

EFEITO DO ETANOL SOBRE O MÚSCULO DIGÁSTRICO DE RATOS (*RATTUS NORVEGICUS*): UMA AVALIAÇÃO HISTOENZIMOLÓGICA

Jesus Carlos Andreo⁴

Nícolas Bertolaccini dos Santos¹

Luis Henrique Rapucci Moraes¹

Matheus Bermejo Andreo²

Thiago Bermejo Andreo²

Camile Bermejo Andreo³

Antonio de Castro Rodrigues⁴

¹Curso de Ciências
Biológicas da
Universidade
do Sagrado
Coração – USC.

²Curso de
Fisioterapia da
Universidade do
Sagrado
Coração – USC.

³Curso Medicina
Veterinária da
Universidade de
Marília – UNIMAR.

⁴Professor Livre
Docente – Curso de
Pós-Graduação em
Biologia Oral – USC.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

RESUMO

Estima-se que entre 1 milhão de adultos do hemisfério ocidental, 20.000 tenham anomalias nos músculos esqueléticos como consequência da ingestão de álcool. Estudos revelam que nestes casos ocorre uma fraqueza progressiva, afetando predominantemente os músculos da coxa, ombro e quadris, e uma atrofia das fibras do tipo II ou de contração rápida. Na literatura consultada não foi observado relato do que acontece com os músculos da mastigação, por isso este estudo foi desenvolvido com o intuito de observar se as fibras de contração rápida do músculo digástrico apresentam alterações semelhantes às que ocorrem nos músculos do tronco e membros. Para tanto, amostras dos músculos digástrico e reto do abdome foram retiradas de cinco animais de cada grupo Controle (C), Alcoolizado (A) e Isocalórico (I). As amostras foram submetidas às reações de m-ATPase (com pré-incubações ácida e alcalina) e NADH-TR, para a classificação das fibras de acordo com os resul-

Recebido em: 10/12/03.

Aceito em: 04/03/04.

tados obtidos nestas reações em FG (fast-twitch-glycolitic), FOG (fast-oxidative-glycolitic) e SO (slow-oxidative). Os resultados mostraram uma diferença significativa, na área das fibras dos tipos FG e FOG, entre os grupos estudados no músculo digástrico e na área das fibras do tipo FG no músculo reto do abdome; uma diferença significativa na frequência das fibras dos tipos FG e FOG no músculo reto do abdome. Baseando-se nestes resultados, é possível concluir que o etanol produz uma atrofia nas fibras de contração rápida dos músculos da mastigação, semelhante à dos músculos do tronco, mas com um coeficiente de atrofia diferente.

PALAVRAS-CHAVE: tipos de fibras; músculos da mastigação; músculo digástrico; alcoolismo; rato

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

INTRODUÇÃO

Os efeitos severos produzidos pela ingestão abusiva do álcool sobre os músculos estriados foram descobertos há, no mínimo, um século e meio, no entanto, até trinta anos atrás havia somente esporádicos estudos específicos nessa área. Entretanto, pesquisas sistemáticas no Reino Unido e, posteriormente, na Espanha mostraram que tal miopatia era comum (PREEDY et al., 2001).

Estima-se que entre 1 milhão de adultos do hemisfério ocidental, 20.000 tenham anomalias nos músculos esqueléticos como consequência do uso de álcool (REILLY et al., 1995). Deve-se lembrar, ainda, que a incidência desta doença é similar em mulheres e homens (URBANO-MÁRQUESZ et al., 1995), e que a estimativa desta doença depende dos parâmetros usados no diagnóstico, pois existem muitos casos sub-clínicos, dos quais a maioria não é identificada pelos critérios comuns. Nesses casos, os pacientes apresentam apenas uma diminuição na força muscular, em alguns até apresentando algum grau de atrofia muscular, mas sem sintomas clínicos (URBANO-MÁRQUESZ et al., 1989; SACANELLA et al., 1995).

Estudos feitos para a observação do efeito do álcool na musculatura estriada têm sido realizados em músculos do tronco e dos membros e nestes a miopatia alcoólica tem se caracterizado por uma atrofia seletiva das fibras do tipo II. Os pesquisadores observaram que as fibras do tipo I são minimamente afetadas e podem apresentar uma hipertrofia compensatória em alguns casos, embora a atrofia de fibras do tipo I sempre aconteça nos casos mais severos de ingestão de álcool (PREEDY et al., 1999).

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

Salisbury et al. (1992) observaram que o etanol causa um processo de miopatia específica em ratos, afetando seletivamente as fibras do tipo II. Segundo esses autores, tais alterações correlacionam-se bem com as anormalidades observadas em miopatias alcoólicas crônicas em humanos.

Durante algum tempo, os dados obtidos sobre a histoenzimologia dos músculos dos membros e tronco foram extrapolados para os músculos da mastigação, mas logo os pesquisadores notaram que existiam algumas diferenças entre eles (MAO et al., 1992; TUXEN et al., 1992), como por exemplo, a presença nos músculos mandibulares, de fascículos inteiros ou grande quantidade de fibras do mesmo tipo histoquímico dentro do mesmo fascículo. Um achado semelhante a este nos músculos dos membros sugere uma desnervação seguida por reinervação (DUBOWITZ; BROOKE, 1973).

