encontram forte atividade de desidrogenase succínica em aproximadamente 60 % das fibras, dentre 1605 fibras estudadas, de 3 coelhos.

Hoar & Kerrick (1979), usando método de ativação pelos cátions bivalentes estrôncio e cálcio, calcularam, no diafragma de coelhos, cerca de 40 a 44 % de fibras do tipo I, e 56 a 60 % de fibras do tipo II.

Green et al (1984), afirmaram que animais pequenos, de alto metabolismo e frequências respiratórias altas, teriam grande proporção de fibras do tipo I no diafragma. Estudaram a porção costal do diafragma do coelho através da reação da desidrogenase succínica. Encontraram 40,2 % de fibras do tipo I, 36,2 % de fibras do tipo IIA, 23,5 % de fibras do tipo IIB.

Le Souëf et al (1988), determinaram a distribuição histoquímica das fibras do diafragma de coelhos de diferentes idades. Encontraram, em média, em coelhos recém-nascidos, 9,4 % de fibras do tipo I, 23,2 % de fibras do tipo IIA, 29,6 % de fibras do tipo IIB e 37,7 % de fibras do tipo IIC. Na idade adulta, as proporções encontradas foram fibras tipo I, 43,2 %; IIA, 37 %; IIB, 17,4 % e IIC, 2,4 %.

Kilarski & Sjöström (1990), encontraram, nas regiões torácica e abdominal do diafragma do coelho, respectivamente, 18 a 26 % de fibras do tipo I, 39 a 46 % de fibras do tipo IIA e 33 a 34 % de fibras do tipo IIB.

A escassez de dados e as controvérsias existentes sobre a distribuição histoquímica das fibras musculares do diafragma do coelho, justificam a proposição desta pesquisa.

3 - OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

- 1) Estudar a histoquímica normal do músculo diafragma de coelhas da raça Norfolk inglesa, em biópsias a fresco, processadas pela histoquímica;
- 2) Determinar a distribuição enzimática de fibras do tipo I, IIA e IIB, através de morfometrias a partir da reação do NADH-TR.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 10 coelhas adultas da raça Norfolk inglesa, de 5 a 7 meses de idade, com pesos variando de 2,8 a 3,1 kg, mantidas em cativeiro, alimentadas com ração apropriada e água *ad libitum*.

As dissecções dos nervos frênicos e biópsias dos músculos diafragmas das coelhas foram realizadas no Laboratório Experimental do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

O procedimento de coleta do material, realizado à esquerda em cada caso, foi dividido em 4 etapas: anestesia, sacrifício, dissecção e remoção das amostras. Os instrumentais e materiais utilizados nestes procedimentos foram: um conjunto de pinças dente-de-rato; 1 cabo de bisturi com lâminas; 2 tesouras clínicas; 1 conjunto de pinças hemostáticas; um porta-agulhas; gaze e algodão; seringas de plástico, descartáveis, de 10 ml; agulhas hipodérmicas descartáveis, tamanho 20 x 4,5; fios de sutura; uma caixa de madeira para anestesia, pesando 1,93 kg; 1 microscópio cirúrgico marca Zeiss, modelo DFV; Hypnol a 3%; heparina, 1.000 UI/ml; soro fisiológico.

Etapa 1: ANESTESIA

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. Após a subtração do peso da caixa determinou-se o peso do animal, com finalidade de se calcular a dose de anestésico a ser injetada. O conjunto de seringa e agulha descartáveis foi montado para 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.

Etapa 2: SACRIFÍCIO

Após injeção endovenosa de 3.000 UI de heparina, o sacrifício foi por secção de vasos sanguíneos arteriais e venosos da região ingüinal, para choque hipovolêmico e morte. A heparinização 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.

Etapa 3: DISSECÇÃO

Em cada animal, foi realizada dissecação de todo o trajeto do nervo frênico, desde sua emergência na coluna cervical até sua entrada no músculo diafragma.

Etapa 4: BIÓPSIA

O próximo passo foi biópsia da porção costal do músculo diafragma esquerdo, em sua região mais espessa, num local padronizado, a meia distância entre a linha média e a região mais lateral do gradil costal esquerdo, fora da área cardíaca, no plano transversal.

A amostra de músculo, removida, foi posta numa placa de Petri, identificada e enviada para o laboratório de histoquímica.

PROCEDIMENTOS HISTOQUÍMICOS

Os procedimentos histoquímicos foram realizados no Laboratório de Histoquímica Muscular dos Departamentos de Patologia e Neurologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

As amostras de músculo, medindo aproximadamente 3 x 5 mm, foram manipuladas com cuidado para se evitar artefatos.

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 Tissue-Tek-OCT, para obtenção de várias lâminas, contendo cortes histológicos de 8 a 10 micras de espessura. Os cortes foram conduzidos a estufa a 37°C , onde permaneceram por mais 10 minutos. A seguir, foram submetidos às seguintes reações histológicas e histoquímicas, com métodos descritos por Dubowitz et al (1985): HE, tricrômico de Gomori modificado, nicotinamida – dinucleotídeo tetrazolium redutase (NADH-TR), miosina ATPase no pH 4.3, 4.6 e 10.4, esterase inespecífica, fosfatase ácida, PAS, desidrogenase succínica (SDH), e fosfatase alcalina.

MORFOMETRIAS

As morfometrias foram realizadas com o ojetivo de se ultrapassar 1.000 fibras contadas, que ocorreu durante a contagem do animal 4, após contagens dos animais 1, 2 e 3. A fotografia da reação do NADH-TR, de cada um destes 4 animais, foi dividida em 4 quadrantes iguais e ampliada em máquina de xerox colorido, para contagem das fibras do tipo I, IIA e IIB. O total de fibras tipo I, IIA e IIB, de cada quadrante, foi determinado. Após isto, calculou-se a média do número de fibras do tipo I, IIA e IIB, de cada animal. No final, foi feita contagem geral e determinação dos percentuais sobre o total de fibras contadas.

5 – RESULTADOS

As dissecções dos nervos frênicos esquerdos necessitaram do microscópio cirúrgico, porque o nervo é muito delgado em sua porção cervical, e se mescla a pequenos ramos do plexo braquial, tornando difícil sua individualização. Ao microscópio cirúrgico, sua anatomia foi perfeitamente acompanhada, desde sua emergência na região cervical, descendo na região paramediana do pescoço, atravessando o plexo braquial, até sua entrada no músculo diafragma esquerdo.

As dissecções dos nervos frênicos dos 10 animais mostraram resultados uniformes, sem variações anatômicas.

A seguir, são apresentadas fotografias de uma seqüência de dissecção, ilustrando o nervo frênico esquerdo, em todo seu trajeto, e suas principais relações anatômicas.

No final, está indicado o local da biópsia do músculo diafragma, o trajeto anatômico do nervo frênico esquerdo e suas relações com o plexo braquial.



Figura 1- Tricotomia do tórax e abdômen.

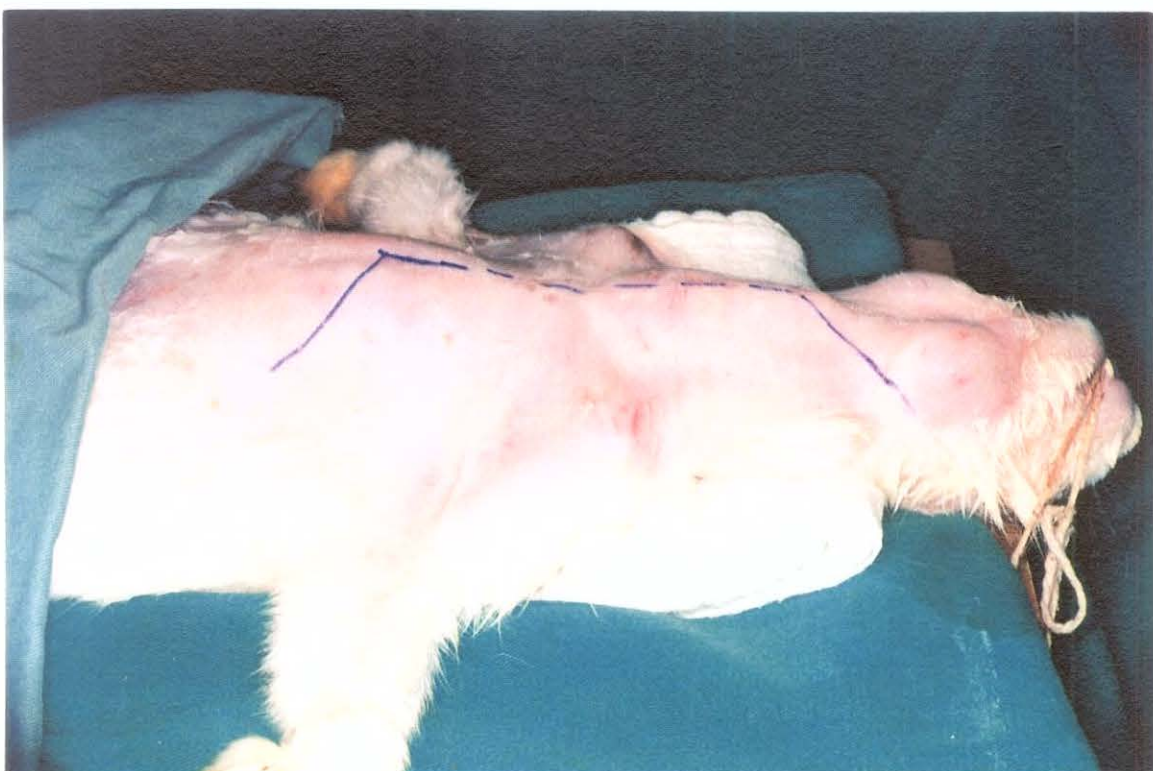


Figura 2- Demarcação cutânea do local da incisão.

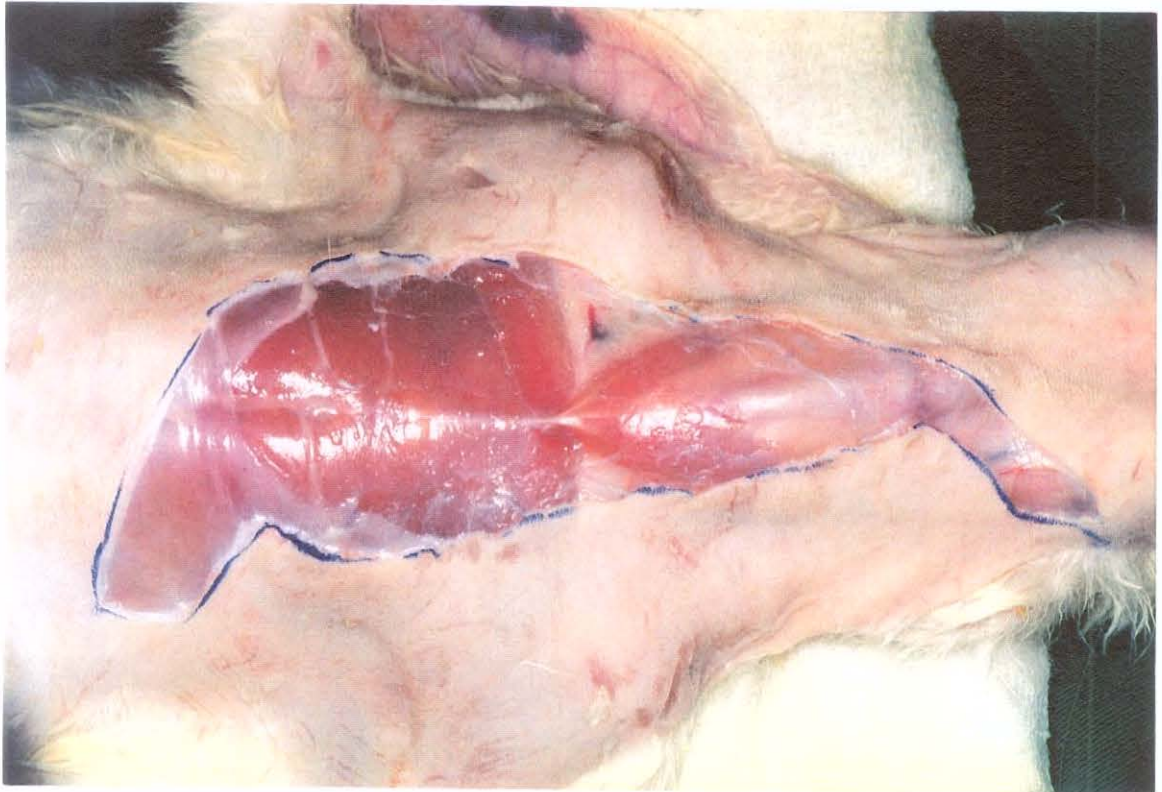


Figura 3- Incisão. Exposição da tela subcutânea.

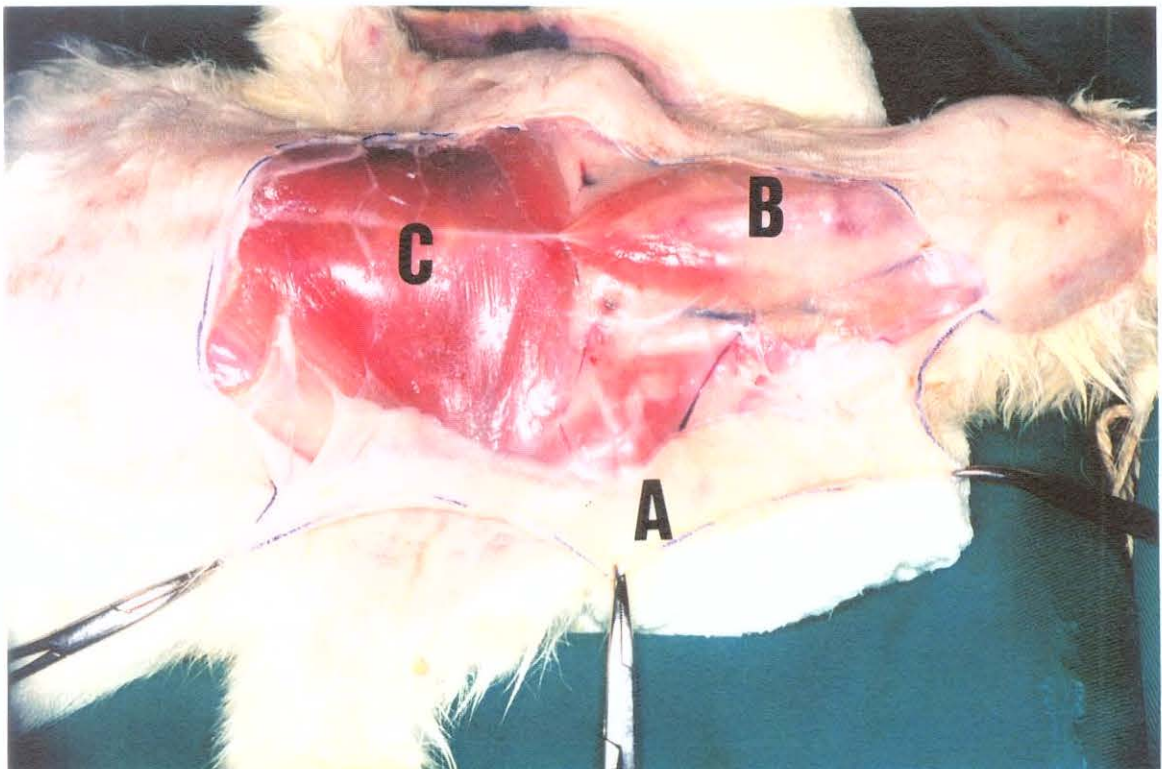


Figura 4- Rebatimento da tela subcutânea (A). Exposição dos músculos anteriores do pescoço (B) e peitorais (C).

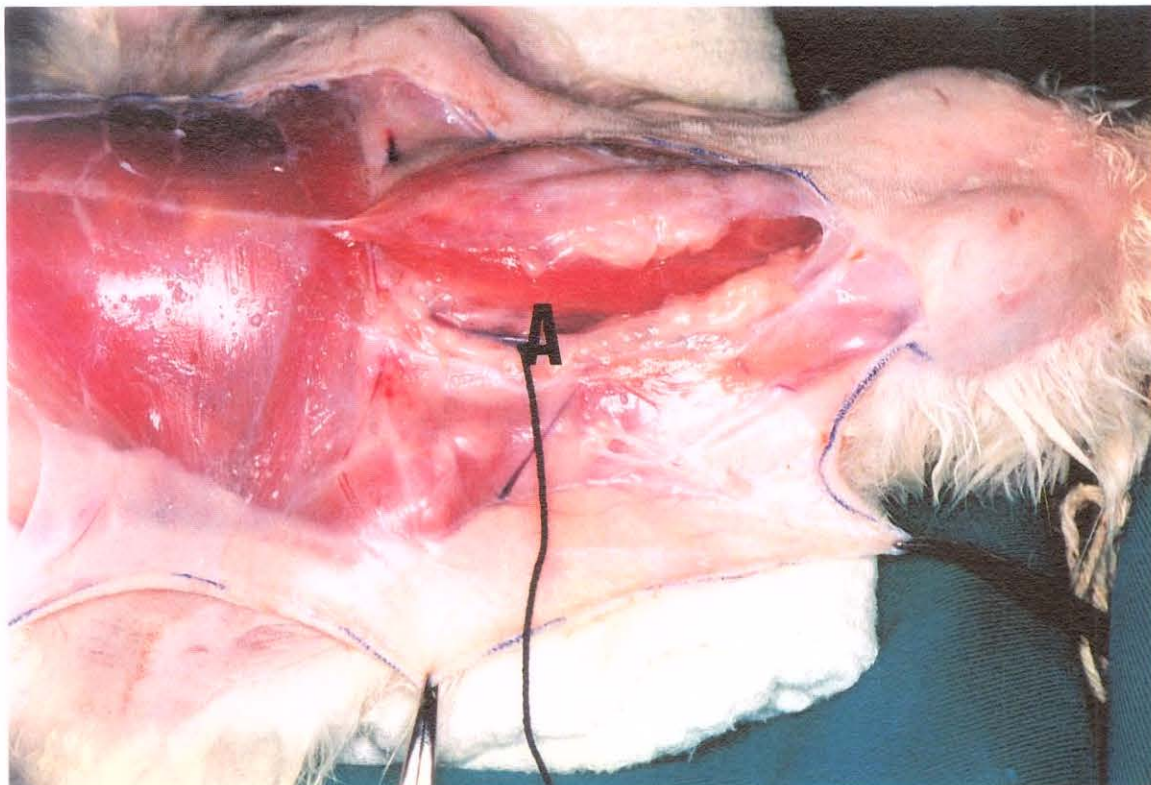


Figura 5- Veia jugular comum (A).

