

EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA SOBRE A MORFOLOGIA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS WISTAR

Andreo Fernando Aguiar¹, Alan Dantas Santos Felisberto¹, Danilo Henrique Aguiar¹, Rachel Colauto Milanezi¹, Maéli Dal Pai Silva¹.

RESUMO

Objetivo: Este estudo avaliou os possíveis efeitos do treinamento resistido e da suplementação de creatina sobre a morfologia do músculo estriado esquelético de ratos. **Métodos:** Ratos wistar machos (80 dias de idade, 250 a 300 g) foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: não-treinados sem a suplementação de creatina (CO, n=8); não-treinados com a suplementação de creatina (CR, n= 8); treinados sem a suplementação de creatina (EX, n= 08); e treinados com a suplementação de creatina (CREX, n= 08). Os grupos EX e CREX foram submetidos a um protocolo de treinamento resistido de 5 semanas, na qual foram realizadas sessões de saltos em uma cuba contendo água a 28-32°C e 38 cm de profundidade, com intervalos de 40 segundos entre as séries. A sobrecarga de treinamento foi ajustada por meio de um colete acoplado na região torácica do animal, sendo equivalente a 50% do peso corporal, durante a fase de adaptação ao meio líquido (1^o ao 5^o dia), 60% nos dias subsequentes (6^o ao 25^o), e 70% na fase final do treinamento físico (26^o ao 30^o). Os grupos CR e CREX foram suplementados com creatina (0,5 g/kg peso corporal) durante todo o período de treinamento físico, administrada via oral (gavage). Ao final do experimento, os animais foram pesados e sacrificados, o músculo gastrocnêmio foi retirado e os fragmentos musculares foram congelados em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido a -156°C. Cortes histológicos (10 µm) foram submetidos à coloração H.E e a reação da ATPase miofibrilar (mATPase) (pH 4,4), para a identificação dos tipos de fibras musculares (I e II). Foi mensurada a frequência dos tipos de fibras e calculada a área de seção transversal (AST) dos tipos de fibras (200 fibras/ animal), utilizando-se um analisador de imagens Leica Qwin. **Resultados:** Com relação à AST das fibras do músculo gastrocnêmio, não houve diferença significativa entre os grupos CO e CR. Por outro lado, o grupo EX apresentou uma AST estatisticamente maior, em relação aos grupos CO e CREX. Houve aumento significativo no percentual de fibras do tipo II, com concomitante redução das fibras do tipo I, no grupo CR, em relação ao CO. Inversamente, o grupo EX apresentou redução no percentual de fibras do tipo II e aumento das fibras do tipo I, comparado ao CO. Interessantemente, essas alterações não foram evidentes no grupo CREX, em relação ao CO. **Conclusão:** A suplementação de creatina associada ao treinamento resistido (CREX) não afetou a proporção de fibras do músculo gastrocnêmio. Interessantemente, a creatina isolada promoveu um efeito antagonístico ao treinamento resistido na proporção das fibras. O treinamento isolado promoveu um aumento da AST das fibras musculares. No entanto, a suplementação de creatina, na ausência ou presença de treinamento, não promoveu alterações na AST das fibras do gastrocnêmio. Esse resultado sugere um efeito específico da creatina no aumento da AST, na dependência do músculo recrutado.

Palavras-chave: Músculo estriado esquelético, fibras musculares, gastrocnêmio, treinamento resistido, creatina.