Considerando-se o exposto acima, resolveu-se realizar este trabalho no músculo digástrico de ratos com o objetivo de observar: a frequência e o tamanho dos tipos de fibras histoenzimológicas encontrados neste músculo, e se o etanol produz alguma alteração na área ou frequência destes tipos de fibras.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus*) machos e adultos (com aproximadamente três meses de idade, da linhagem Wistar, com peso médio de 200 g, fornecidos pelo Biotério da Universidade de São Paulo – Campus de Bauru – SP).

Após a idade de 90 dias, os ratos foram criados individualmente em gaiolas metabólicas para serem controlados o consumo diário de ração, líquido ingerido e peso dos animais. A sala teve iluminação artificial comandada por “timer”, que controlou o ciclo claro/escuro de 12 horas, exaustor e ar condicionado, com temperatura média de 21° C, controlada por um termômetro de temperatura ambiente da marca Incoterm.

Os animais foram separados em 3 grupos, de cinco animais cada um, da seguinte maneira:

- Grupo Controle Normal (N): animais que receberam água como dieta líquida.
- Grupo Controle Nutricional Pareado – isocalórico (I): animais que receberam água com sacarose como dieta líquida.
- Grupo Alcoolizado (A) – alcoolismo crônico: animais que receberam a mistura de álcool etílico 25% diluído com água.

O modelo de alcoolismo usado foi o “semi-voluntário”, onde a administração de álcool diluído era feita como único alimento líquido disponível ao animal.

O grupo alcoolizado (A) foi submetido a um período de adaptação gradativa ao álcool a 6%, 15% e 25%, semanalmente, para evitar sua morte (CAGNON, 1993).

O álcool utilizado nesta pesquisa foi o etílico absoluto, do laboratório MERCK.

Grupo Controle Nutricional Pareado – isocalórico – (I) – estes animais receberam diariamente a média (ração e líquido) ingerida pelos animais do grupo alcoolizado do dia anterior. Neste grupo o tratamento foi iniciado um dia após o do alcoolizado, para que a quantidade de álcool e ração do grupo alcoolizado fosse conhecida e a dieta de sacarose pudesse ser calculada (da SILVA, 1987).

Grupo Controle Normal – (N) – os animais deste grupo receberam água e ração ad libitum.

Os animais dos três grupos receberam sempre a mesma dieta sólida (ração Nuvilab CR 1, da NUVITAL), durante todo o experimento.

Após o período de tratamento, 120 dias, os animais foram sacrificados para retiradas das amostras, sempre da região média do ventre, dos músculos digástrico e reto do abdome, para evitar a variabilidade intramuscular, baseando-se no trabalho de Hiimae (1971). Este último músculo foi usado como controle, uma vez que o efeito do etanol sobre os músculos do tronco é conhecido.

Para a retirada das amostras musculares, os animais foram anestesiados com uma dose inicial de 30 mg/kg de pentobarbital (Hypnol), via intra-peritoneal. A seguir, para sacrifício dos animais, foi feita uma dosagem complementar de 70 mg/kg. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Sagrado Coração (USC) de 19/09/2002.

Das amostras retiradas foram obtidos vários cortes com 10 mm de espessura, transversais ao eixo longitudinal das fibras, os quais foram submetidos às reações de m-ATPase, (com pré-incubações ácida e alcalina), seguindo a metodologia de Werneck (1981) e a NADH-Diaforase, de acordo com Pearse (1968) e modificada por Dubowitz e Brooke (1973).

As fibras foram classificadas de acordo Peter et al., (1972) em FG, FOG e SO.

Vários campos das lâminas obtidos com as reações m-ATPase (em pH alcalino e ácido) e NADH-TR, em uma escala micrométrica ZEISS, foram fotografadas com um aumento de 10 vezes em um microscópio OLYMPUS, modelo B-MAX 50 III, e copiadas por meio de uma impressora Olympus, modelo P-330N.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

A identificação e classificação das fibras musculares foi feita através das cópias das lâminas submetidas às reações de NADH-Diaforase e ATPase em pH alcalino e ácido.

Os campos microscópicos foram escolhidos ao acaso, e o número de fibras identificadas e classificadas foi de 300. O número de fibras que tiveram a área calculada foi 40 de cada tipo, para cada lâmina, de cada músculo e de cada animal.

O cálculo da área foi realizado com auxílio de sistema de análise de imagem, modelo Image-Pro Plus versão 4.1 acomodado a um microcomputador Pentium III.

Os dados obtidos relacionados à frequência e à área dos diferentes tipos de fibras foram submetidos à análise de variância para a observação de diferença significativa entre os grupos e músculos estudados. Aplicou-se o Teste Tukey, para identificar as diferenças, nos locais em que a análise acusou diferença significativa (SNEDECOR; COCHRAN, 1980).