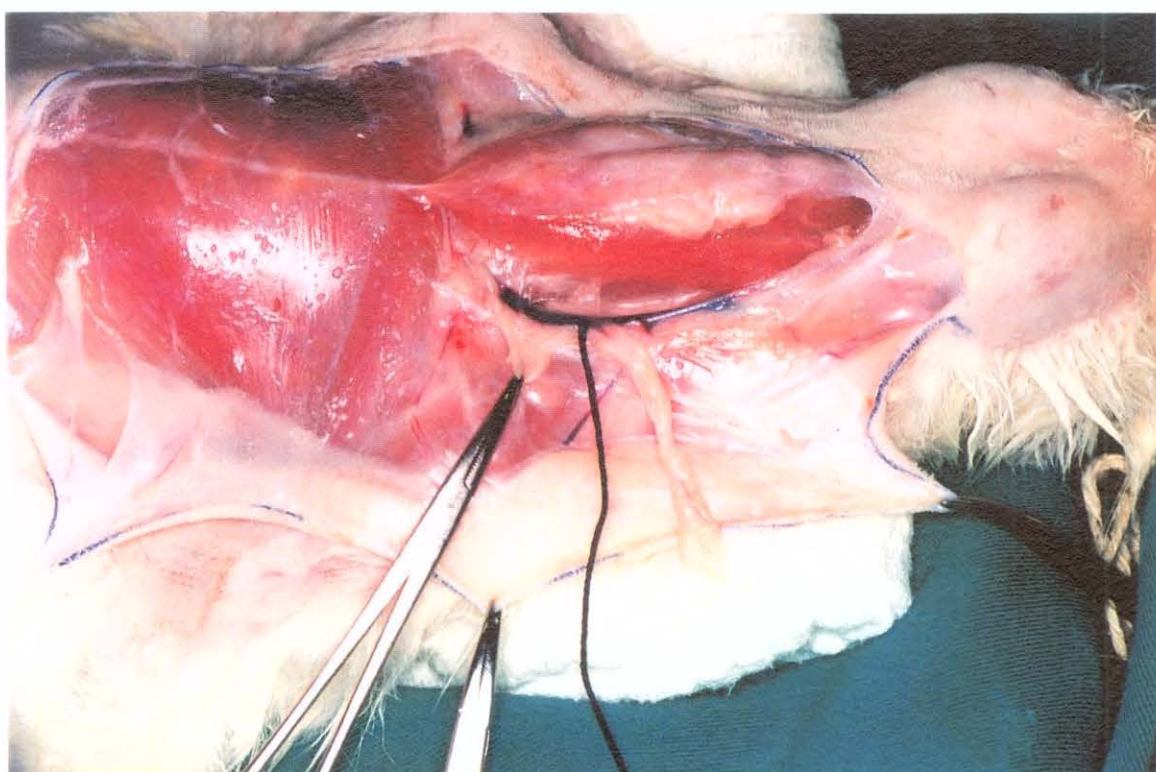


Figura 6- Dissecção do trajeto da veia jugular comum

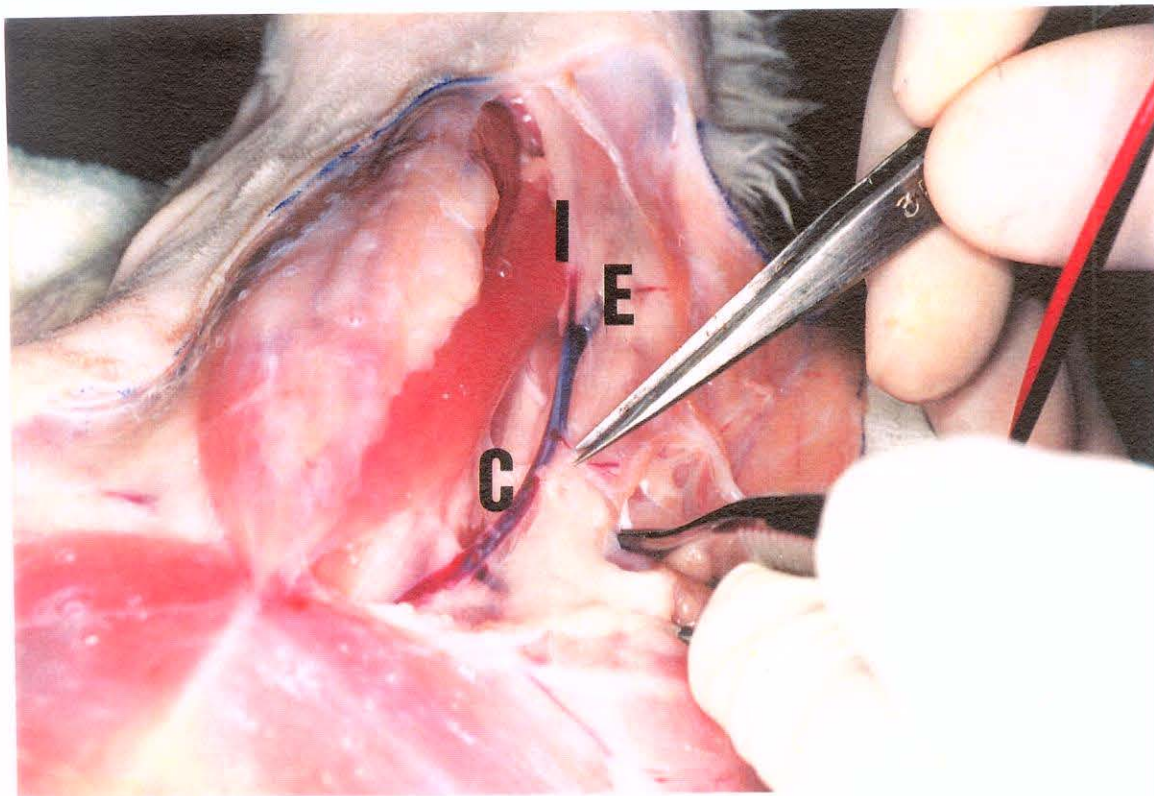


Figura 7- Exposição das veias jugular interna (I), externa (E) e comum (C).

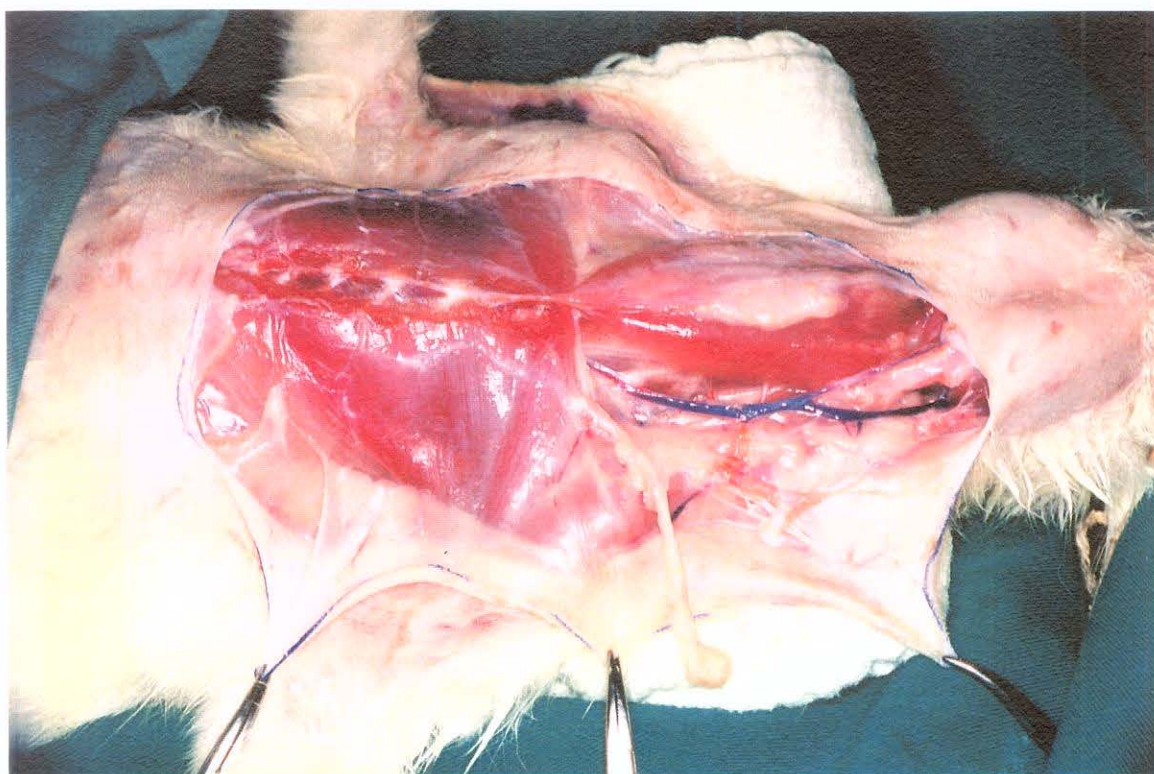


Figura 8- Continuação da dissecação dos trajetos das veias jugulares.

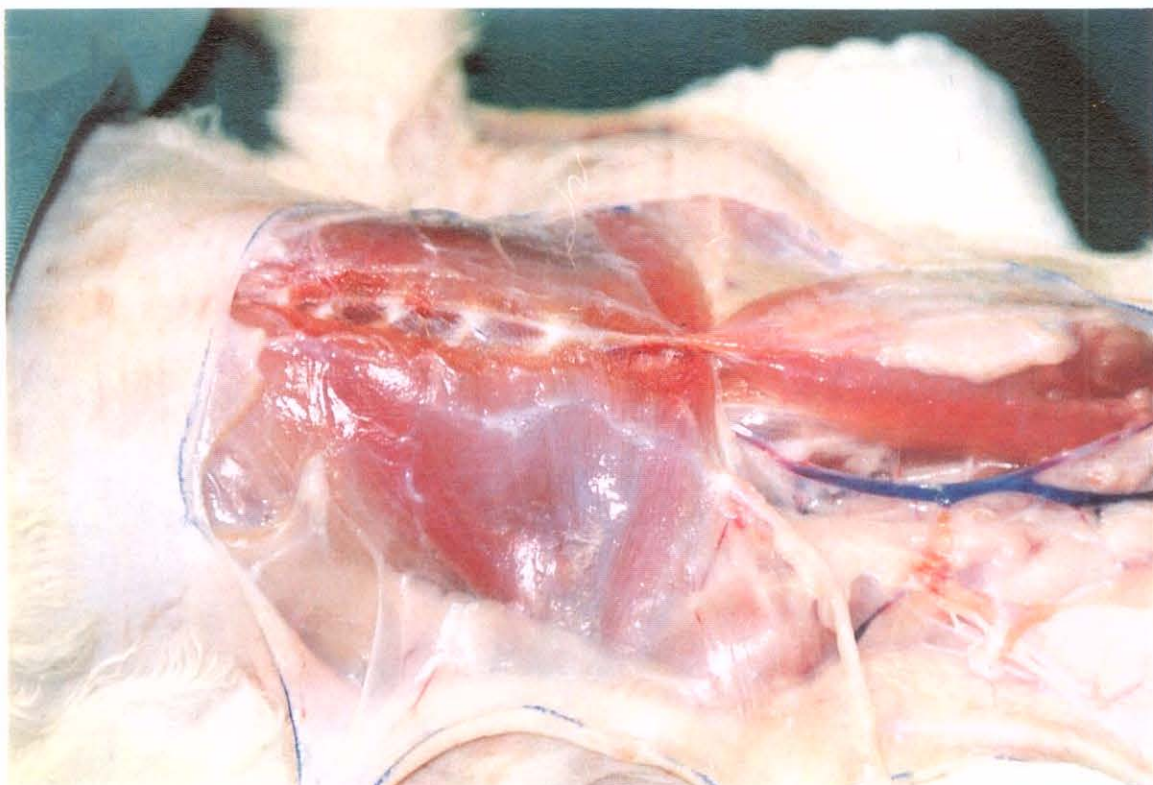


Figura 9- Incisão torácica paramediana.

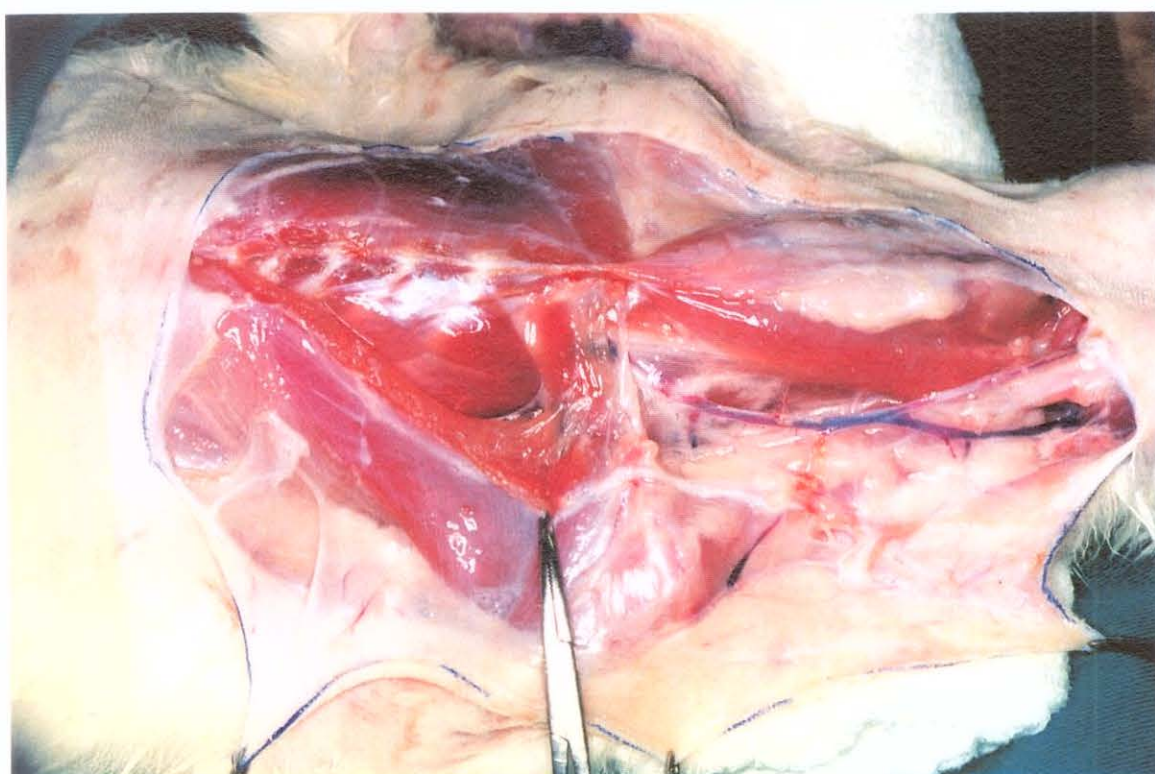


Figura 10- Início da dissecação do músculo peitoral.