ABSTRACT

Objective: This study evaluated the possible effect of resistance training and creatine supplementation on the morphology in the skeletal muscle of rats. **Methods:** Male Wistar rats (80 days old, 250-300 g) were divided into four groups: Not trained without creatine supplementation (CO; n=8), Not trained with creatine supplementation (CR; n=8), Trained without creatine supplementation (EX; n=8), and Trained with creatine supplementation (CREX; n=8). EX and CREX were submitted to a 30 day resistance training protocol. This involved individual training sessions where animals performed 04 sets of 10 jumps in a 38cm deep vat of water, at ~30°C with 40s rest intervals between each set. Training overload was accomplished with a vest attached to the animal's thorax equivalent to 50% body weight during liquid adaptation phase (1st to 5th day), 60% in the intermediate (6th to 25th), and 70% in the final physical training phase (26th to 30th). CR and CREX rats were given 0.5g/Kg body weight creatine orally for each training period by gavage. At the end of training, animals were weighed, sacrificed, and the gastrocnemius muscle was removed and immersed in n-Hexane cooled in liquid nitrogen (-156 °C). Histological sections (10 µm) were submitted to myofibrillar ATPase reaction (mATPase) (pH 4.4) to identify

muscle fiber types (I, IC, IIC, and IIA). Cross-section area (CSA) of each fiber type was calculated (200fibers/animal) using a Leica Qwin image analyzer. MHC expression was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). **Results:** With respect to AST of fibers of the gastrocnemius muscle, there was no significant difference among CO and CR groups. Moreover, the EX group presented a statistically higher AST, in relation to CO and CREX groups. There was a significant increase in the percentage of fibers of the type II, with a concomitant reduction in the type I fibers in the CR group, in relation to CO. Conversely, the group presented EX reduction in the percentage of type II fibers, and an increase in the type I fibers, compared to CO. Interestingly, these changes have not been evident in the group CREX, for the CO. **Conclusion:** The supplemental creatine associated with resistance training (CREX) did not affect the proportion of fibers of the gastrocnemius muscle. Interestingly, creatine alone promoted an effect antagonistic to the resistance training in the proportion of fibers. The training alone promoted an increase in AST of muscle fibers. However, the supplemental creatine, in the absence or presence of training, not promoted AST changes in the fibers of the gastrocnemius. This result suggests a specific effect of creatine in increasing AST, depending on the recruited muscle.

INTRODUÇÃO

A especificidade na expressão das isoformas de miosinas de cadeia pesada (MHC) nos tipos de fibras, revela ampla diversidade estrutural, funcional e metabólica do músculo estriado esquelético (Pette & Staron, 2000). Contudo, as fibras musculares exibem alta plasticidade, o que habilita este tecido a alterar suas características morfológicas, metabólicas e funcionais, como resposta a estímulos específicos (Pette & Staron, 2000; Magauda et al., 2004). Vários estudos mostram que os diferentes modelos de treinamento físico podem provocar ajustes específicos no fenótipo das fibras musculares, alterando as propriedades morfofuncionais do músculo (Green et al., 1999; Sharman et al., 2001).

Investigações recentes mostram que a intervenção nutricional, associada ao treinamento físico, também pode contribuir para as adaptações fenotípicas das fibras musculares. Nessa linha de investigação, a suplementação de creatina tem sido apontada como um potente adicional ergogênico para o desempenho físico, podendo promover um aumento na área das fibras musculares (Becque et al., 1999; Volek et al., 1999; Moura et al., 2002;) e na performance durante os exercícios breves e de alta intensidade (Casey et al., 1996; Earnest et al., 1997; Brenner et al., 2000; Burke et al., 2000; Casey & Greenhaff, 2000).

A suplementação de creatina (Cr) aumenta a concentração total de creatina intramuscular, armazenada na forma de creatina livre e fosfocreatina (PCr) (Balsom et al., 1994; Hultman et al., 1996; Branon et al., 1997; Williams & Branch, 1998), a qual favorece o aumento das reservas de fosfato de alta energia, para suportar as altas demandas de ATP, durante os exercícios de alta intensidade (McBride & Gregory, 2002). Assim, os efeitos benéficos da creatina no aumento da força, da potência (Rawson & Volek, 2003; Volek, & Rawson 2004) e da área das fibras musculares (Becque et al., 1999; Volek et al., 1999; Moura et al., 2002;) tem sido associados a uma melhora na capacidade de trabalho muscular (Kirksey et al., 1999), pelo aumento da resistência à fadiga.