RESULTADOS

O peso dos animais, no início do experimento e no momento do sacrifício, e o ganho de peso estão representados na TABELA 1.

TABELA 1 – Peso médio dos animais (g) no início do experimento e no momento do sacrifício, e ganho de peso (%) nos grupos N, A e I.

	Normal		Alcoolizado		Isocalórico	
	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp
Peso Inicial	271,2	28	258,3	18,6	276,68	27,2
Peso Final	413,9	39	282,5	48,4	345,88	28,3
Ganho de Peso em %	53,3	14,8	9,36	18	25,4	9,8

Dp – desvio padrão

A quantidade de calorias ingerida diariamente pelos grupos está representada na TABELA 2.

TABELA 2 – Média das calorias ingeridas (Kcal) diariamente pelos animais dos grupos N, A e I.

	Normal – N		Alcoolizado – A		Isocalórico - I	
	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp
Ração Ingerida	23,36	1,43	10,49	1,53	9,34	1,57
Calorias Produzidas	63,97		28,80		25,69	
Líquido Ingerido	49,65	4,82	22,84	3,70	21,41	4,03
Calorias produzidas			32,44		30,71	
Total de Calorias	63,97		61,24		56,4	

Dp – desvio padrão

O balanço do nitrogênio calculado através das fezes e urina dos animais acusou os seguintes valores: Grupo N = 1,24, Grupo A = - 3 e Grupo I = -3,5

O exame de sangue acusou presença de álcool apenas nos elementos do grupo A, numa média de 0,221 g/l de sangue (índice para humanos).

As fibras dos músculos digástrico e reto do abdome reagiram de forma semelhante em todos os grupos estudados, esses resultados estão na TABELA 3.

TABELA 3 – Resultados das reações de m-ATPase e NADH-Tr a que foram submetidas as amostras dos músculos digástrico e reto do abdome dos grupos N, A e I.

Fibras	m-ATPase	m-ATPase	m-ATPase	NADH-Tr
	pH 10,6	pH 4,6	pH 4,45	
	Figura 1	Figura 2	Figura 3	Figura 4
Tipo FG	+++	++	+	+
Tipo FOG	+++	+	+	++
Tipo SO	+	+++	+++	+++

+ reatividade fraca ++ reatividade média +++ reatividade intensa

Baseando-se nos resultados das reações, é possível dizer que as fibras do músculo digástrico apresentam as seguintes características:

– tipo FG – reatividade intensa nas reações de m-ATPase com pré-incubação em pH 10,6 (FIGURA 1), reatividade média na rea-

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

ANDREO, Jesus
Carlos et al.
Efeito do etanol
sobre o músculo
digástrico de ratos
(*Rattus norvegicus*):
uma avaliação
histoenzimológica.
Salusvita,
Bauru, v. 23, n. 3,
p. 355-370, 2004.

ção de m-ATPase com pré-incubação em pH 4,6 (FIGURA 2) e fra-
ca reatividade nas reações de m-ATPase com pré-incubação em pH
4,45 (FIGURA 3) e NADH-Tr (FIGURA 4);

– tipo FOG – reatividade intensa nas reações de m-ATPase com
pré-incubação em pH 10,6 (FIGURA 1), reatividade fraca na reação
de m-ATPase com pré-incubações em pH 4,6 (FIGURA 2) e pH 4,45
(FIGURA 3) e reatividade média no NADH-Tr (FIGURA 4);

– tipo SO – fraca reatividade na reação de m-ATPase com pré-
incubação em pH 10,6 (FIGURA 1) e reatividade intensa nas de-
mais reações (FIGURAS 2, 3 e 4).

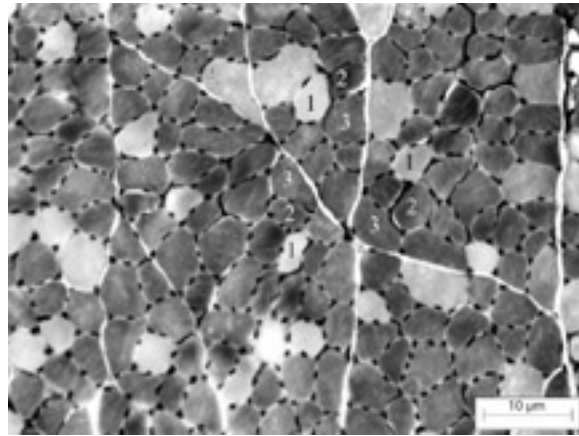


FIGURA 1 – Músculo Digástrico submetido à reação de m-ATPase alcalina
(ph 10.6). 1 = fibra SO; 2 = fibra FOG e 3 = fibra FG.