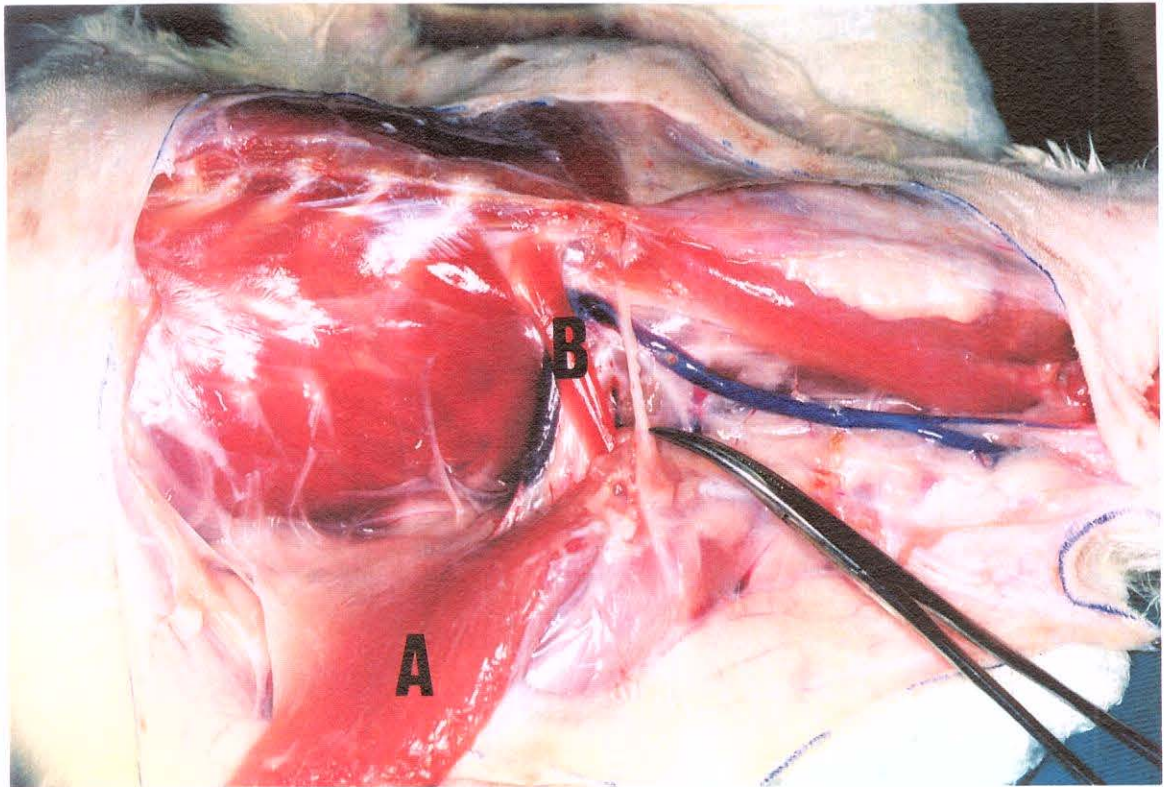


Figura 11- Músculo peitoral (A). Músculo sub-clávio (B).

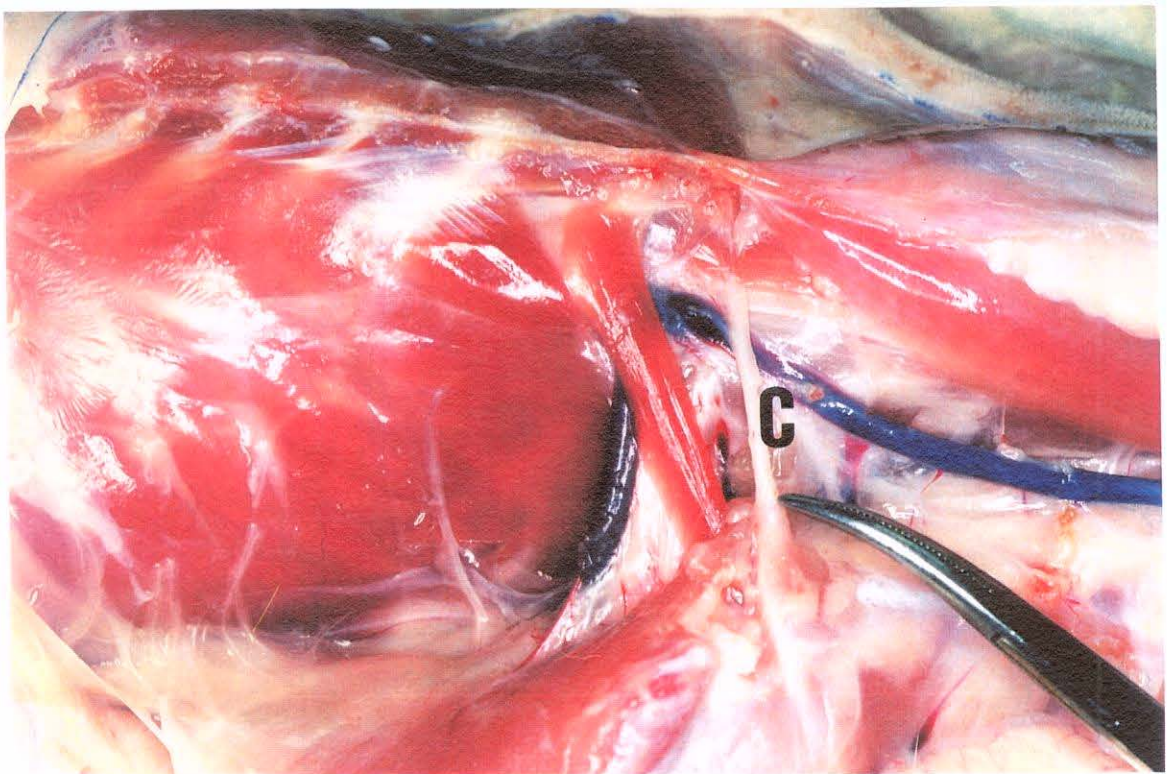


Figura 12- Identificação da clavícula (C).

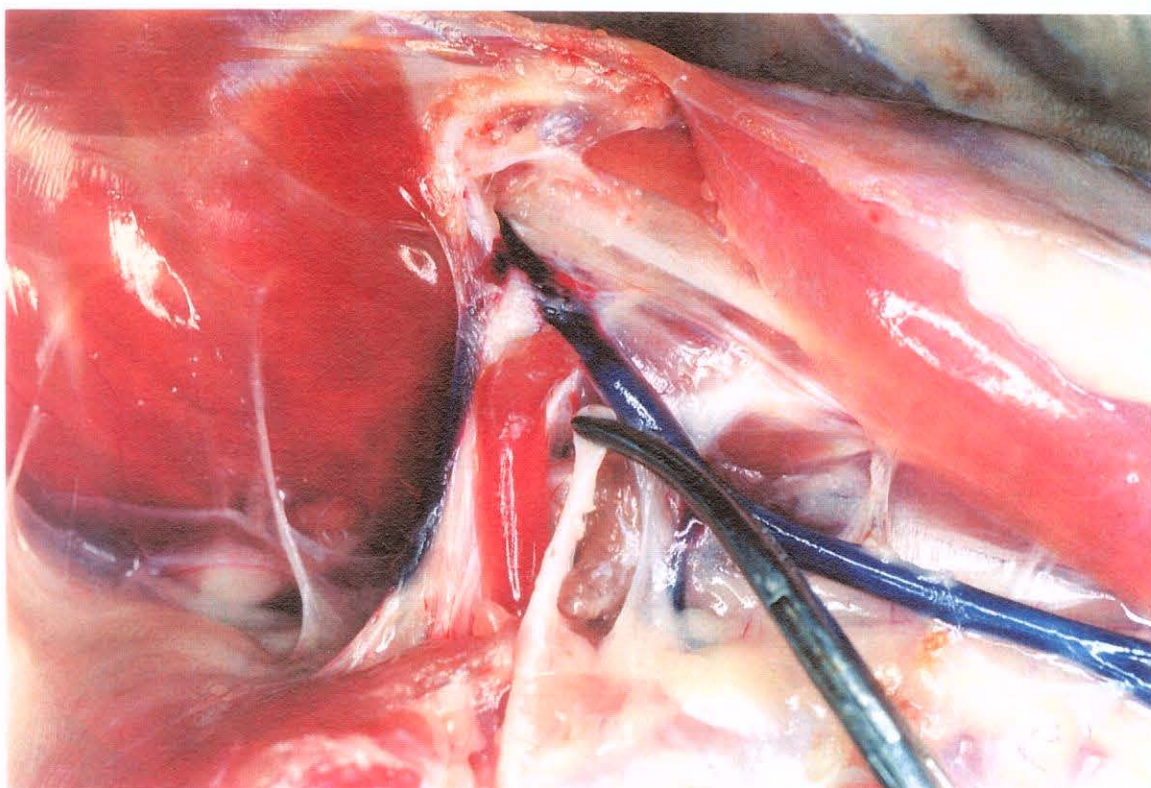


Figura 13- Remoção da clavícula.

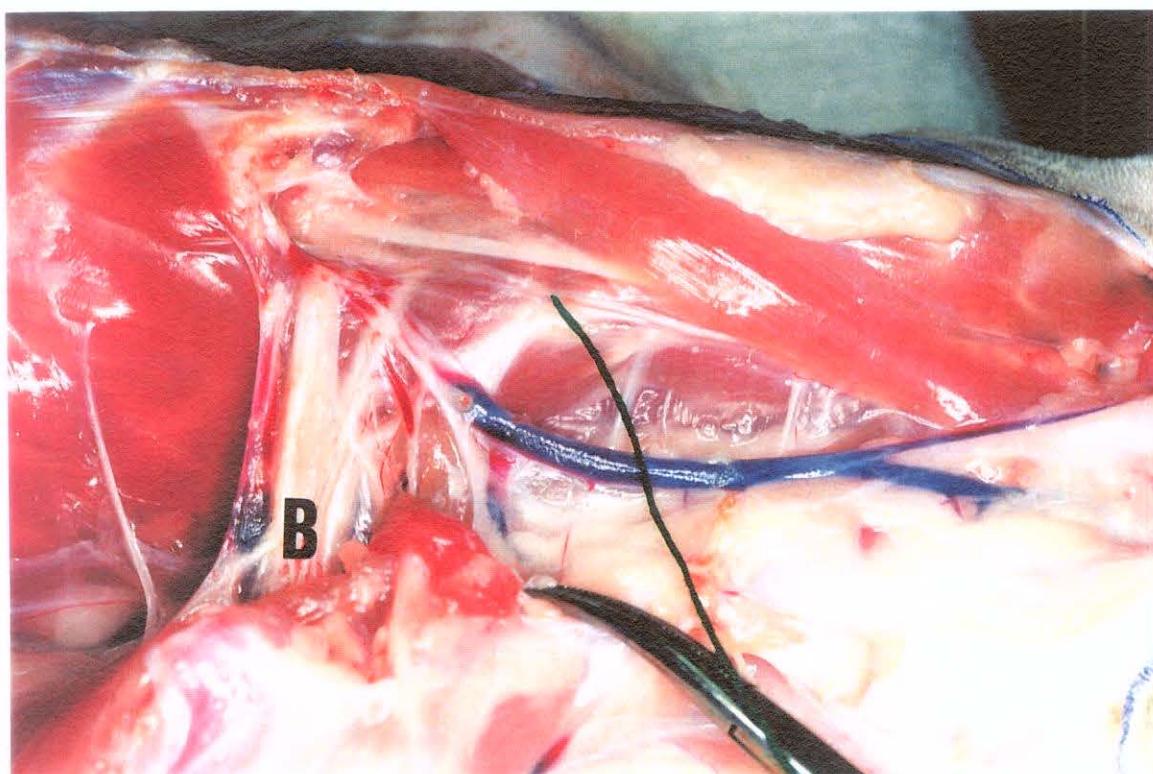


Figura 14- Exposição do plexo braquial (B).

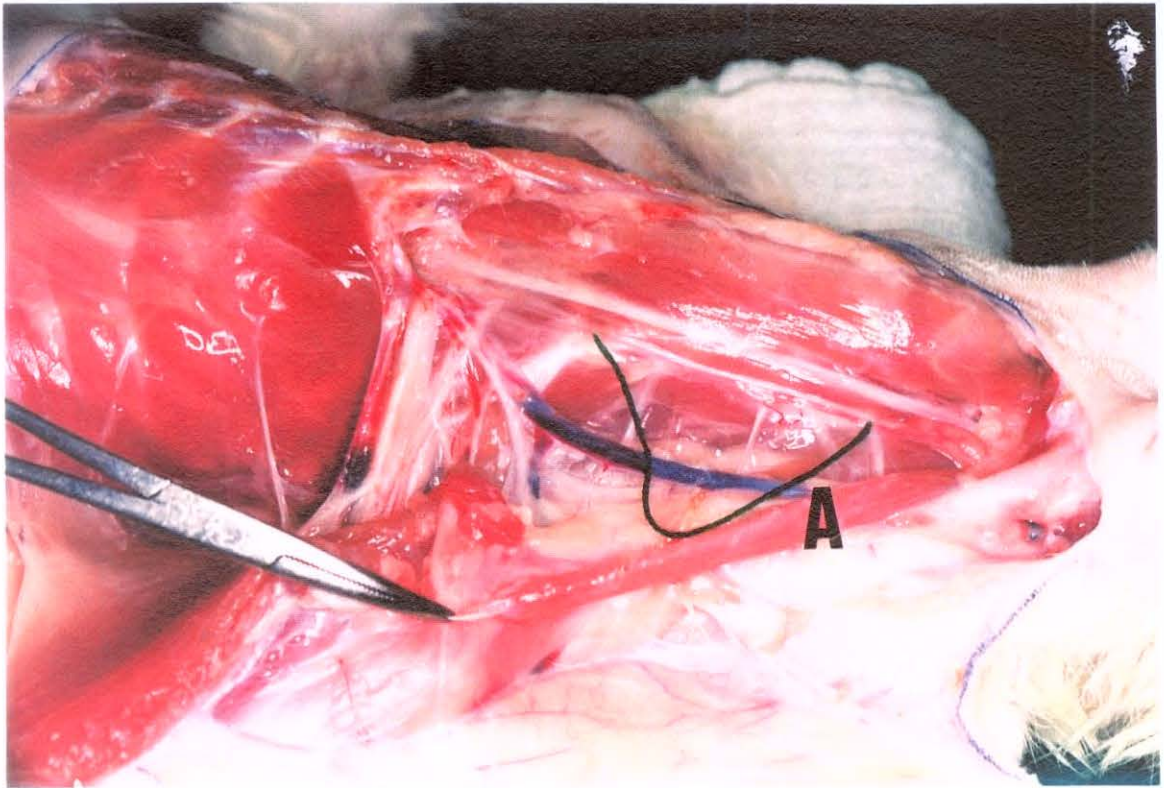


Figura 15-Rebatimento do músculo anterior do pescoço (A).

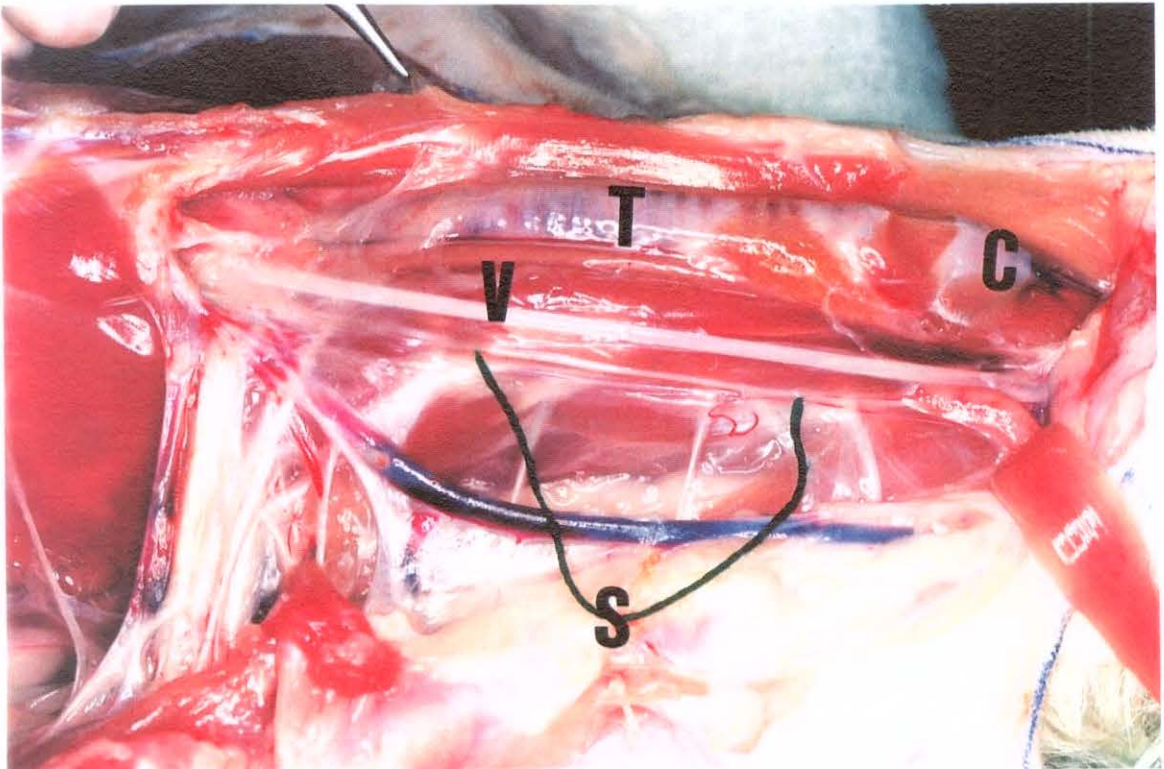


Figura 16- Tronco simpático (S). Nervo vago (V). Traquéia (T).
Cartilagem tireóide (C).



Figura 17- Toracotomia (A). Tronco simpático (S). Nervo vago (V).