Neste sentido, a creatina pode contribuir para o aumento no volume de treinamento durante uma única série ou séries repetidas de exercício, favorecendo o aumento da massa e força muscular (McBride & Gregory, 2002). No entanto, para a creatina ser efetiva precisa ser incorporada ao regime de treinamento, sendo dependente dos ajustes de sobrecarga nas sessões subseqüentes de treinamento (Young & Young, 2007).

Em adição, vários estudos mostram que a suplementação de creatina, associada a diferentes modelos de treinamento físico, pode provocar um aumento no peso corporal (Greenhaff et al., 1994; Balsom et al., 1995; Green et al., 1996; Kreider et al., 1998; Volek et al., 1999; Kutz & Gunter, 2003). Este ganho de peso pode ser atribuído a uma maior retenção de água intramuscular e/ou um aumento das proteínas miofibrilares (hipertrofia das fibras) (Williams & Branch, 1998). Porém, alguns estudos apontam resultados contraditórios (Thompson et al., 1996; Stout et al., 1999).

Embora esteja bem estabelecido o efeito da creatina como um estímulo ergogênico adicional ao treinamento físico, a sua ação isolada ou associada ao treinamento resistido, sobre as características morfofuncionais do músculo esquelético, permanece não esclarecida.

Assim, o presente trabalho investigou os possíveis efeitos da suplementação de creatina e do treinamento resistido, sobre a análise morfológica e morfométrica das fibras do músculo gastrocnêmio de ratos Wistar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

Ratos Wistar machos (80 dias de idade, 250-300g) foram mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo de luminosidade claro/escuro (12/12h), com ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 4 grupos: Não-treinados sem suplementação de creatina (CO, n= 8); Não-treinados com a suplementação de creatina (CR, n= 8); Treinados sem a suplementação de creatina (EX, n= 8); e Treinados com a suplementação de creatina (CREX, n= 8). O protocolo experimental utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, protocolo número 017/06-CEEA.

Suplementação de creatina

Os grupos CR e CREX foram suplementados, diariamente, com creatina monoidratada (Sigma, C-3630), tendo a água como veículo, administrada via gavagem. Os grupos CO e EX receberam somente água, via gavagem. A suplementação de creatina teve início cinco dias precedente ao período de treinamento físico e permaneceu até o final do experimento (30 dias). Os animais foram pesados diariamente para a preparação da solução de creatina, e a dose de creatina consumida por cada animal foi de 0,5 g/Kg peso corporal (McBride & Gregory, 2002), que excede a quantidade necessária para elevar os níveis de creatina muscular em humanos.

Treinamento físico

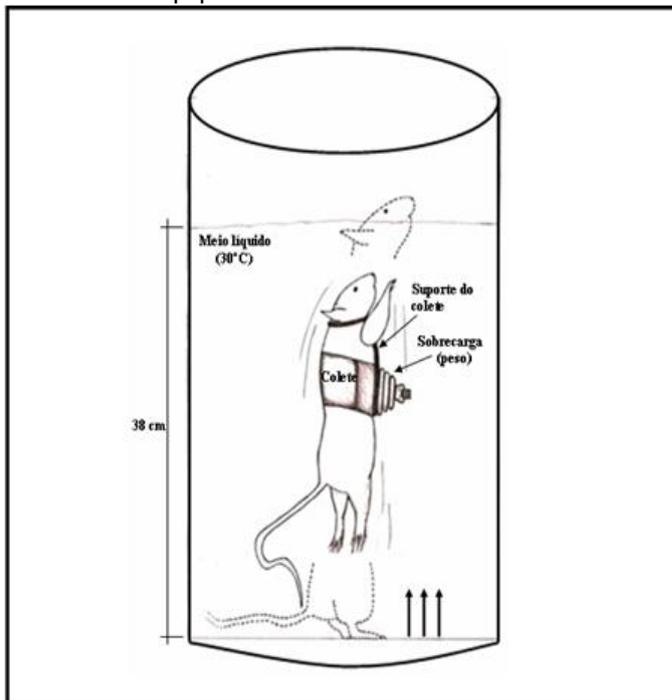
Os grupos EX e CREX foram submetidos a um programa de treinamento físico resistido, durante 5 semanas (5 dias/semana) (Tabela 1). O protocolo de treinamento físico foi similar ao descrito por Cunha et al., 2005. Os animais realizaram, individualmente, sessões de saltos em uma cuba contendo água à $28-32^{\circ}\text{C}$ e 38 cm de profundidade, com um peso extra de sobrecarga (Figura 1). A profundidade foi adequada para permitir a respiração do animal na superfície da água, durante os saltos sucessivos.