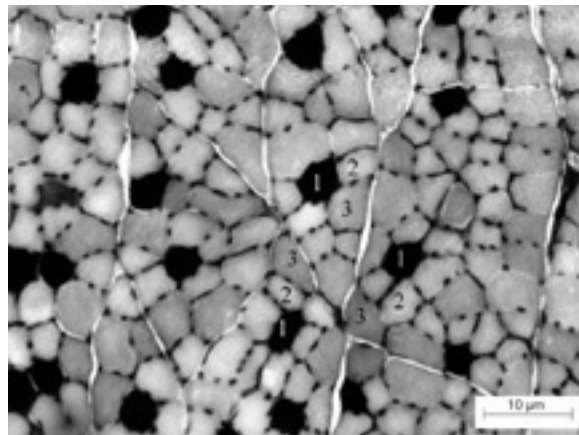


FIGURA 2– Músculo Digástrico submetido à reação de m-ATPase ácida (ph 4,6).
1 = fibra SO; 2 = fibra FOG e 3 = fibra FG.

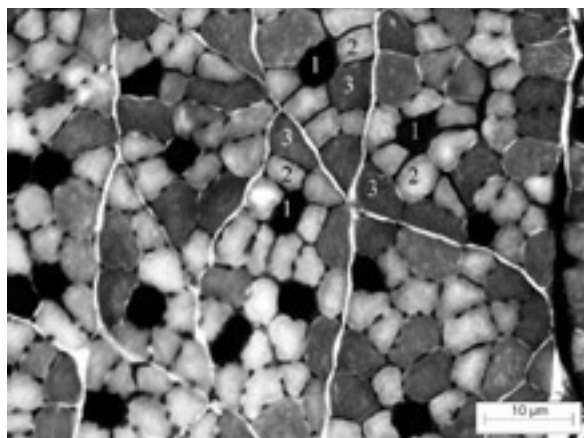


FIGURA 3 – Músculo Digástrico submetido à reação de m-ATPase ácida (ph 4,45). 1 = fibra SO; 2 = fibra FOG e 3 = fibra FG.

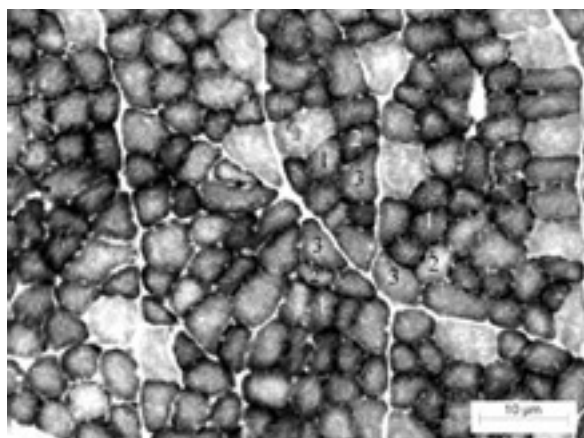


FIGURA 4 – Músculo Digástrico submetido à reação de NADH-Tr. 1 = fibra SO; 2 = fibra FOG e 3 = fibra FG.

Os valores médios das áreas e freqüências dos diferentes tipos de fibras musculares encontrados no músculo digástrico, nos grupos N, A e I, estão nas TABELAS 4 e 5, respectivamente.

TABELA 4 – Área (μm^2) dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo digástrico dos animais dos grupos N, A e I.

Fibras	Normal		Alcoolizado		Isocalórico		F	P
	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp		
FG	1,33b	0,17	0,99a	0,22	0,96a	0,15	6,50	0,012*
FOG	0,82b	0,10	0,65a	0,13	0,66	0,06	4,82	0,029*
SO	0,72	0,14	0,67	0,18	0,62	0,06	0,72	0,506

Dp = desvios padrão – Grupos com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

TABELA 5 – Frequência (em %) dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo digástrico dos animais dos grupos N, A e I.

Fibras	Normal		Alcoolizado		Isocalórico		F	P
	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp		
FG	30,9	4,54	34,8	4,44	32,2	5,60	1,24	0,321
FOG	63,1	5,41	56,3	5,47	59,9	4,57	1,39	0,285
SO	6,0	2,42	8,9	1,97	7,9	2,73	2,01	0,176

Dp – desvio padrão

Nos dados do músculo digástrico, a ANOVA acusou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas áreas das fibras dos tipos FG e FOG, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na área das fibras do tipo SO.

Na área das fibras do tipo FG, o Teste Tukey mostrou que a diferença estatisticamente significativa estava entre os grupos N e A e N e I. Nas fibras do tipo FOG, o teste identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos N e A.

Com relação aos dados das frequências dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo digástrico, a ANOVA não acusou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Os dados sobre a média da área e a frequência dos diferentes tipos de fibras encontrados no músculo reto do abdome, nos grupos N, A e I, estão nas TABELAS 6 e 7, respectivamente.

TABELA 6 – Área, em μm^2 , dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo reto do abdome dos animais dos grupos N, A e I.