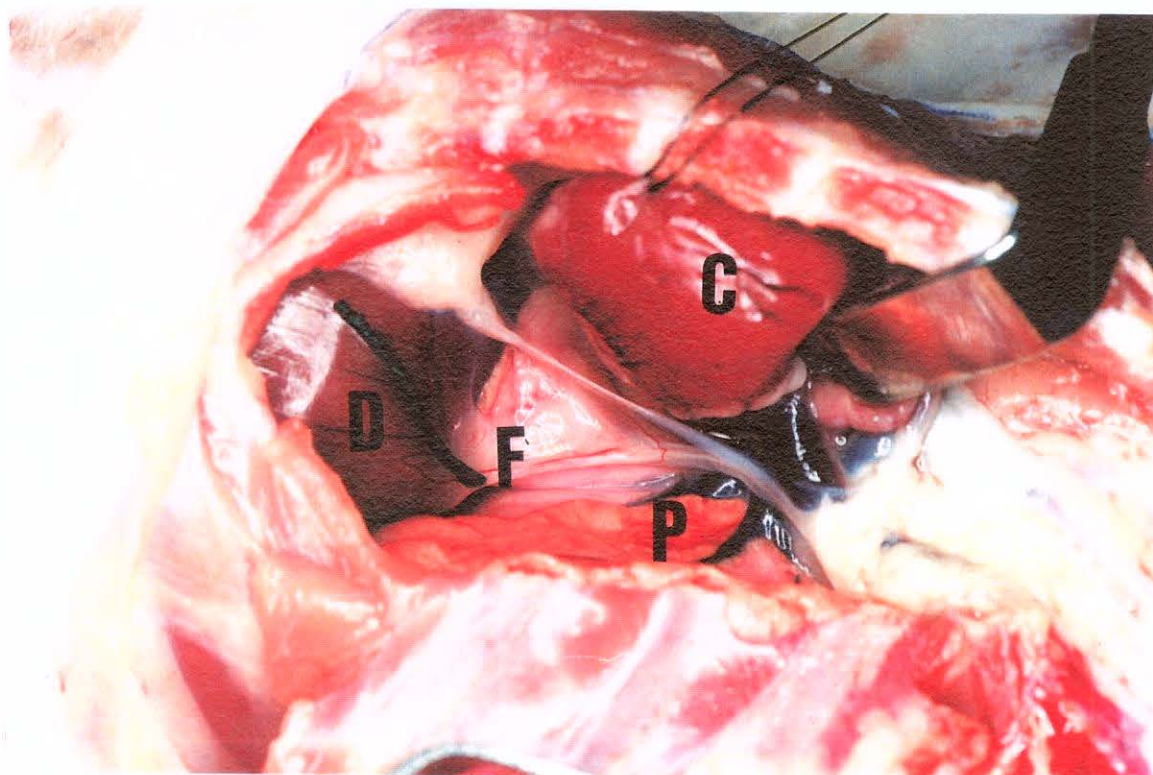


Figura 18- Coração (C). Pulmão (P). Músculo Diafragma (D). Nervo frênico (F)

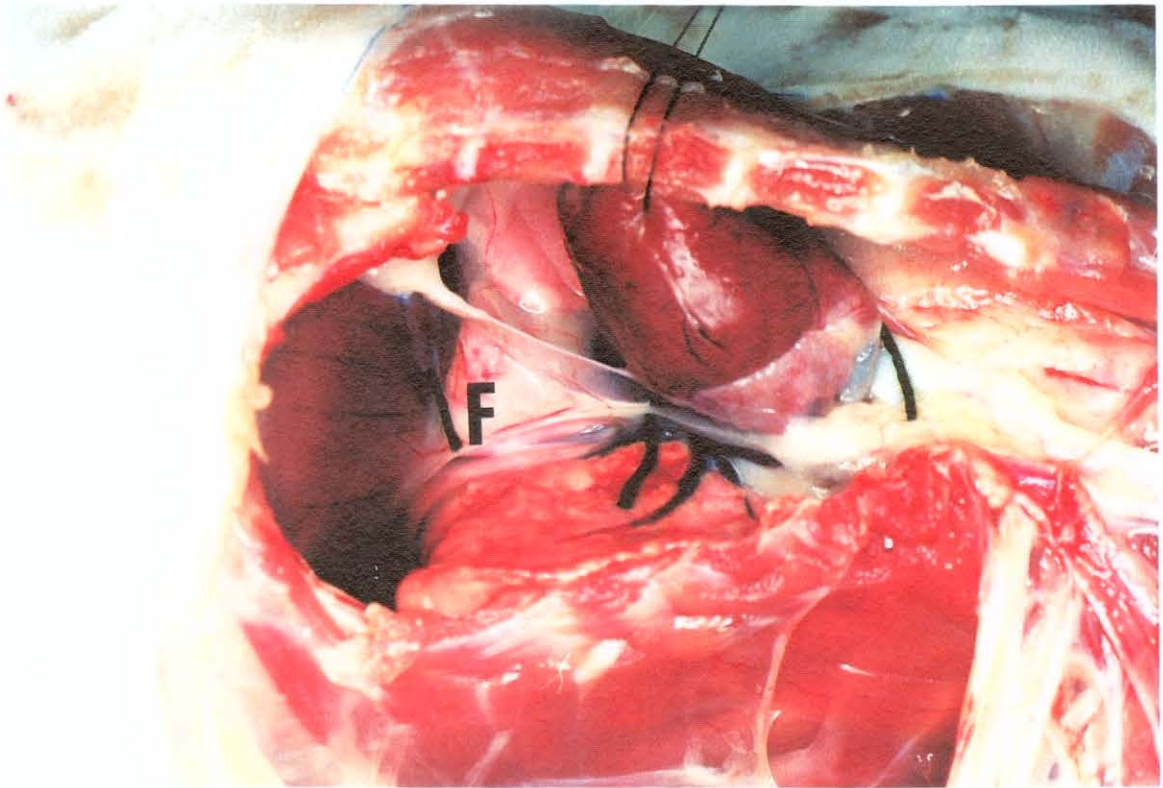


Figura 19- Trajeto do Nervo frênico (F).

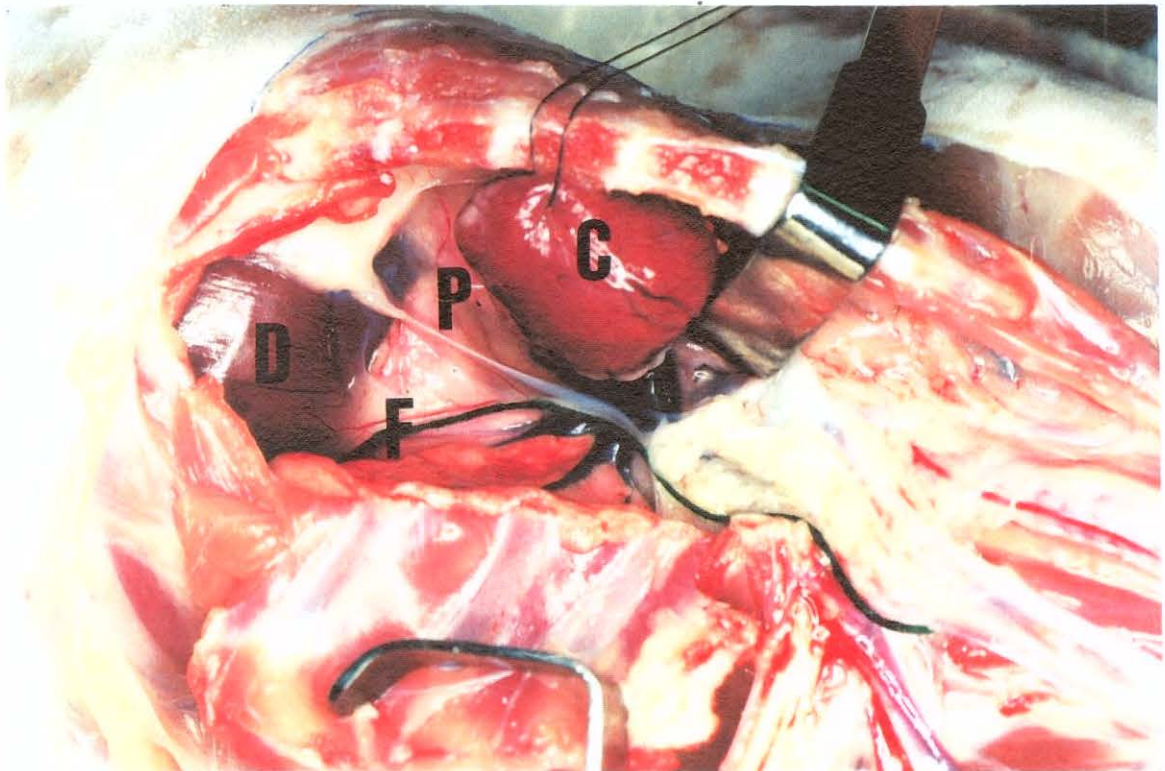


Figura 20- Coração (C). Pulmão (P). Músculo Diafragma (D). Trajeto do Nervo Frênico (F).

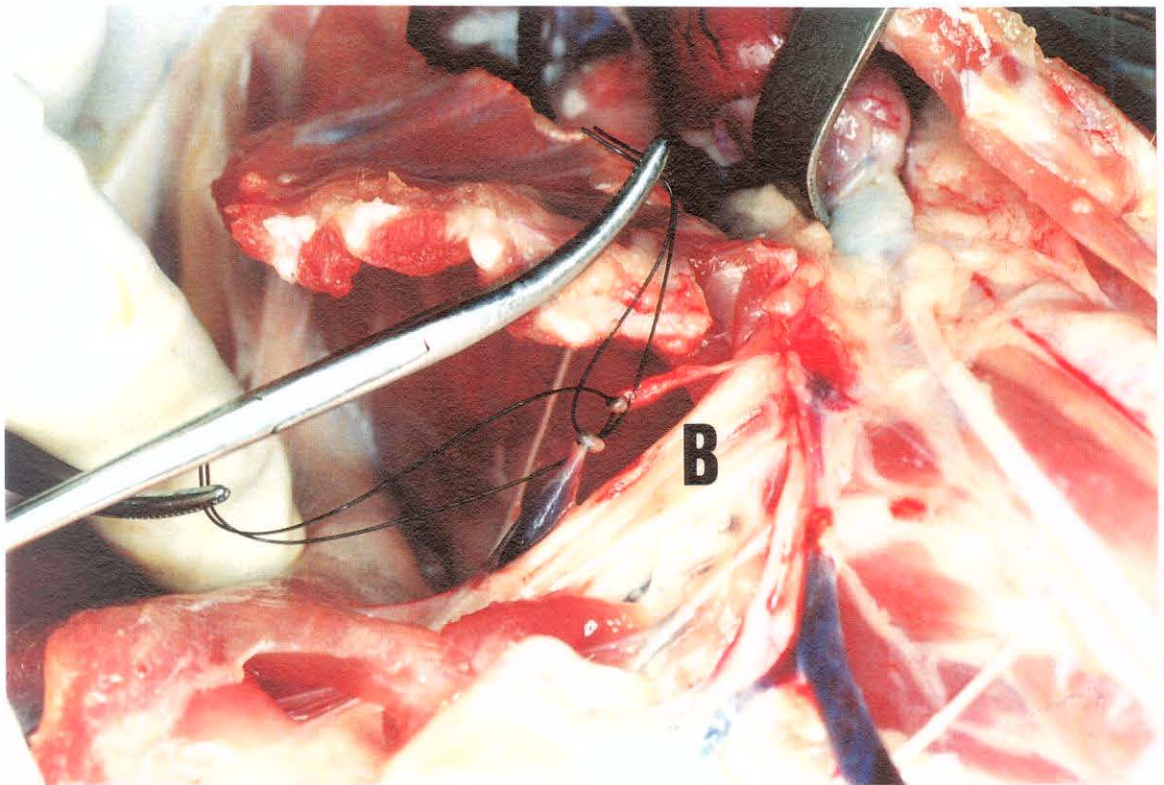


Figura 21- Exposição do plexo braquial (B). Dissecção do tecido adiposo sobre o nervo frênico.

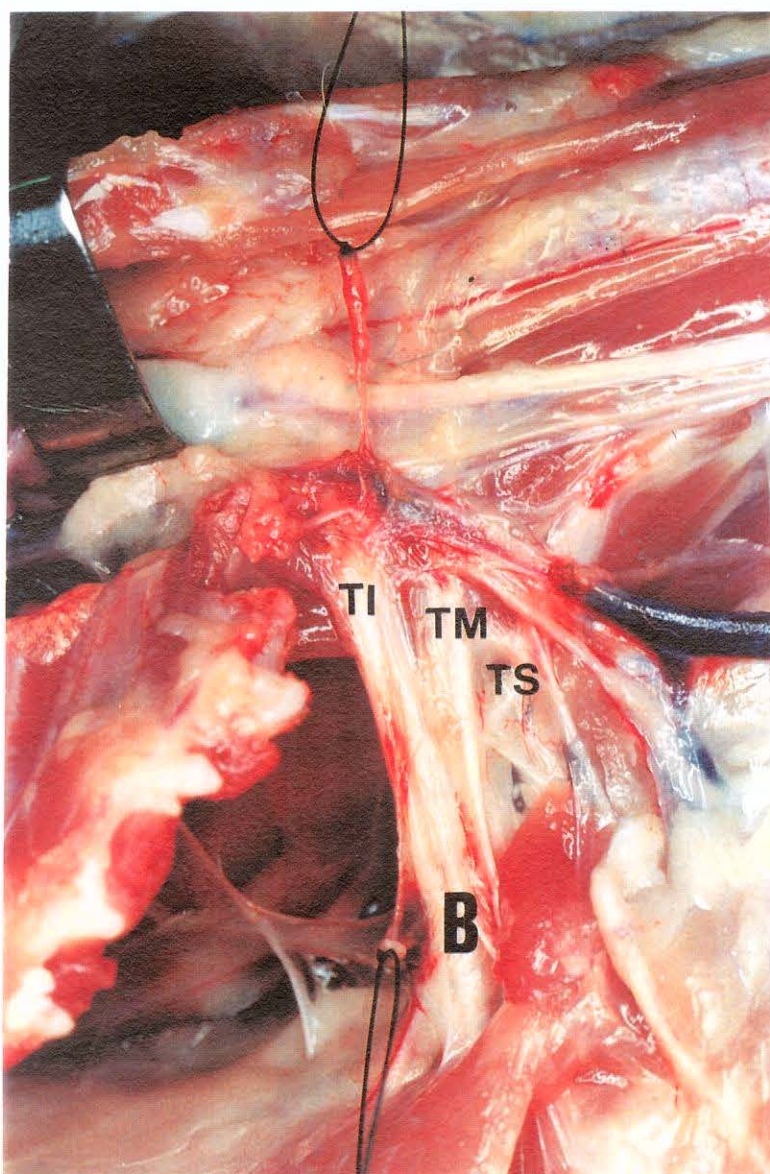


Figura 22- Plexo braquial (B). Tronco superior (TS). Tronco médio (TM).
Tronco Inferior (TI).

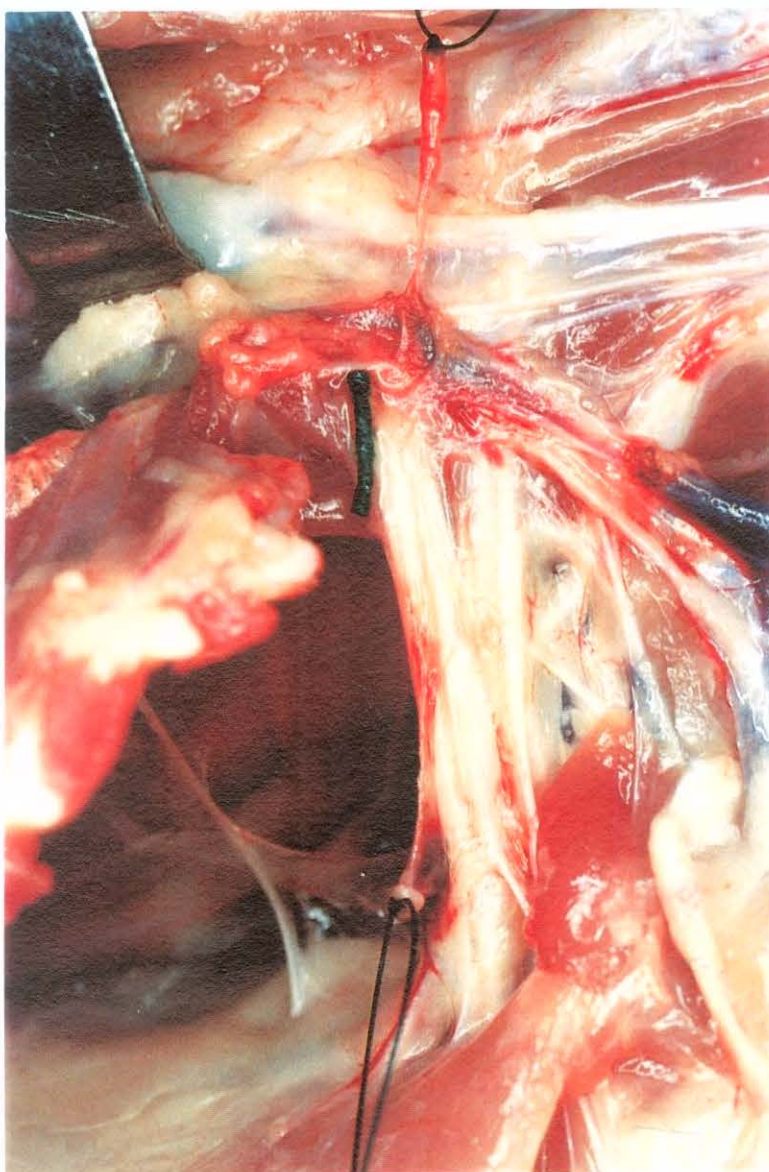


Figura 23- Trajeto do nervo frênico.