Inicialmente, os animais tiveram um período de adaptação ao meio líquido (5 dias, 1x/dia), com número crescente de séries (2 a 4) e saltos (5 a 10), e 40 segundos de intervalo entre as séries. Em seguida, iniciaram o período de treinamento, que consistiu de 4 séries de 10 saltos e sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal durante as 2 primeiras semanas, 60% na terceira e quarta semana e 70% na última semana de treinamento, com intervalos de 40 segundos entre as séries (Tabela 1). Os animais saltavam até a superfície da água para respirar, não necessitando de qualquer estímulo direto para concluírem as sessões de saltos. A contagem de cada salto era realizada quando o animal atingia a superfície da água e retornava ao fundo da cuba, realizando continuamente este movimento até o término das séries. O treinamento foi aplicado sempre no mesmo período do dia, entre 14 e 16 horas.

Tabela 1 – Protocolo de treinamento resistido

Semana	séries / saltos	Sobrecarga (% peso corporal)
1	4 x 10	50%
2	4 x 10	50%
3	4 x 10	60%
4	4 x 10	60%
5	4 x 10	70%

Figura 1 – Figura representativa do equipamento utilizado no treinamento físico.

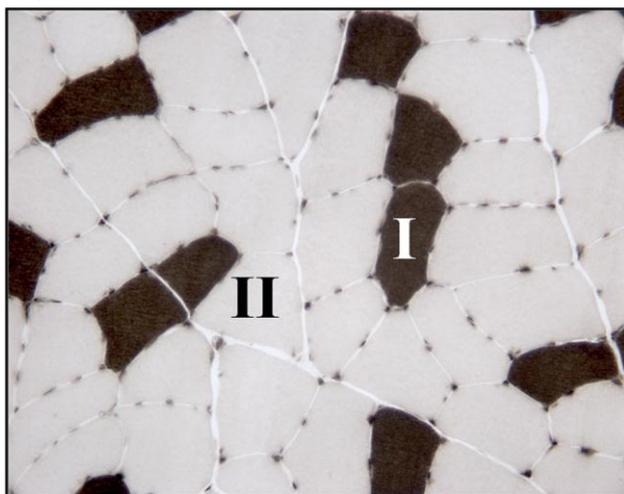


Análise morfológica

Ao final do período de treinamento, os animais foram pesados, anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg, i.p) e sacrificados por decapitação. A porção medial do músculo gastrocnêmio foi separada e imediatamente congelada em n-Hexano, resfriado em nitrogênio líquido a -156°C. As amostras foram armazenadas em freezer (-80°C) para posterior análise. Cortes histológicos (10 µm) foram obtidos em um criostato a -20°C, com algumas lâminas sendo submetidas à coloração HE para a análise da morfologia geral das fibras musculares (figura 2) e outras utilizadas para a análise histoquímica da mATPase (miofibrillar adenosine triphosphatase), após pré incubação em pH 4,4 (Staron et al., 1999). Foram identificados 2 tipos de fibras musculares (I e II) (figura 2).

Utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens (Leika Qwin), foi determinada a frequência dos tipos de fibras e mensurada a área de secção transversal (AST) de aproximadamente 200 fibras (cinco campos aleatórios) de cada animal.

Figura 2 - Corte transversal da porção média do músculo gastrocnêmio. Fibras do tipo I (I) e tipo II (II). mATPase (pH 4,4).



Análise estatística

Para análise da AST das fibras musculares foi utilizada a análise de variância para o modelo com dois fatores (Zar, 1999), complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05\%$). A análise da frequência dos tipos de fibras foi realizada através do teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais (Goodman, 1964, 1965). Os valores referentes a AST das fibras, foram expressos em média e desvio padrão.

RESULTADOS

A análise morfológica do músculo gastrocnêmio revelou características normais em todos os grupos estudados. As fibras apresentaram aspecto poligonal ou arredondado, com núcleos periféricos, estando envoltas pelo endomísio de tecido conjuntivo frouxo. O fascículo, grupo de fibras musculares, exibiu um envoltório de tecido conjuntivo mais denso, o perimísio (Figura 3).

Com relação à AST das fibras do músculo gastrocnêmio, não houve diferença significativa entre os grupos CR e CO. Por outro lado, o grupo EX apresentou uma AST estatisticamente maior, em relação aos grupos CO e CREX (Tabela 2).

De acordo com os resultados da figura 4, houve aumento significativo no percentual de fibras do tipo II, com concomitante redução das fibras do tipo I, no grupo CR, em relação ao CO. Inversamente, o grupo EX apresentou redução no percentual de fibras do tipo II e aumento das fibras do tipo I, comparado ao CO. Interessantemente, essas alterações não foram evidentes quando o treinamento foi associado à suplementação de creatina (CREX), comparado ao CO.

Figura 3 - Corte transversal da porção média do músculo gastrocnêmio, dos grupos CO (A), CR (B), EX (C) e CREX (D). Fibras musculares (F). Núcleos (cabecinhas de seta). Perimísio (setas azuis). Endomísio (setas pretas). Coloração: H.E.

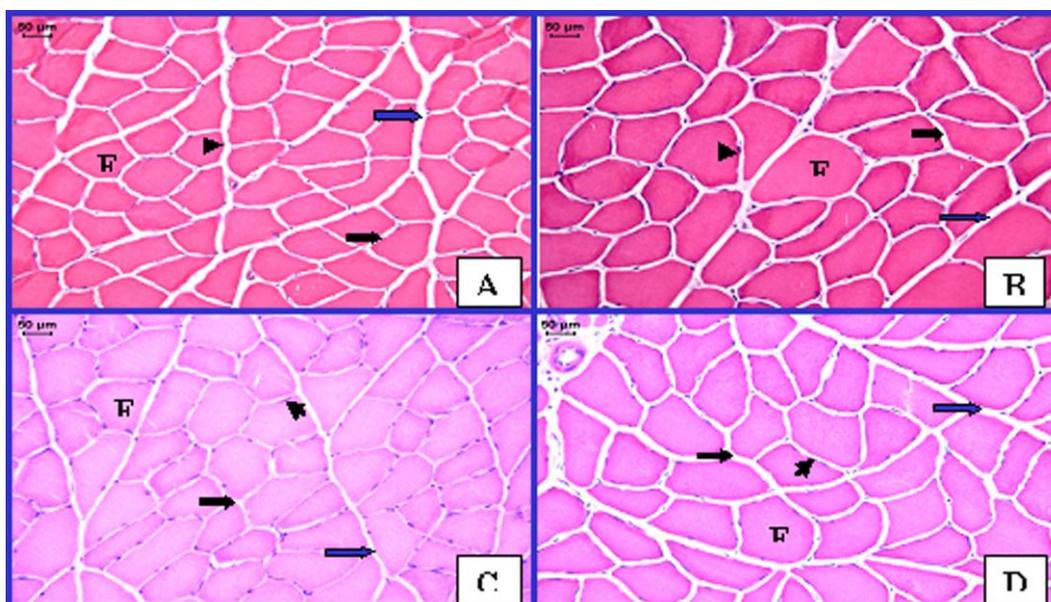
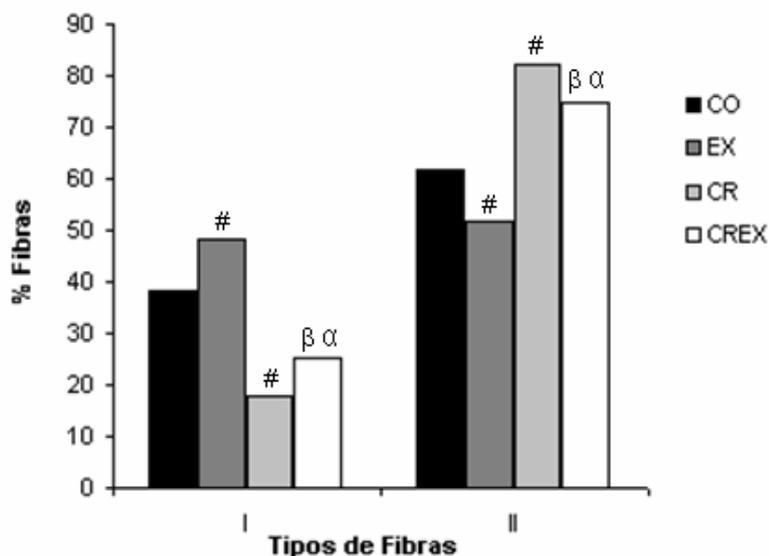