Fibras	Normal		Alcoolizado		Isocalórico		F	P
	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp		
FG	6,43a	0,91	3,31b	0,91	4,77c	0,38	20,40	0,000*
FOG	2,72	0,82	1,87	0,46	1,90	0,19	3,78	0,053
SO	0,93	0,14	0,69	0,15	0,83	0,32	1,60	0,241

Dp = desvio padrão – Grupos com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si.

Com relação aos dados das áreas dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo reto do abdome, a ANOVA acusou diferença estatisticamente significativa entre os grupos apenas nas fibras do tipo FG. Porém, os valores das fibras do tipo FOG estiveram próximos de uma diferença estatisticamente significativa. O teste Tukey mostrou que a diferença encontrada na área da fibra do tipo FG estava entre os grupos N e A, N e I e entre A e I.

TABELA 7 – Frequência dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo reto do abdome dos animais dos grupos N, A e I.

Fibras	Normal		Alcoolizado		Isocalórico		F	P
	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp		
FG	63,6a	1,84	60,9ab	4,09	57,7b	5,59	4,04	0,045*
FOG	22,3a	3,84	23,7ab	2,18	28,3b	5,16	4,08	0,044*
SO	14,1	2,98	15,4	3,80	14,1	5,93	0,13	0,873

Dp = desvio padrão – Grupos com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si.

Quanto aos dados sobre a frequência dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo reto do abdome, a ANOVA encontrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tanto nas fibras do tipo FG, como nas do tipo FOG. O teste Tukey mostrou que a diferença estava entre os grupos N e I, tanto nas fibras do tipo FG, como nas do tipo FOG.

Os dados mostraram, por meio da correlação de Pearson, a existência de uma correlação entre a área das fibras do tipo FG e o peso dos animais no músculo reto do abdome ($r = 0,7605$; $p = 0,001$). No músculo digástrico, onde a correlação não foi identificada, os valores estiveram próximos da correlação ($r = 0,4780$; $p = 0,072$).

DISCUSSÃO

Existem vários estudos sobre efeito do álcool na musculatura estriada, alguns realizados em seres humanos e outros em animais. O rato foi indicado, na maioria das vezes, como o modelo experimental ideal, por apresentar atrofia seletiva das fibras do tipo II, semelhante à que ocorre no homem (TROUNCE et al., 1990; PREEDY et al., 1990; SALISBURY et al., 1992; PREEDY et al., 1994).

A musculatura estriada responde à demanda funcional (ARMSTRONG; PHELPS, 1984), assim, a percentagem e a área dos diferentes tipos de fibras encontrados nos músculos da mastigação varia de animal para animal, de acordo com o hábito alimentar que ele possui.

Dentro das pesquisas histoenzimológicas dos músculos da mastigação, o digástrico (ventre anterior) é um dos músculos menos estudados.

Em primatas não humanos o tipo de fibra mais frequente é variável. Para alguns autores, as de contração lenta – tipos I ou SO – (CLARCK; LUSCHEI, 1981; MAXWELL et al. 1981) são as mais

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

freqüentes, para outros, são as do tipo FG (ANDREO et al., 1994). Quanto à fibra que apresenta maior área nestes animais, a opinião dos pesquisadores é menos variável, apontando para o tipo IIB (MAXWELL et al., 1981) ou FG (ANDREO et al., 1994).

Em humanos, as fibras do tipo IIB foram as mais freqüentes (ERIKSSON et al., 1982).

Em ratos, o músculo digástrico é considerado um abaixador da mandíbula (SFONDRINI et al., 1996), e a literatura mostra poucos trabalhos sobre a histoenzimologia das suas fibras musculares.

Bennet et al. (1977), que realizaram um estudo em animais adultos e em desenvolvimento, observaram apenas 2 tipos de fibras claramente distintos; Rokx et al. (1984) as classificaram em 4 tipos, dos quais 3 eram de contração rápida e uma de contração lenta. Esses pesquisadores observaram que o músculo digástrico (ventre anterior) tinha uma grande percentagem de fibras de contração rápida; Kiliaridis et al., (1988) que estudaram a influência da consistência dos alimentos sobre a área dos diferentes tipos de fibras encontradas neste músculo e observaram que as fibras de contração rápida (FG e FOG), não foram influenciadas por este fator.

Nesta pesquisa, feita com o músculo digástrico de ratos, normais, alcoolizados e isocalóricos, foi observado que as fibras de contração rápida (FG+FOG) são mais freqüentes que as de contração lenta, coincidindo com os dados de Roky et al., (1984), e que também apresentam as maiores áreas.

Com relação ao efeito do álcool sobre o músculo digástrico, pode-se dizer que foi semelhante ao que ocorreu nos músculos reto do abdome, que é um músculo somático, apresentando uma redução estatisticamente significativa na área das fibras de contração rápida (FG e FOG), o que não ocorreu com as fibras de contração lenta (SO). Estes dados coincidem com os de pesquisas realizadas anteriormente (TROUNCE et al., 1990; CHEN et al., 1991; PREEDY et al., 1994; SESTOFT et al., 1994; REILLY et al. 1998) em músculos do tronco e membros.