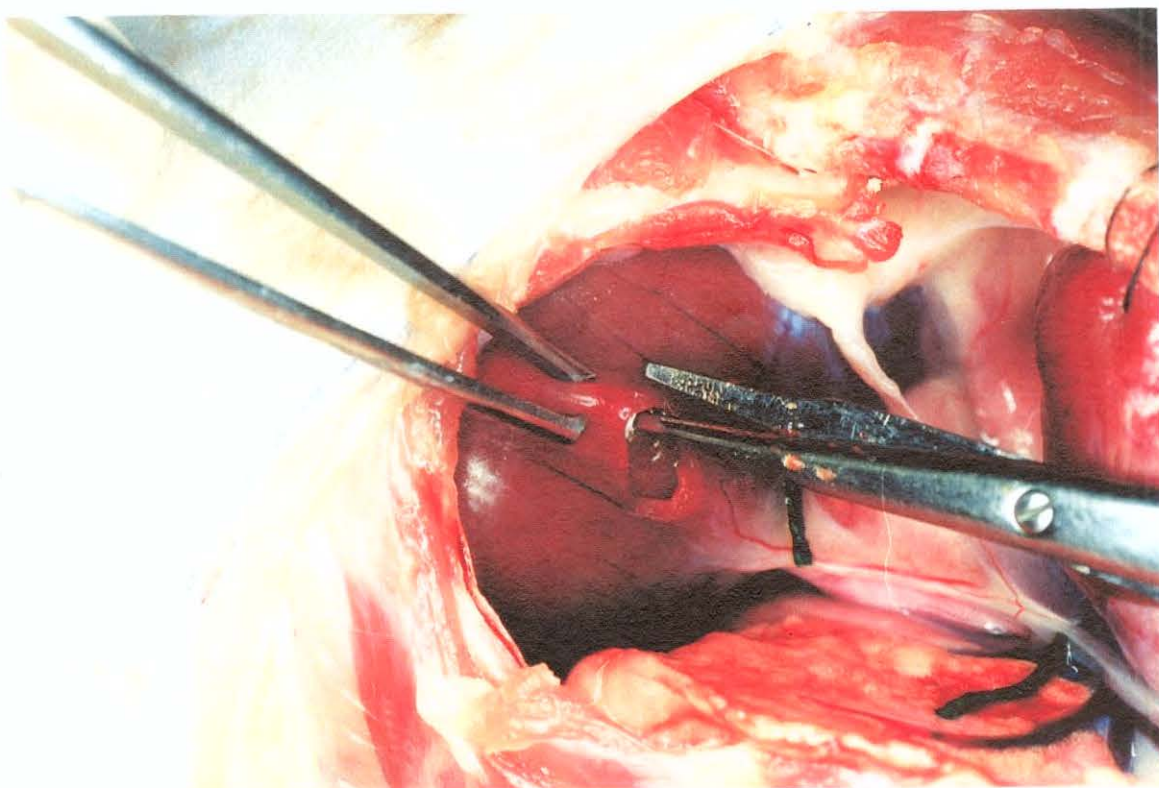


Figura 24- Incisão para biópsia do músculo diafragma.

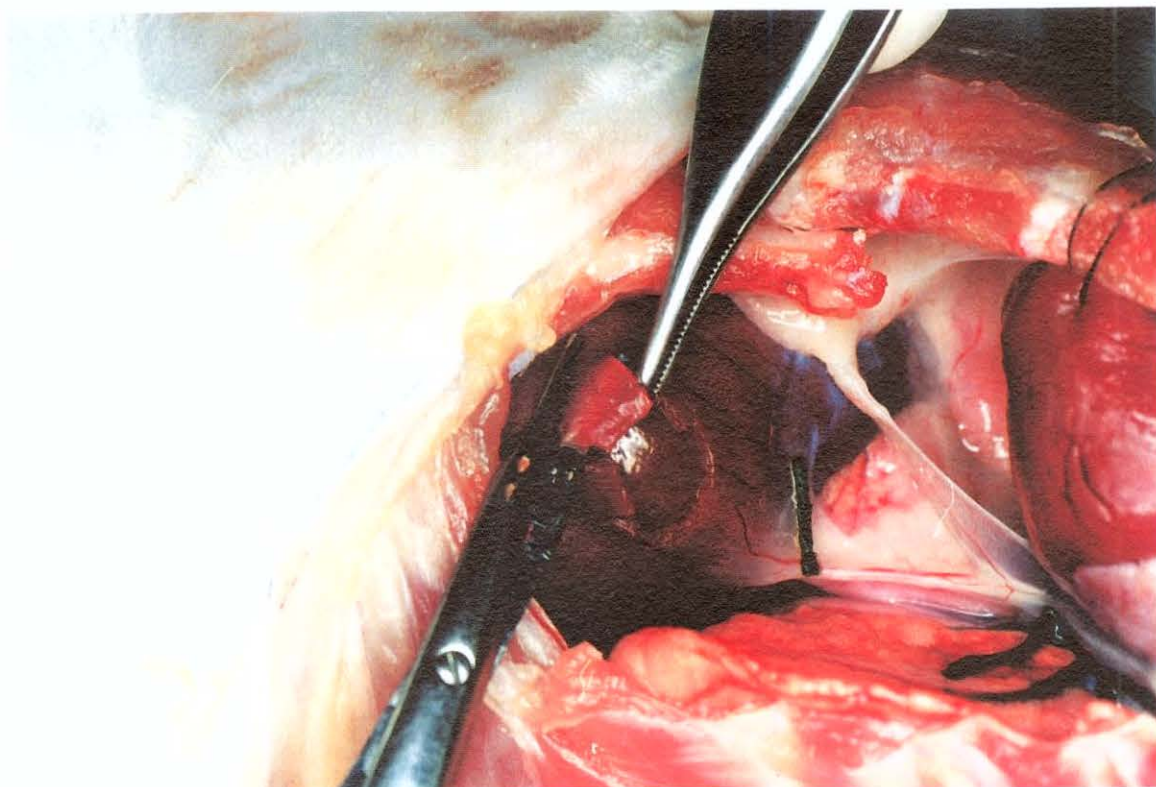


Figura 25- Remoção da biópsia do músculo diafragma.



Figura 26- Fragmento do músculo diafragma.

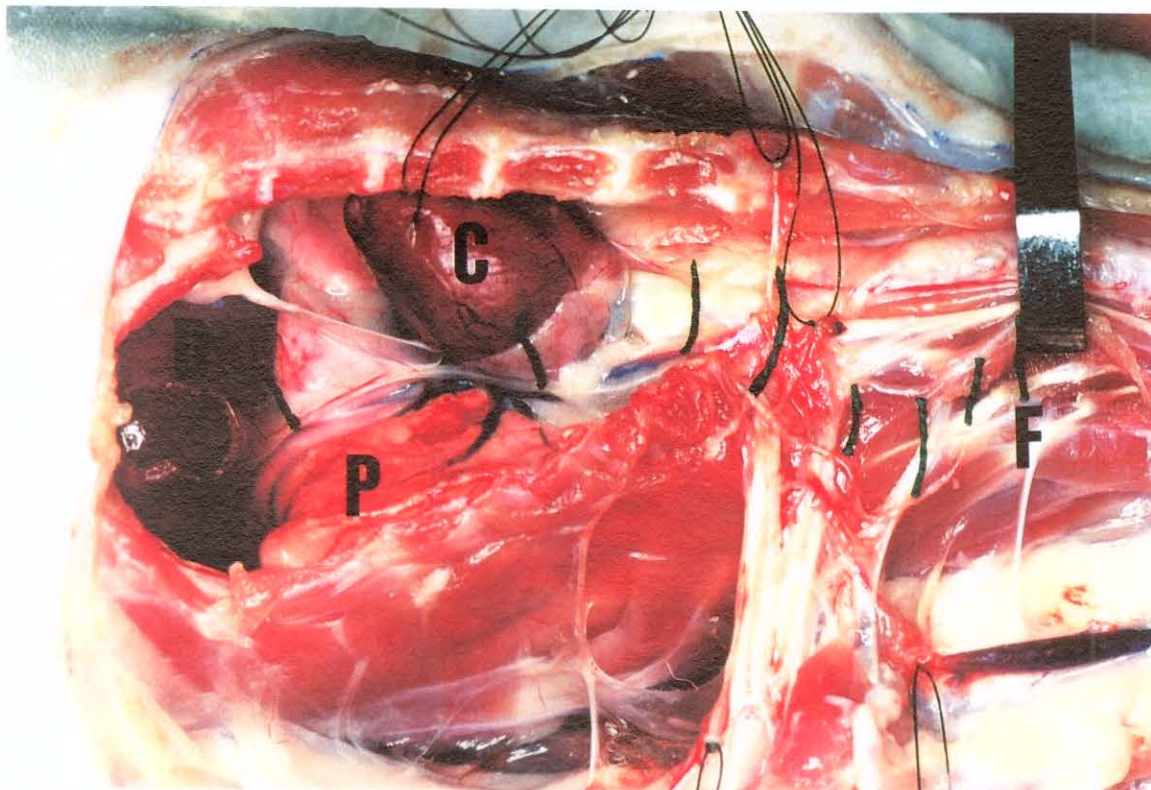


Figura 27- Coração (C). Pulmão (P). Músculo diafragma (D). Nervo frênico (F).

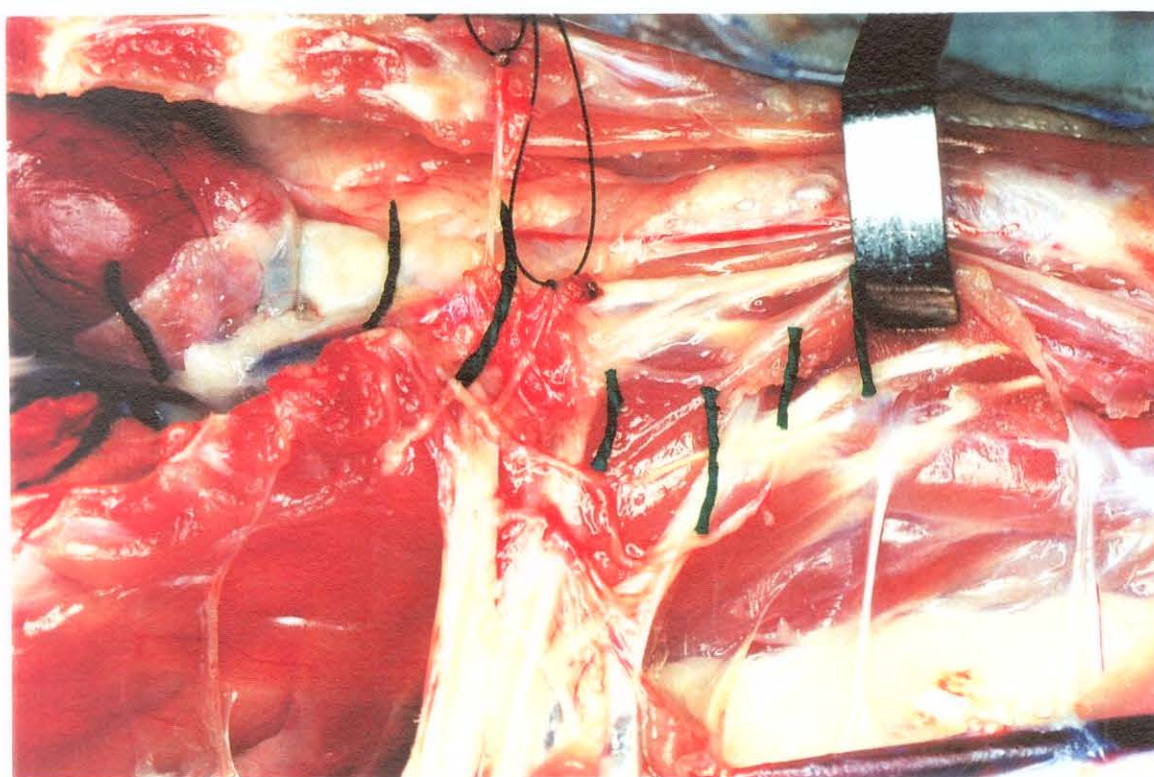
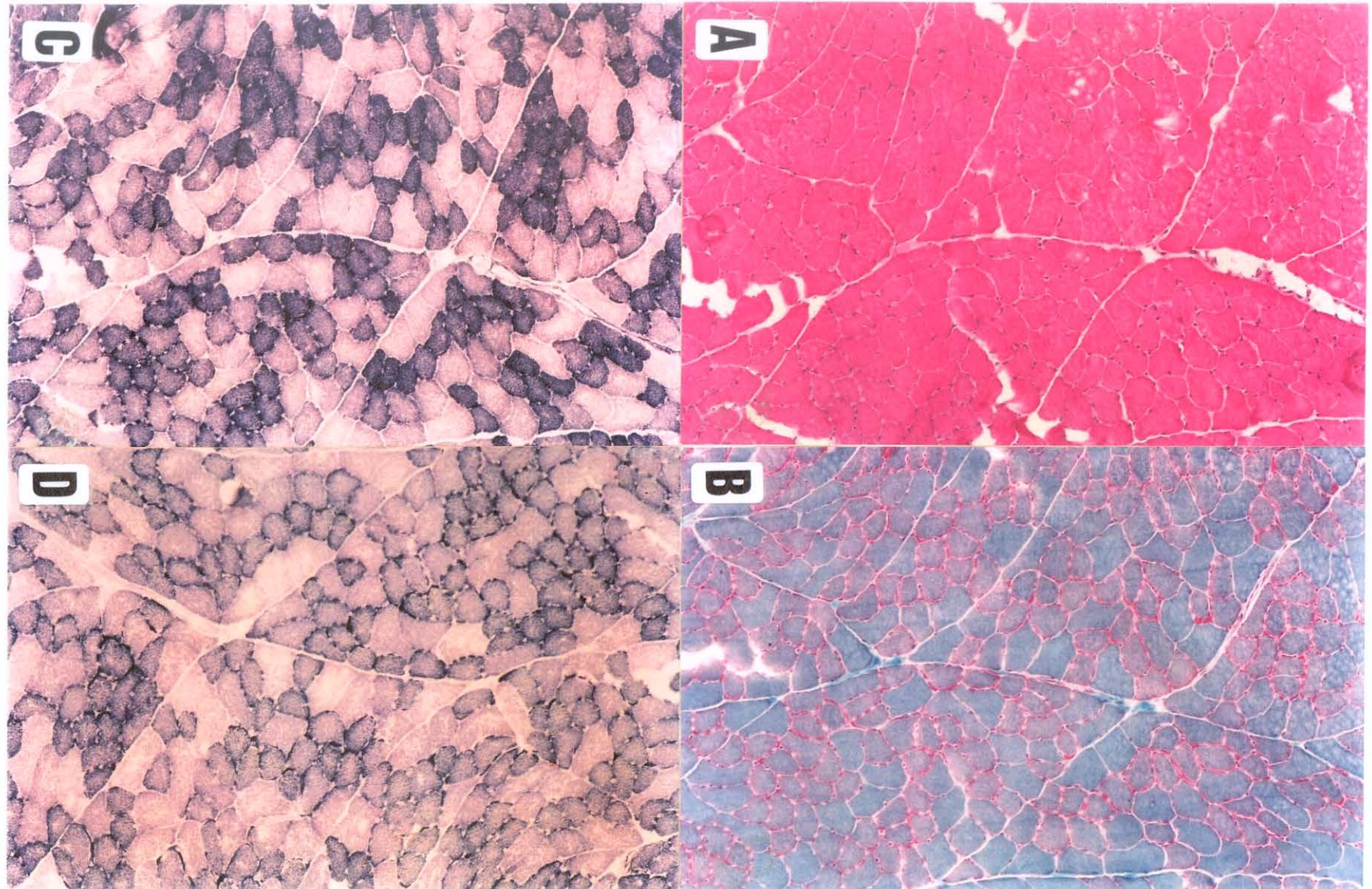
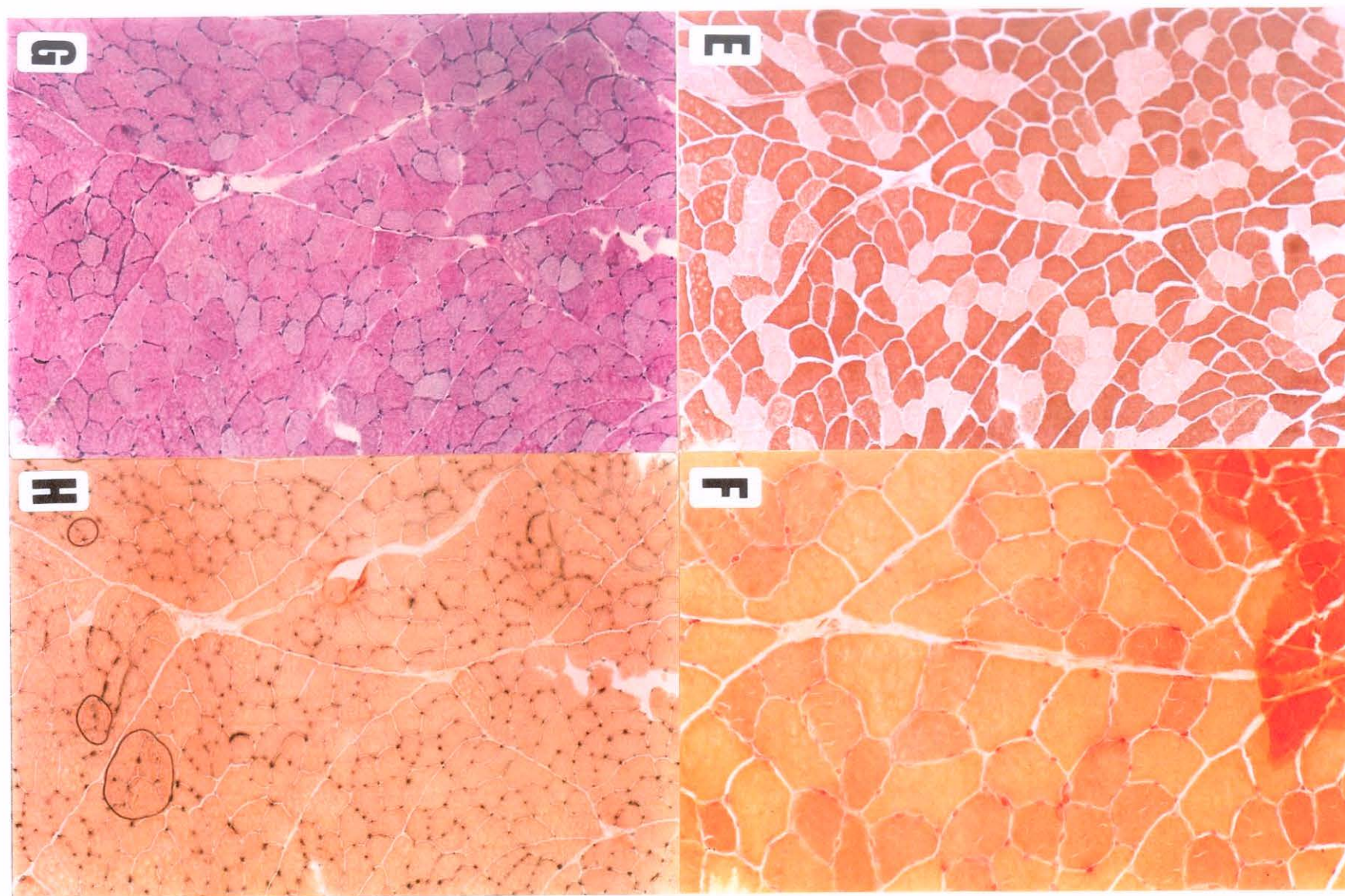


Figura 28- Trajeto do nervo frênico.