Tabela 2 - Área de secção transversal (AST) das fibras do músculo gastrocnêmio, dos grupos CO, CR, EX e CREX. Valores expressos em média \pm DP.

Grupo	AST (μm^2) – H.E
CO (n=8)	1956,54 \pm 294,69
CR (n=8)	1865,64 \pm 384,24
EX (n=8)	2426,67 \pm 411,95*#
CREX (n=8)	2059,50 \pm 269,14

(* $p < 0,05$ em relação ao CO; # $p < 0,05$ em relação ao CREX)

Figura 4 - Percentual de fibras (I e II) do músculo gastrocnêmio dos grupos CO, EX, CR e CREX. # P< 0,05 em relação ao grupo CO, ^β p< 0,05 em relação ao grupo CR, ^α p< 0,05 em relação ao grupo EX.



CONCLUSÃO

A suplementação de creatina associada ao treinamento resistido não afetou a proporção de fibras do músculo gastrocnêmio. Interessantemente, a creatina isolada promoveu um efeito antagônico ao treinamento resistido na proporção das fibras. O treinamento isolado promoveu um aumento da AST das fibras musculares. Embora os trabalhos apontem a creatina como um potente adicional ergogênico para o treinamento físico, os resultados do presente estudo não evidenciaram qualquer efeito adicional da creatina no aumento da AST do músculo gastrocnêmio, sugerindo um efeito específico da creatina, na dependência do músculo recrutado.