No músculo reto do abdome a redução das fibras do tipo FOG não foi estatisticamente significativa, embora os valores indicassem a proximidade dessa ocorrência. Talvez com um grupo maior o valor obtido tivesse sido estatisticamente significativo.

Os resultados obtidos entre os grupos alcoolizado e isocalórico foram semelhantes, tanto no músculo digástrico, como músculo reto do abdome, sendo maior quase sempre no grupo isocalórico, mas não atingindo em nenhum caso uma diferença estatisticamente significativa entre eles, exceto na área das fibras do tipo FG no músculo reto do abdome.

Nos músculos do tronco e dos membros, a presença de *grouping* das fibras musculares, que indica a ocorrência de uma desnervação seguida por uma reinervação, tem sido confirmada na biópsia de músculos de pacientes ou animais alcoolizados (FERRAZ et al., 1989; SHARMA et al., 1990; CHEN et al., 1991) e contestado por outros (SALISBURY et al., 1992; PREEDY et al., 1994). Neste trabalho, este aspecto não pode ser levado em consideração, uma vez que as presenças destes groupings são consideradas normais nos músculos da mastigação (DUBOWITZ; BROOKE, 1973).

Com relação ao efeito do álcool sobre as fibras de contração lenta, ou tipo I, a literatura mostra dados conflitantes. Alguns pesquisadores consideram que este tipo de fibra não é afetado pelo consumo do álcool (MARTIN et al., 1985; FERNÁNDEZ-SOLÁ et al., 1995; REILLY et al., 1998), outros consideram que as fibras do tipo I podem até sofrer uma ligeira hipertrofia (PREEDY et al., 1989; SALISBURY et al., 1992; PREEDY; PETER, 1994). Segundo Preedy et al. (1994), em circunstâncias excepcionais um alcoólatra de muito tempo pode apresentar atrofia das fibras do tipo I, mas sempre de menor magnitude do que as do tipo II. Nas fibras do tipo SO desta pesquisa, houve uma pequena redução em sua área, mas a diferença não chegou a ser estatisticamente significativa entre os grupos.

O efeito seletivo de atrofia das fibras de contração rápida em pacientes alcoólatras tem sido considerado, independentemente do estado nutricional, por alguns pesquisadores (MARTIN et al., 1985; SALISBURY et al., 1992). Contudo, Carpenter e Karpati (1984) consideram que em, pacientes alcoólatras crônicos, o desenvolvimento da atrofia das fibras do tipo II pode ser devido a outras causas, como a coexistência de má nutrição. Estes pesquisadores relatam ainda que, em experimentos anteriores, a atrofia das fibras do tipo II estava presente em aproximadamente 30% dos pacientes alcoólatras crônicos, sendo mais freqüente naqueles pacientes com coexistência de má-nutrição, neuropatia periférica e outras doenças relacionadas com o etanol.

Apesar dos objetivos desta pesquisa não se relacionarem com o estado nutricional dos animais, uma consideração importante deve ser feita a respeito dos ratos do grupo isocalórico, considerado como controle em algumas pesquisas. Os animais desse grupo tiveram um desenvolvimento menor, quando comparado aos ratos do grupo N, semelhante aos de Preedy et al., (1988), e, segundo estes pesquisadores, este aspecto pode afetar as fibras musculares esqueléticas. Portanto, nesta pesquisa os dados obtidos com os animais do grupo alcoolizado são semelhantes aos conseguidos com o grupo isocalórico que, para certa extensão, podem ser considerados como

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

subnutridos. Goldspink e Ward (1979) afirmam que uma alimentação abaixo da quantidade ótima induz a mudanças morfológicas no músculo esquelético.

Deve ser lembrado ainda que, segundo Bunout et al., (1987), a miopatia alcoólica pode ser atribuída, em parte, ao balanço negativo de nitrogênio em pacientes alcoólatras. Nesta pesquisa, o balanço de nitrogênio tanto do grupo alcoolizado, como do isocalórico foi negativo.

Observou-se também nesta pesquisa que o grupo isocalórico, mesmo recebendo uma taxa média diária de calorias menor do que a do grupo alcoolizado (56,4 Kcal e 61,24 Kcal respectivamente), teve um ganho de peso maior, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa.

Os pesquisadores consideram que as fibras de contração rápida mais afetadas pelo álcool, produzindo um decréscimo maior no seu tamanho, são as do tipo IIB – fibras de contração rápida anaeróbias glicolíticas – (TROUNCE et al., 1990; CHEN et al., 1991; PREEDY et al., 1994; SESTOFT, et al., 1994; REILLY et al., 1998;), o que coincide com os dados encontrados neste trabalho, em que as fibras do tipo FG foram as que apresentaram maior redução no seu tamanho, nos músculos estudados.