A seguir, são apresentadas fotografias das reações histoquímicas do músculo diafragma dos 10 animais.

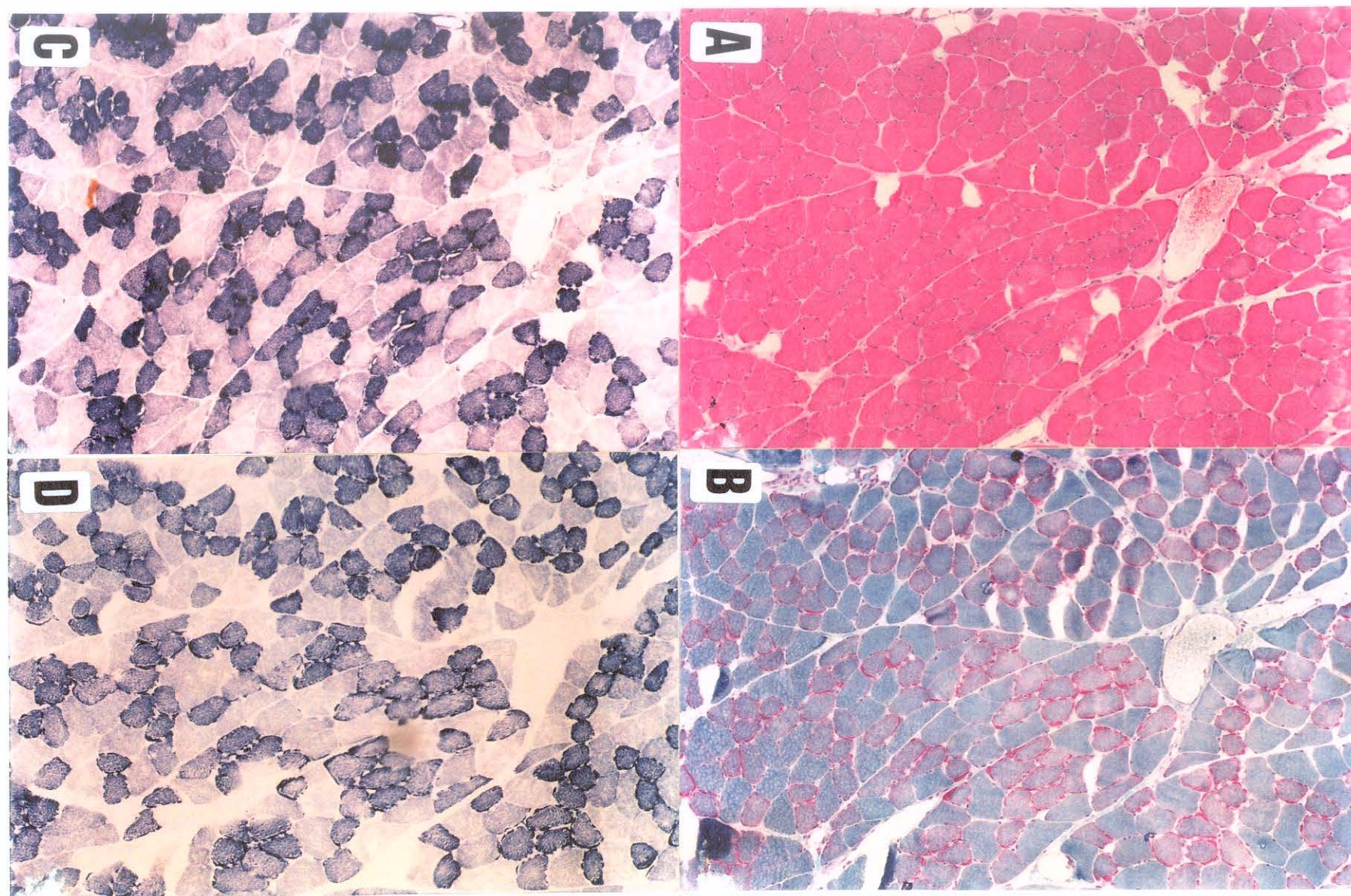


CASO I. **A** - Discreta variação no diâmetro das fibras. Núcleos sub-sarcolemais na periferia das fibras. Endomísio e permísio escassos. H E, 180x. **B** - Idem. Discreta diferenciação entre as fibras tipo I (avermelhadas) e fibras tipo II (esverdeadas). Tricômico do Gomori modificado, 180x **C** - Diferenciação entre as fibras tipo I, IIA e IIB. NADH-TR, 180x. **D** - Diferenciação entre as fibras tipo I, IIA e IIB desidrogenase succínica, 180x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.

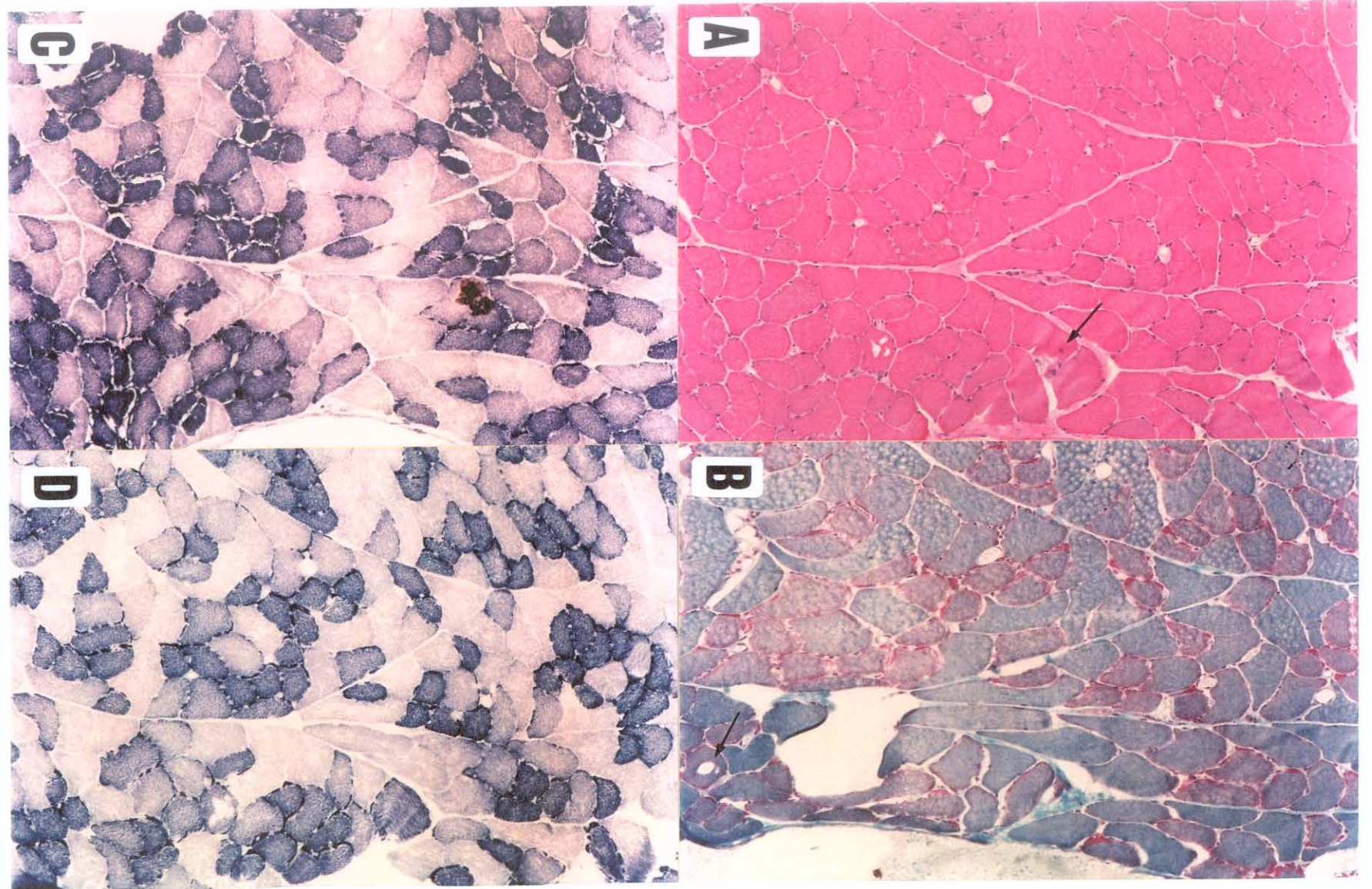


40

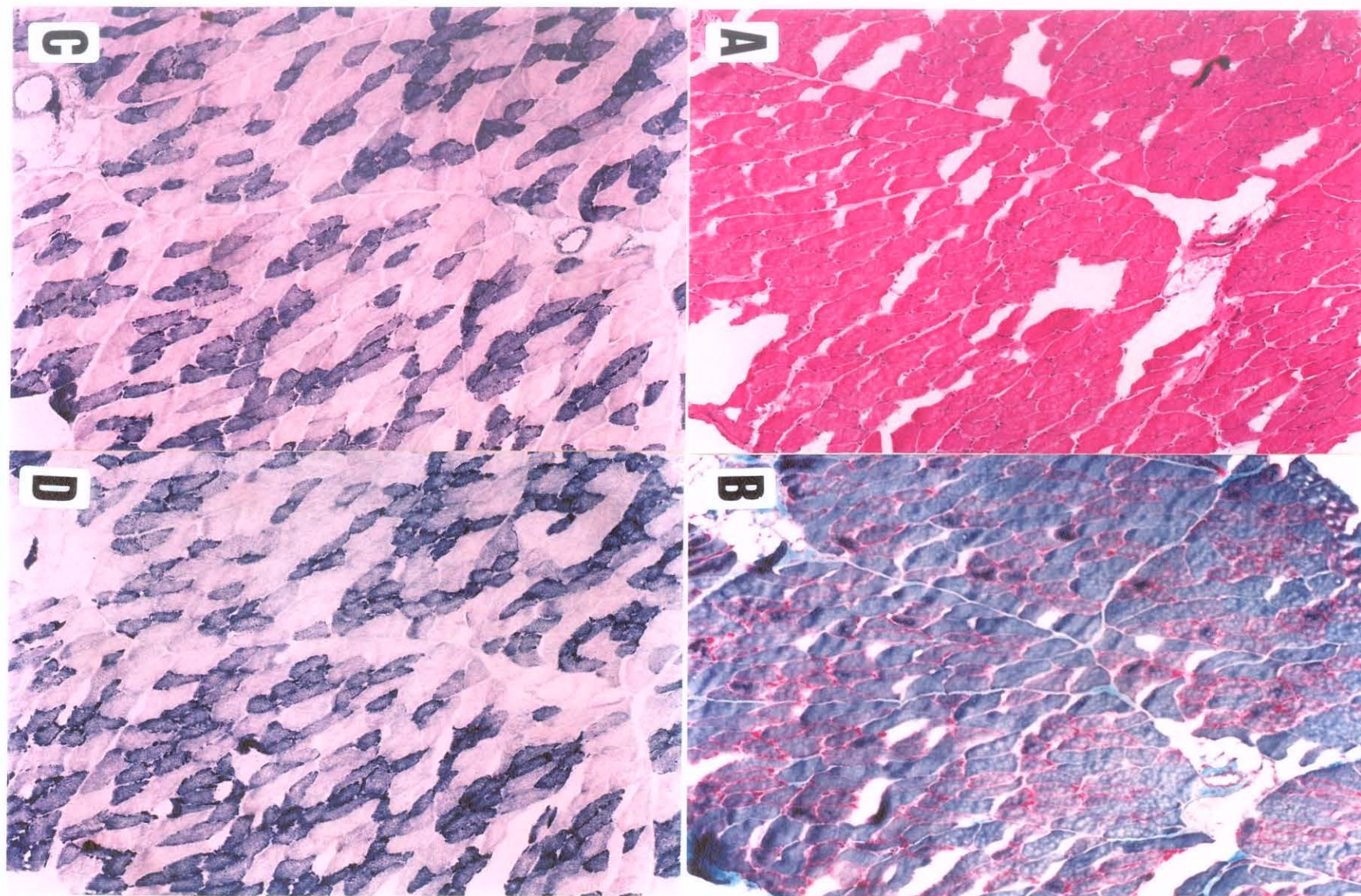
CASO I.E -Diferenciação histoquímica entre fibras tipo I, IIA e IIB. Miosina ATPase após pré-incubação em PH 10.4, 180x. **F** - Idem. Discreta diferenciação histoquímica na reação da esterase inespecífica. Esterase inespecífica, 210x. **G** - Idem. Muito discreta diferenciação histoquímica na reação do PAS. PAS, 180x. **H** - Ausência de diferenciação histoquímica na reação da fosfatase alcalina. Fosfatase alcalina, 180x. Em E, F, G e H observam-se os mesmos fascículos.



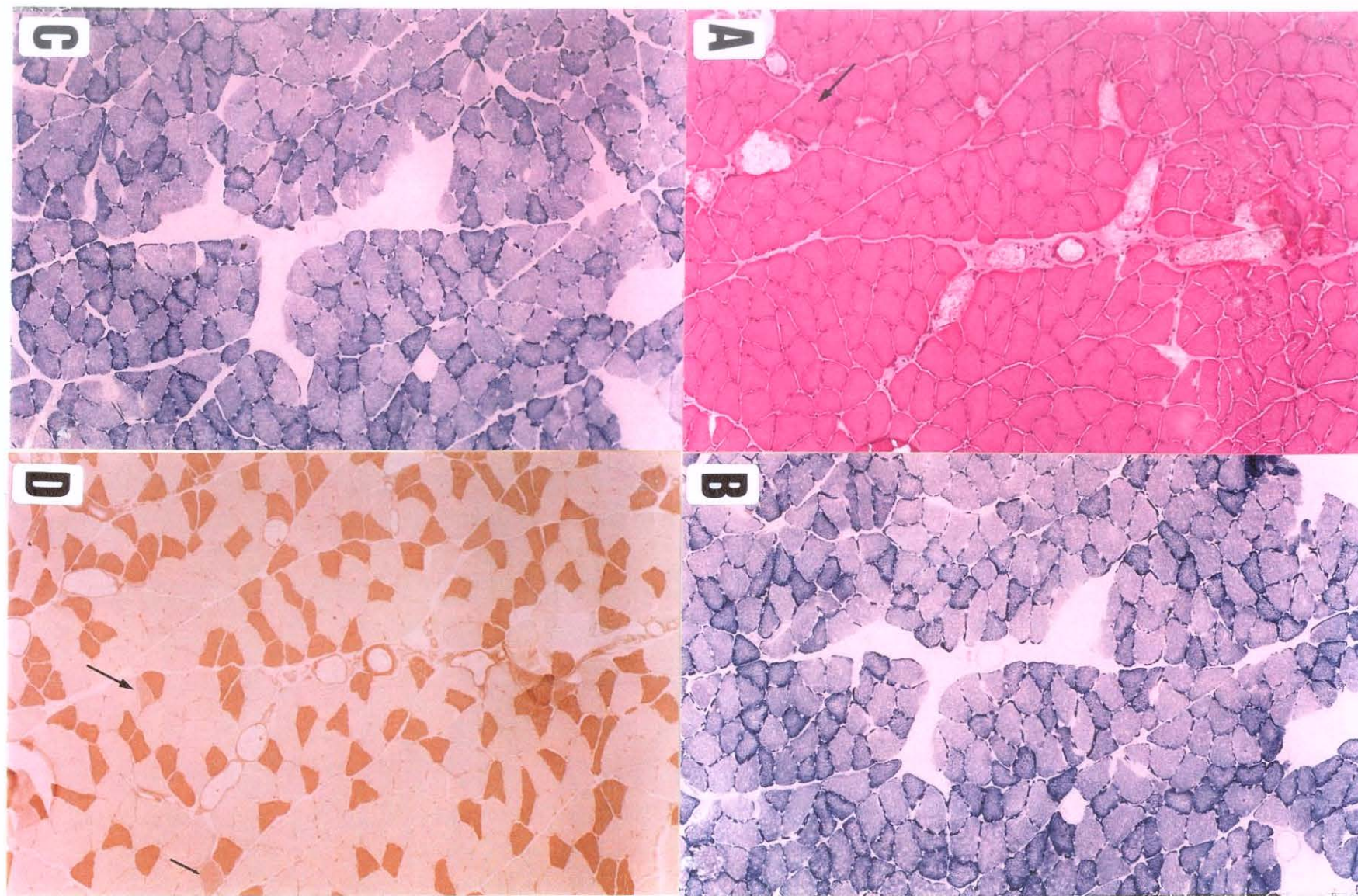
CASO II. **A** -Discreta variação no diâmetro das fibras. Núcleos sub-sarcolemais na periferia das fibras. Endomísio e perimísio mais proeminentes que no caso I, sobretudo nas adjacências do vaso. HE, 180x. **B**- Idem. Discreta diferenciação entre fibras do tipo I (avermelhadas) e fibras do tipo II (esverdeadas). Tricômico de Gomori modificado, 180x. **C** - Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. NADH-TR, 180x. **D** - Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e tipo IIB. Desidrogenase succínica, 180x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.