Alguns trabalhos têm afirmado que o consumo do álcool pode modular a expressão da isoforma de miosina (MHC) nos músculos estriados, aumentando a expressão da MHC tipo I e diminuindo as expressões de MHC dos tipos IIA e IIB (SESTOFT et al., 1994). Neste trabalho, houve um aumento na frequência das fibras do tipo SO (I) no grupo A de ambos músculos estudados, mas esta diferença não chegou ser estatisticamente significativa.

Um fato chama a atenção, e que talvez mereça estudos futuros, é que no músculo digástrico a redução das fibras do tipo FG no grupo alcoolizado foi de 25,6%, enquanto no músculo reto do abdome a redução foi de 48,5%. Qual seria explicação para isso: a origem embriológica, a inervação diferente, ou a demanda funcional diferente?

CONCLUSÃO

Baseando-se nos dados encontrados neste trabalho, julga-se possível concluir que: o músculo digástrico do rato é formado por três tipos de fibras, dois de contração rápida (FOG e FG) e um de contração lenta, e que as fibras de contração rápida apresentam maiores frequências (FOG>FG) e áreas (FG>FOG) do que a de

contração lenta (SO); o etanol produz uma atrofia nas fibras de contração rápida semelhante à observada nos músculos do tronco, mas as alterações produzidas nos músculos da mastigação parecem ser menores do que nos músculo do tronco, tanto no tamanho, como na frequência das fibras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREO, J. C. et al. Fiber types distribution in the digastric muscle of the tufted capuchin monkey (*Cebus apella*). *Anat. Histol. Embryol.*, v. 23, p. 226-231, 1994.
- ARMSTRONG R. B.; PHELPS, R.O. Muscle fibre type composition on the rat hindlimb. *Am J. Anat.*, v. 171, p. 259-272, 1984.
- BENNET, J. H.; JEFFERY, P. K.; WEBER, W. V. The histochemistry of the jaw muscles of the mature and maturing rat (proceeding). *J. Physiol.*, v. 270, n. 1, p. 26-27, 1977.
- BUNOUT, D.; PETERMAN, M.; UGARTE, G.; ITURRIAGA, H. Nitrogen economy in alcoholic patients without liver disease. *Metab. Clin Exp.*, v. 36, p. 651-653, 1987.
- CAGNON, V. H. A. *Observações morfológicas da glândula de coagulação de ratos (Rattus norvegicus) submetidos ao alcoolismo crônico experimental*. Botucatu, 1993. Dissertação (Mestrado em Anatomia)-Faculdade de Medicina, UNESP.
- CARPENTER, S.; KARPATI, G. *Major general pathological reactions and their consequences on skeletal muscle cells*. Pathology of skeletal muscle. New York: Churchill Livingstone, 1984. p. 101-112.
- CHEN, S. S.; PENG, M. J.; CHEN, T. J. Study of myopathy in chronic alcoholics with neurological complication. *Kao Hsiung I Hsueh Tsa Chih.*, v. 7, n. 6, p. 269-306, 1991.
- CLARK, R. W.; LUSCHEI, E. S. Histochemical characteristics of mandibular muscles monkeys. *Exp. Neurol.*, v. 74, n. 3, p. 654-672, 1981.
- DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. *Muscle biopsy: a modern approach*. London: Saudres, 1973.
- ERIKSSON, P. O.; ERIKSSON, A.; RINGQVIST, M. THORNELL, L. E. Histochemical fibre composition of the human digastric muscle. *Arch Oral biol.*, v. 27, p. 207-215, 1982.
- FERNANDEZ-SOLA, J. et al. Significance of type II fiber atrophy in chronic alcoholic myopathy. *J Neurol Sci.*, v. 130, n. 1, p. 69-76, 1995.
- FERRAZ, M.L. et al. Histochemical study of the skeletal muscle in chronic alcoholism. *Arq Neuropsiquiatr.*, v. 47, n. 2, p. 139-149, 1989.
- GOLDSPINK, G.; WARD, P. S. Changes in rodent muscle fibre types during post-natal growth, undernutrition and exercise. *J. Physiol.*, v. 296, p. 453-469, 1979.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.

HIEMAE, K. The structure and function of the jaw muscle in the rat (*Rattus norvegicus* L.) I. Their anatomy and internal architecture. *Zool F Linn Soc*, v. 50, p. 75-99, 1971.

KILIARIDIS, S.; ENGSTROM, C.; THILANDER, B. Histochemical analysis of masticatory muscle in the growing rat after prolonged alteration in the consistency of the diet. *Arch Oral Biol.*, v. 33, n. 3, p. 187-193, 1988.

MAO, J.; STEIN, R. B.; OSBORN, J. W. The size and distribution of fiber types in jaw muscles: a review. *J Craniomandib Facial Oral Pain.*, v. 6, p. 192-201, 1992.

MARTIN, F.; WARD, K.; SLAVIN, G.; LEVI, J.; PETERS, T. J. Alcoholic skeletal myopathy a clinical and pathological study. *Quart. J. Med.*, v. 55, p. 233-251, 1985.

MAXWELL, L. C. et al. Adaptation of the masseter and temporalis muscles following alteration in length, with or without surgical detachment. *The Anatomical Record*, v. 200, n. 2, p. 127-137, 1981.