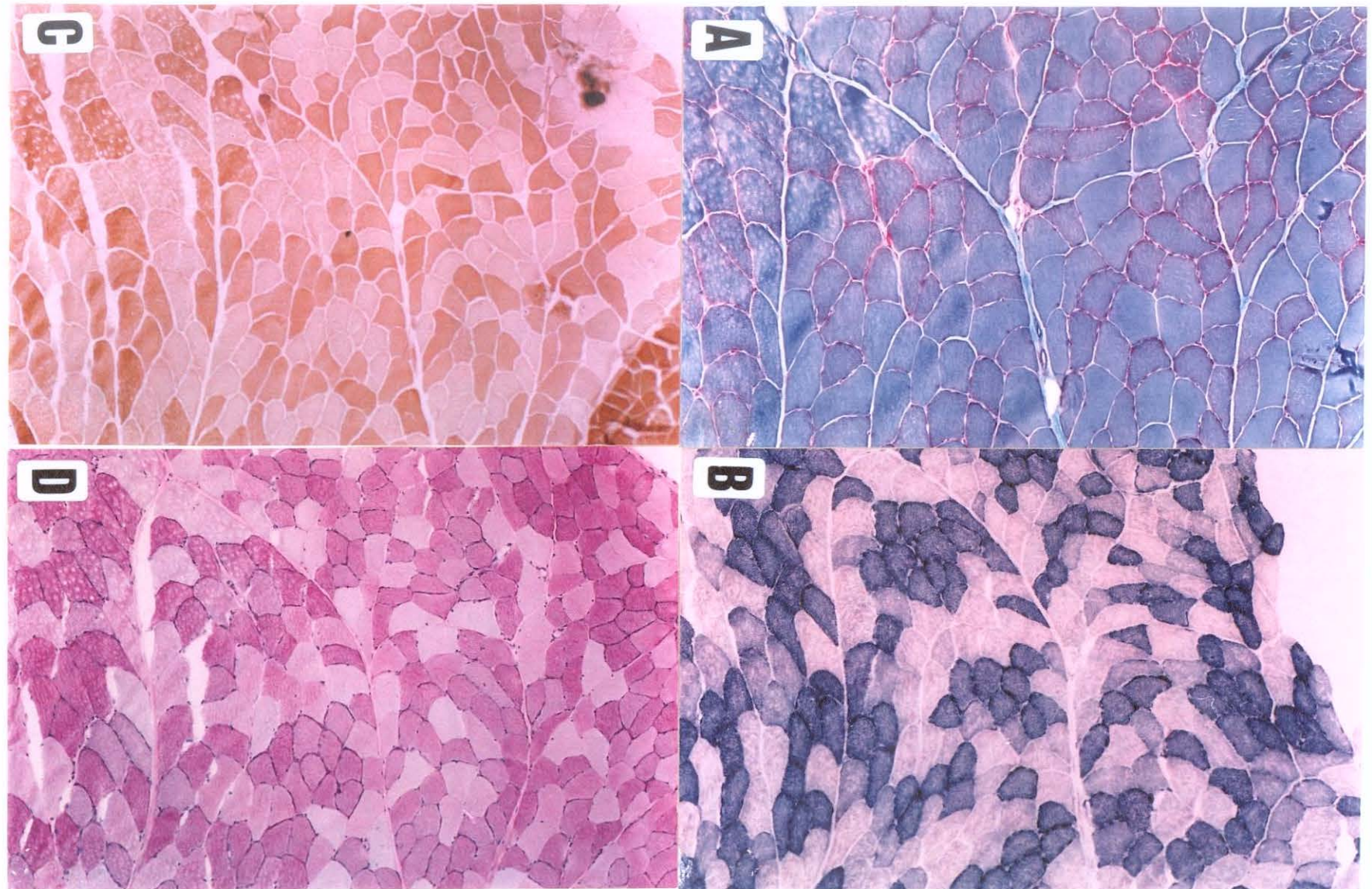
CASO III. **A-** Variação no diâmetro das fibras, mais proeminente que no caso II. Núcleos em geral subsarcolemais na periferia das fibras. Presença de raros núcleos internos (seta). HE, 180 x. **B-** Discreta diferenciação entre fibras tipo I (avermelhadas) e fibras do tipo II (esverdeadas). Uma fibra está vacuolizada (seta). Tricrômico de Gomori modificado, 210 x. **C-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. NADH-TR, 180 x. **D-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. Desidrogenase succínica, 180 x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.



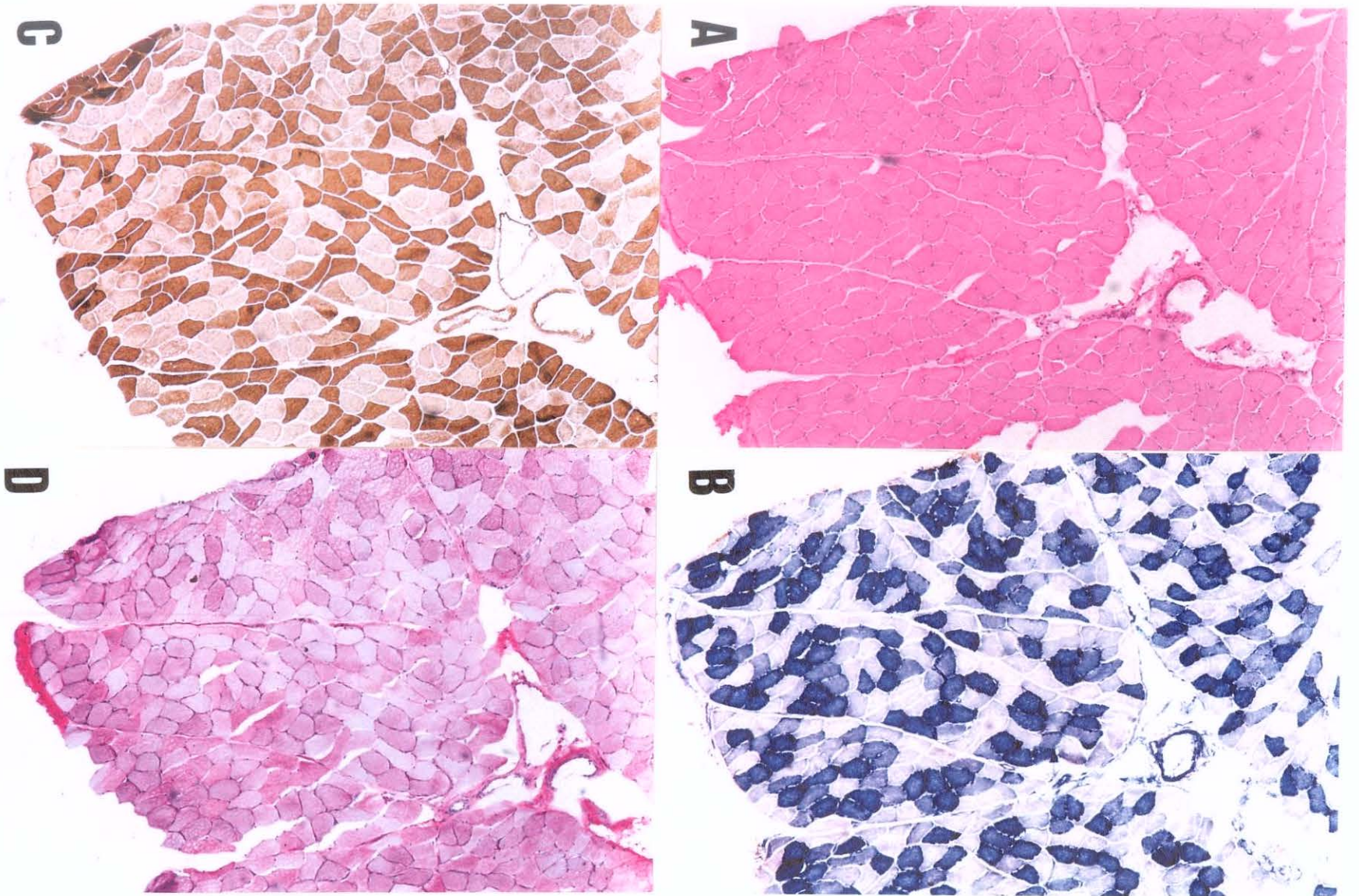
CASO IV. **A-** Variação no diâmetro das fibras. Núcleos em geral sub-sarcolemais, na periferia das fibras. HE, 180 x. **B-** Discreta diferenciação entre fibras do tipo I (avermelhadas) e fibras do tipo II (esverdeadas). Tricrômico de Gomori modificado, 180 x. **C-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. NADH-TR, 180 x. **D-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. Desidrogenase succínica, 180 x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.



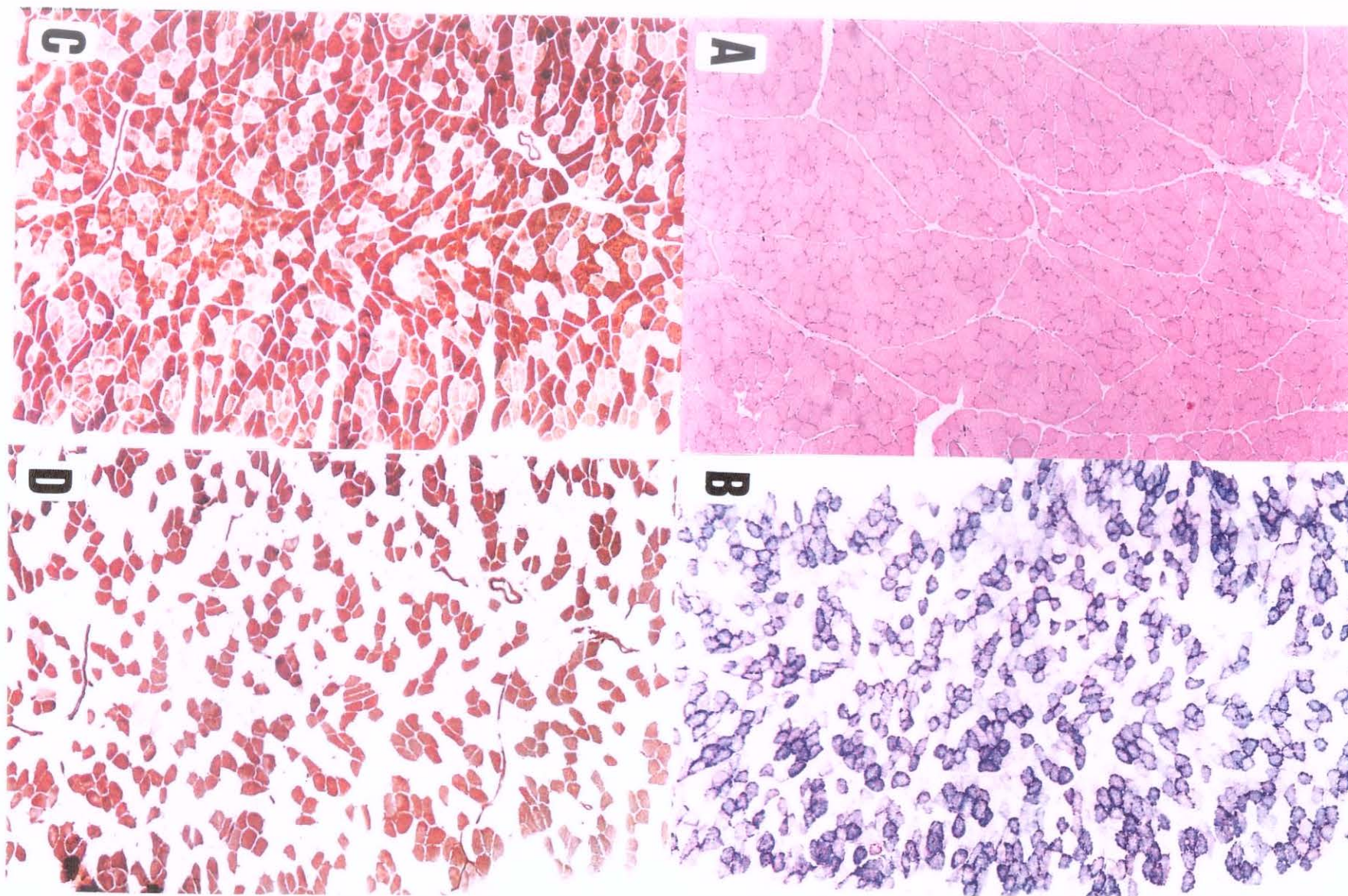
CASO V. **A-** Discreta variação no diâmetro das fibras. Raras fibras com núcleos internos (seta). HE, 180 x. **B-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. NADH-TR, 180 X. **C-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. Desdrogenase succínica, 180 x. **D-** Presença de raras fibras do tipo IIC (setas). Miosina ATPase (pH 4.3) 180 x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.



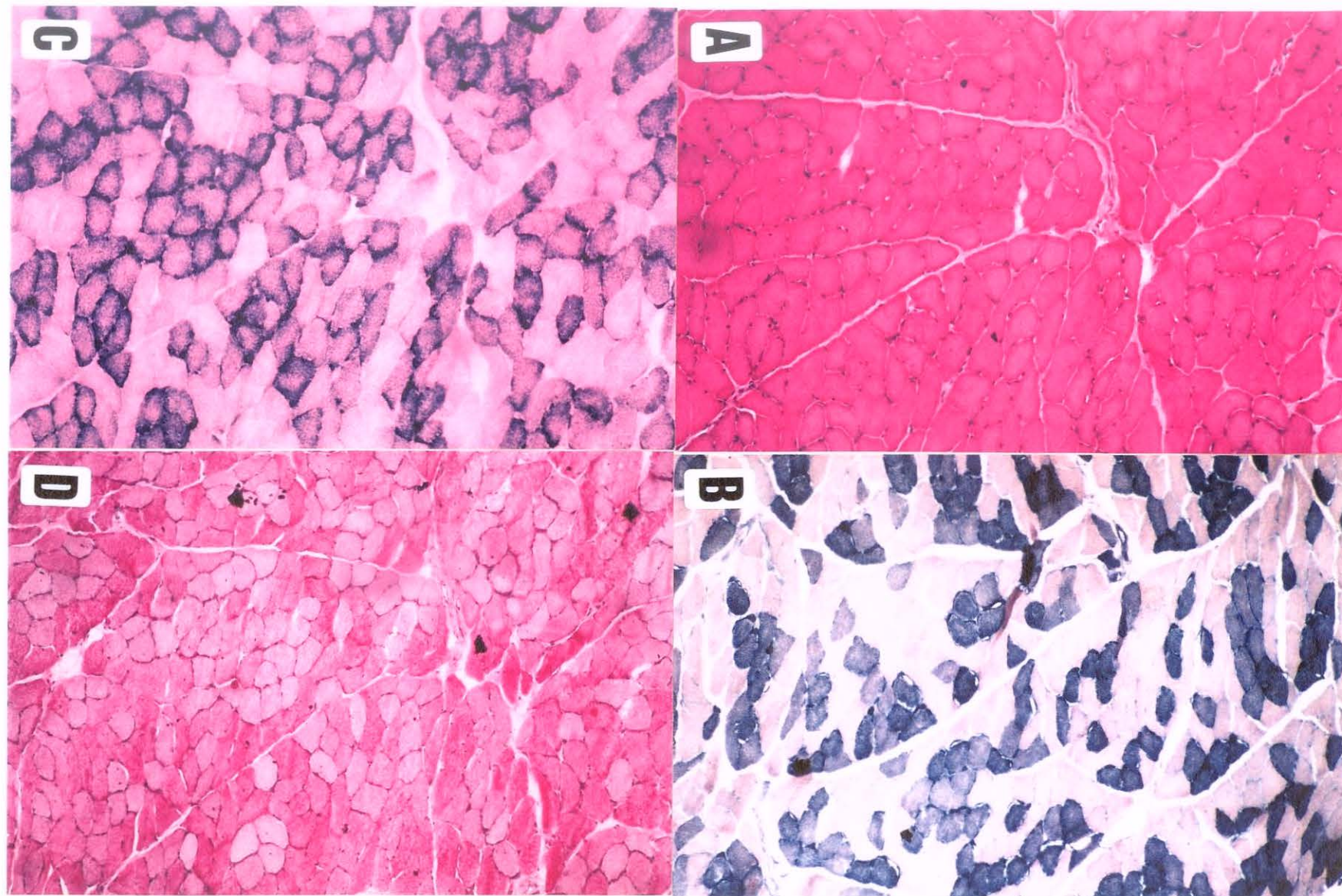
CASO VI. **A-** Discreta variação no diâmetro das fibras. Discreta diferenciação entre fibras do tipo I (avermelhadas) e fibras do tipo II (esverdeadas). Tricrômico de Gomori modificado, 210 x. **B-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. NADH-TR, 180 x. **C-** Fibras tipo I formando pequenos agrupamentos ocasionais (AG). Miosina ATPase (pH 10.4), 180 x. **D-** Diferenciação entre fibras do tipo I e II. PAS, 180 x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.