PEARSE, A. G. E. *Histochemistry*: Theoretical and applied. 2. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1968.

PETER, J. B. et al. Metabolic profiles of the three fibre types of the skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, v. 11, p. 2627-2677, 1972.

PREEDY, V. R. et al. Ethanol-induce skeletal muscle myopathy: biochemical and histochemical measurements on type I and type II fibre-rich muscles in the young rat. *Alcohol*, v. 24, n. 6, p. 533-539, 1989.

PREEDY, V. R.; DUANE, P.; PETER, T. J. Biological effects of chronic ethanol consumption. A reappraisal of the Lieber – De Carli liquid-diet model with reference to skeletal muscle. *Alcohol and alcoholism*, v. 23, p. 151-154, 1988.

PREEDY, V. R. et al. Liver histology, blood biochemistry and RNA, DNA and subcellular protein composition of various skeletal muscle of rats with experimental cirrhosis: implications for alcoholic muscle disease. *Alcohol Alcohol*, v. 25, n. 6, p. 641-649, 1990.

PREEDY, V. R.; PETE, T. J. Alcohol and muscle disease (editorial). *J. R. Sco. Med.*, v. 87, n. 4, p. 188-190, 1994.

PREEDY, V. R.; SALISBURY, J. R.; PETERS, T. J. Alcoholic muscle disease: features and mechanisms. *J. Pathol.*, v. 173, n. 4, p. 309-315, 1994.

PREEDY, V. R. et al. Recent advances in the pathology of alcoholic myopathy. *Alcoholism*, v. 25, n. 5, p. 54s -59s, 2001.

REILLY, M. E.; PREEDY, V. R.; PETER, T. J. Investigations into the toxic effects of alcohol on skeletal muscle. *Adverse Drug React Toxicol Rev*, v. 14, p. 117-150, 1995.

REILLY, M. E. et al. Skeletal muscle ribonuclease activities in chronically ethanol-treated rats. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 22, n. 4, p. 876-883, 1998.

ROKX, J. M.; VAN WILLIGEN, J. D.; JANSEN, H. W. B. Muscle fibre types and muscle spindles in the jaw musculature of the rat. *Arch. Oral Biol.*, v. 29, n. 1, p. 25-31, 1984.

RUBIN, E. et al. Muscle damage produced by chronic alcohol consumption. *Am J Pathol.*, v. 83, p. 499-516, 1976.

SACANELLA, E. et al. Chronic alcoholic myopathy: diagnostic clues and relationship with other ethanol-related diseases. *Q J Med.*, v. 88, p. 811-817, 1995.

SALISBURY, J. R. et al. Ethanol-induce chronic myopathy in the young rat: a light and electron microscopic study in type I or type II fibre-rich skeletal muscles. *Alcohol*, v. 27, n. 5, p. 493-500, 1992.

SESTOFT, L. et al. Working capacity and expression of myosin heavy chain isoforms in skeletal muscle of chronic alcoholic men with liver disease after 1 day and 4 weeks of alcohol abstinence. *Clin Scin Colch.*, v. 86, n. 4, p. 433-40, 1994.

SFONDRINI, G. et al. Adaptations of masticatory muscles to a hyperpropulsive appliance in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, v. 110, n. 6, p. 612-617, 1996.

SHARMA, S. C. et al. Chronic muscle wasting in alcoholics a histochemical and biochemical study. *Indian J Pathol Microbiol.*, v. 33, n. 3, p. 244-249, 1990.

SILVA, V. A. da. Et al. Ethanol embryofetotoxicity in malnourished rats. *Nutr Report Intern.*, v. 36, n. 4, p. 887-895, 1987.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. *Statistical Method. 7th edn.* Ames: Iowa State University, 1980. p. 505.

TROUNCE, I.; BYRNE, E.; DENNETT, X. Biochemical and morphological studies of skeletal muscle in experimental chronic alcoholic myopathy. *Acta Neurol Scand*, v. 82, n. 6, p. 386-91, 1990.

TUXEN, A.; BAKKE, M.; KENRAD, B. Histochemical characterization of masseter muscle fibres in a biopsy study of normal young women. *Arch Oral Biol.*, v. 11, p. 889-893, 1992.

URBANO-MÁRQUES, A. et al. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *M Engl J Med.*, v. 320, p. 409-411, 1989.

URBANO-MÁRQUEZ, A. et al. The greater risk of alcoholic cardiomyopathy in women compared with men. *JAMA*, v. 274, p. 149-154, 1995.

WERNECK L. C. O valor da biopsia muscular em neurologia (Análise de 290 exames a fresco pela histoquímica). *Brasil Clin Terap.*, v. 10, p. 2-24, 1981.

ANDREO, Jesus Carlos et al. Efeito do etanol sobre o músculo digástrico de ratos (*Rattus norvegicus*): uma avaliação histoenzimológica. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 355-370, 2004.