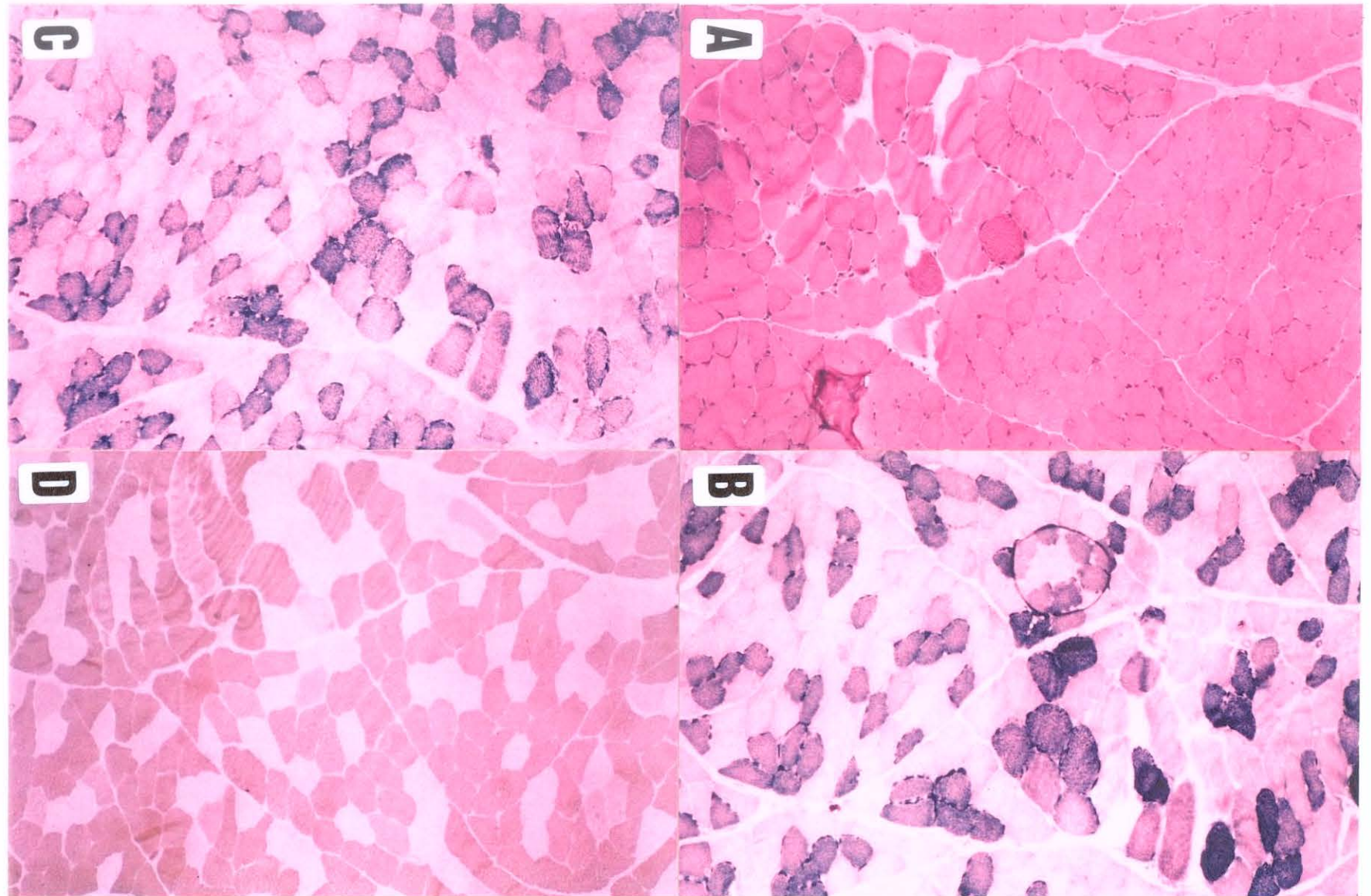
CASO VII. **A-** Discreta variação no diâmetro das fibras. Núcleos em geral sub-sarcolemais, na periferia das fibras. HE, 150 x. **B-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. NADH-TR, 150 x. **C-** Diferenciação entre fibras do tipo I e II. Miosina ATPase (pH 10.4), 150 x. **D-** Diferenciação entre fibras do tipo I e II. PAS, 150 x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.



CASO VIII. **A-** Discreta variação no diâmetro das fibras. HE, 110 x. **B-** Diferenciação entre fibras do tipo I e fibras do tipo II. NADH-TR, 110 x. **C-** Diferenciação entre fibras do tipo I e fibras do tipo II. Miosina ATPase (pH 10.4), 110 x. **D-** Diferenciação entre fibras do tipo I e fibras do tipo II. Raras fibras do tipo I C, que correspondem a menos que 1% das fibras. Miosina ATPase (pH 4.3), 110 x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.



CASO IX. **A-** Discreta variação no diâmetro das fibras. Núcleos em geral sub-sarcolemais, na periferia das fibras. HE, 150 x. **B-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. NADH-TR, 150 x. **C-** Diferenciação entre fibras do tipo I e fibras do tipo II. Miosina ATPase (pH 10.4), 150 x. **D-** Diferenciação entre fibras do tipo I e fibras do tipo II. PAS, 150 x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.



CASO X. **A-** Discreta variação no diâmetro das fibras. Núcleos em geral sub-sarcolemais, na periferia das fibras. HE, 150 x. **B-** Diferenciação entre fibras do tipo I, IIA e IIB. NADH-TR, 150 x. **C-** Diferenciação entre fibras do tipo I e fibras do tipo II. Miosina ATPase (pH 10.4), 150 x. **D-** Diferenciação entre fibras do tipo I e fibras do tipo II. Raras fibras do tipo IIC, que correspondem a menos que 1% das fibras. Miosina ATPase (pH 4.3), 110 x. Em A, B, C e D observam-se os mesmos fascículos.

Morfometria do animal 1

Fibras tipo I = 145 (59,4%)

Fibras tipo IIA = 46 (18,8%)

Fibras tipo IIB = 53 (21,7%)

Total de fibras contadas: 244

Morfometria do animal 2

Fibras tipo I= 149 (55,6%)

Fibras tipo IIA= 52 (19,4%)

Fibras tipo IIB= 67 (25%)

Total de fibras contadas: 268

Morfometria do animal 3

Fibras tipo I= 116 (55,2%)

Fibras tipo IIA= 53 (25,2%)

Fibras tipo IIB= 41 (19,5%)

Total de fibras contadas: 210

Morfometria do animal 4

Fibras do tipo I: 185 (58,7%)

Fibras do tipo IIA: 48 (15,2 %)

Fibras do tipo IIB: 82 (26 %)

Total de fibras contadas: 315

Morfometria global, dos 4 animais:

Fibras do tipo I: 595 (57,3 %)

Fibras do tipo IIA: 199 (19,2 %)

Fibras do tipo IIB: 243 (23,4 %)

Total de fibras contadas: 1037

6 - DISCUSSÃO

Davies & Gunn (1972), estudaram o diafragma de coelhos da raça *Oryctolagus cuniculus*. Utilizaram classificação de atividade enzimática diferente da que é usada por diferentes autores, porque consideraram, como do mesmo grupo enzimático, fibras com forte atividade à miosina ATPase, desidrogenase succínica e miofosforilase. Entretanto, a análise de seus gráficos, nos resultados, permite inferir que forte atividade à desidrogenase succínica foi encontrada em aproximadamente 60 % das fibras, dentre 1605 fibras estudadas, de 3 coelhos. Ou seja, segundo estes autores, haveria aproximadamente 60 % de fibras do tipo I no diafragma do coelho. Nossos achados de 57 % de fibras do tipo I, são semelhantes aos destes autores.

Hoar & Kerrick (1979), estimaram cerca de 40 a 44 % de fibras do tipo I no diafragma de coelhos da raça neozelandesa branca, mas seus métodos de ativação pelos cátions bivalentes estrôncio e cálcio, não são propriamente histoquímicos, de modo a fornecer produtos visíveis à microscopia óptica, como foi feito neste trabalho.

Green et al (1984), encontraram 40,2 % de fibras do tipo I no diafragma de coelhos da raça neozelandesa branca, sendo que não especificaram o sexo e a idade dos animais utilizados. Nossa diferente cifra de 57 % de fibras do tipo I, deve-se provavelmente a estudo em raça diferente e, talvez, sexo e idades diferentes.

Le Souëf et al (1984), encontraram 43,2 % de fibras do tipo I em coelhos adultos neozelandeses brancos, mas não forneceram o sexo dos animais pesquisados. Nossos achados de 57 % de fibras do tipo I provavelmente estão relacionados a estudo em raça diferente (Norfolk inglesa) e, talvez, sexo diferente, porque padronizamos o feminino.

Kilarski & Sjöström (1990), encontraram, na região torácica do diafragma de uma coelha da raça belga de 1 ano de idade, de 4,6 Kg de peso, 18 % de fibras do tipo I. A proporção mais elevada de fibras do tipo I que encontramos (57%), deve-se provavelmente a diferenças interracialais, porque os pesos das coelhas utilizadas nesta pesquisa variaram de 2,8 a 3,1 Kg. Além disto, foram utilizadas 10 coelhas, enquanto aquela cifra de 18 % provém de um único animal.

Analisando-se os poucos trabalhos existentes na literatura sobre o assunto, verifica-se grande variabilidade de proporção de fibras do tipo I no músculo diafragma do coelho de um para outro autor, de 18% (Kilarski & Sjöström, 1990), 40,2 % (Green et al, 1984), 43,2 % (Le Souëf et al, 1988) e cerca de 60 % (Davies & Gunn, 1972).

A proporção de 57,3 % fibras do tipo I no diafragma do coelho, encontrada neste trabalho, dentre 1037 fibras analisadas, é esperada porque o diafragma é músculo de atividade contínua, desde o nascimento até a morte, em qualquer espécie animal que o possui. Como apresenta atividade contínua na respiração durante toda a vida do animal, deve, necessariamente, possuir alta proporção de fibras do tipo I, com alto teor de mitocôndrias, resistentes à fadiga.

Pensamos que nosso trabalho traz pequena contribuição original a esta área da neurobiologia, ao propor 57,3 % de fibras do tipo I para a porção costal do músculo diafragma de coelhos da raça Norfolk inglesa.

7 – CONCLUSÕES

- 1 - A proporção de fibras do tipo I na região costal do músculo diafragma de coelhas da raça Norfolk inglesa é de 57,3 %;
- 2 - A proporção de fibras do tipo IIA e IIB é, respectivamente, 19,2 e 23,4 %;
- 3 - A proporção obtida de 57,3 de fibras do tipo I no diafragma é esperada, mas não está descrita na bibliografia consultada.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIANO, M.A.; ARMSTRONG, R.B.; EDGERTON, V.R. Hindlimb muscle fiber population of five mammal. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **21** (1): 51-55, 1973.

BARNARD, R.J.; EDGERTON, V.R.; FURUKAWA, T.; PETTER, J.B. Histochemical, biochemical, and contractile properties of white, and intermediate fibers. *American Journal of Physiology*, **220** (2): 410-414, 1971.

BROOKE, M.H. & KAISER, K.K. Muscle fiber types: How many and what kind? *Archives of Neurology*, **23**: 369-379, 1970.

BULLARD, H.H. Histological as related to physiological and chemical differences in certain muscles of the cat. *John Hopkins Hospital Reports*, **18**: 323-328, 1919.

BURKE, R.E.; LEVINE, D.N.; TSAIRIS, P.; ZAJAC, F.E. Physiological types of histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *Journal of Physiology*, **234**: 723-748, 1973.

- COBB, A.B.; SHUTT, A.W.J.; HERMANSON, J.W. Morphological, histochemical, and myosin isoform analyses of the diaphragm of adult horses, *equus caballus*. *The Anatomical Record*, **238**: 317-325, 1994.
- CRAIGIE, E.H. Practical Anatomy of the Rabbit. 8th ed, Toronto University Press, Toronto, 1948. p. 337-338.
- DAVIES, A.S. & GUNN, H.M. Histochemical fibre types in the mammalian diaphragm. *Journal of Anatomy*, **112**: 41-60, 1972.
- DE TROYER, A.; SAMPSON, M.; SIGRIST, S.; MACKLEM, P.T. The diaphragm: two muscles. *Science*, **213**: 237-238, 1981.
- DUBOWITZ, V. & BROOKE, M.H. *Muscle biopsy: a modern approach*. London: W.B. Saunders, 1973.
- DUBOWITZ, V.; SEWRY, C.A.; FITZSIMONS, R.B. *Muscle Biopsy. A Practical Approach*. 2 ed. London, Baillière Tindall, 1985. p. 41-81.

- ENGEL, W.K. Fiber-type nomenclature of human skeletal muscle for histochemical purposes. *Neurology*, 344-348, 1974.
- FARKAS, G.A. & ROCHESTER, D.F. Functional characteristics of canine costal and crural diaphragm. *Journal of Applied Physiology*, **65**(5): 2253-2260, 1988.
- FOWLER, M.E. Zoo & Wild Animal Medicine. Current Therapy. Philadelphia, WB Saunders, 1993. Vol. 3, p. 25.
- GAUTHIER, G.F. & PADYKULA, H.A. Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*, **28**: 333-354, 1966.
- GREEN, H.J.; REICHMANN, H.; PETTE, D. Inter and intraspecies comparisons of fibre type distribution and of succinate dehydrogenase activity in type I, IIA and IIB fibres of mammalian diaphragms. *Histochemistry*, **81**: 67-73, 1984.

- GUTH, L.& SAMAHA, F.J. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Experimental Neurology*, **25**: 138-152, 1969.
- HICKMAN, J.; HOULTON, J.E.F.; EDWARDS, B. An Atlas of Veterinary Surgery. 3rd ed. Oxford, Blackwell Science, 1995. p. 126-127.
- HOAR, E.P.& KERRICK, W.G.L. Rabbit diaphragm: two types of fibres determined by calcium strontium activation and protein content. *The Journal of Physiology*, **295**: 345-352, 1979.
- KILARSKI, W. & SJÖSTRÖM, M. Systematic distribution of muscle fibre types in the rat and rabbit diaphragm: a morphometric and ultrastructural analysis. *Journal of Anatomy*, **168**: 13-30, 1990.
- LE SOUËF, P.; ENGLAND, S.J.; STOGRYN, H.A.F.; BRYAN, C. Comparison of diaphragmatic fatigue in newborn and older rabbits. *Journal of Applied Physiology*, **65**(3): 1040-1044, 1988.

LIEBERMAN, D.A.; FAULKNER, J.A; CRAIG, A B.; MAXWELL, L.C.

Performance and histochemical composition of guinea pig and human diaphragm. *Journal of Applied Physiology*, **34**(2): 233-237, 1973.

METZGER, J.M.; SCHEIDT, K.B.; FITTS, R.H. Histochemical and

physiological characteristics of the rat diaphragm. *The Journal of Applied Physiology*, **58**: 1083-1091, 1985.

NACHMIAS, V.T.& PADYKULA, H.A. A Histochemical study of normal and

denervated Red and white muscles of the rat. *Journal of Biophysics and Biochemical Cytology*, **4**: 47-54, 1958.

NISHIYAMA A. Histochemical studies on the red and white and intermediate

muscle fibers of some skeletal muscles. III- Histochemical demonstration of oxidative enzymes, phosphorylase and glycogen in respiratory muscle fibers. *Acta Medica Okayama*, **20**: 137-146, 1966.

OGATA, T. A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part I:

Activity of the succinoxidase system in muscle fibers. *Acta Medica Okayama*, **12**: 216-227, 1958a.

OGATA, T. A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part II:

Activity of the cytochrome oxidase in muscle fibers. *Acta Medica*

Okayama, 12:228-232, 1958b.

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 Medica*

Okayama, 12: 233-240, 1958c.

ORTON, E.C. Small Animal Thoracic Surgery. Baltimore, Williams & Wilkins, 1995. p. 169.

PEARSE, A.G.E. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. 14 ed. London, Churchill-Livingstone, 1980.

PETER, J.B.; BARNARD, R. J.; EDGERTON, B.R.; GILLESPIE, C.A.;

STEMPEL, K.E. Metabolic Profiles of Three Fiber Types of Skeletal Muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 11(14): 2627-2633, 1972.

RANVIER (1874), citado por Dubowitz & Brooke, 1973.

RILEY, D.A. & BERGER, A.J. A regional Histochemical and Electromyographic Analysis of the Cat Respiratory Diaphragm. *Experimental Neurology*, **66**: 636-649, 1979.

SLATTER, D. Textbook of Small Animal Surgery. 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1993. Vol. 1, p. 455-470.

STEIN J.M.& PADYKULA, H. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *American Journal of Anatomy*, **110**: 103-124, 1962.

WERNECK, L.C. O valor da biópsia muscular em neurologia. Análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica. *Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica*, **X** (edição especial): 2-24, 1981.

YELLIN, H. & GUTH, L. The histochemical classification of muscle fibers. *Experimental Neurology*, **26**: 424-432, 1970.

YELLIN, H. Differences in histochemical attributes between diaphragm and hindleg muscles of the rat. *Anatomical Records*, **173**: 333-340, 1972.