REFERÊNCIAS

- BALSOM, P.D.; SODERLUND, K.; EKBLUM, B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. **Sports Med**, vol.18, p.268-280, 1994.
- BALSOM, P.; SODERLUND, K.; SJODIN, B.; HULTMAN, E. Skeletal muscle metabolism during short duration high-intensity exercise: influence of creatine supplementation. **Acta Physiol Scand**, vol.154, p. 303–310, 1995.
- BECQUE, M.D.; LOCHMANN, J.D.; MELROSE, D.R. Effects of oral creatine supplementation on muscular strength and body composition. **Med Sci Sports Exerc**, vol.32, p.654–658, 1999.
- BRENNER, M.; RANKIN, J.K.; SEBOLT, D. The effect of creatine supplementation during resistance training in women **J Strength Cond Res**, vol. 14, n.2, p.207-213, 2000.
- BURKE, D.G.; SILVER, S.; HOLT, L.E.; SMITH-PALMER, T.; CULLIGAN, C.J.; CHILIBECK, P.D. The effect of continuous low dose creatine supplementation on force, power, and total work. **Int J Sport Nutr**, vol.10, n.3, p. 235-244, 2000.
- CASEY, A.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; HOWELL, S.; HULTMAN, E.; GREENHAFF, P.L. Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. **Am J Physiol**, vol.271, n.1, p. E31-E37, 1996.
- CASEY, A.; GREENHAFF, P.L. Does dietary creatine supplementation play a role in skeletal muscle metabolism and performance? **Am. J. Clinical Nutrition**, vol.72, n.2, p. 607S - 617S, 2000.

CUNHA, T.S.; TANNO, A.P.; MOURA, M.J.C.S.; MARCONDES, F.K. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. **Life Sciences**, vol.77, p. 1030-1043, 2005.

EARNEST, C.P.; ALMADA, A.L.; MITCHELL, T.L. Effects of creatine monohydrate ingestion on intermediate duration anaerobic treadmill running to exhaustion. **J Strength Cond Res**, vol.11, p. 234–238, 1997.

GOODMAN, L.A. (1964) Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Annals of Mathematical Statistics**, vol.35, n.2, p. 716-725, 1964.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Technometrics**, vol.7, n.2, p. 247-254, 1965.

GREEN, A.L.; HULTMAN, E.; MACDONALD, I.A.; SEWELL, D.A.; GREENHAFF, P.L. Carbohydrate feeding augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in humans. **Am J Physiol**, vol.271, p.E821–E826, 1996.

GREEN, H.; GOREHAM, C.; OUYANG, J.; BALL-BURNETT, M.; RANNEY, D. Regulation of fiber size, oxidative potential, and capillarization in human muscle by resistance exercise. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, vol.276, p. R591-R596, 1999.

GREENHAFF, P.L.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; CASEY, A.; HULTMAN, E. The effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle ATP degradation during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man. (Abstract). **J Physiol**, vol.476, p. 84P, 1994.

HULTMAN, E.; SODERLUND, K.; TIMMONS, J.A.; CEDERBLAD, G.; GREENHAFF, P.L. (1996) Muscle creatine loading in men. **J Appl Physiol**, vol.81, p. 232–237, 1996.

KIRKSEY, B.; STONE, M.H.; WARREN, B.J.; JOHNSON, R.; STONE, M.; HAFF, G.; WILLIAMS, F. AND PROULX C. The effects of 6 weeks of creatine monohydrate supplementation on performance measures and body composition in collegiate track athletes. **J Str Cond Res**, vol.13, p.148–156, 1999.

KREIDER, R.B.; FERREIRA, M.; WILSON, M.; GRINSTAFF, P.; PLISK, S.; REINARDY, J.; CANTLER, E.; ALMADA, A.L. Effects of creatine supplementation body composition, strength, and sprint performance. **Med Sci Sports Exerc**, vol.30, n.1, p.71-82, 1998.

MAGAUDA, L.; MAURO, D.D.; TRIMARCHI, F.; ANASTASI, G.; Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. **Basic Appl Myol**, vol.14, n. 1, p.17-21, 2004.

MCBRIDE, T.A. & GREGORY, M.A. Effect of creatine supplementation during high resistance training on mass, strength, and fatigue resistance in rat skeletal muscle. **J Strength and Cond Res**, vol.16, n.3, p.335-342, 2002.

MOURA, I.M.W.; DOS SANTOS, F.F.; MOURA, J.A.A.; CURI, R.; FERNANDES, L.C.; Creatine supplementation induces alteration in cross-sectional area in skeletal muscle fibers of wistar rats after swimming training. **J Sports Sci and Med**, vol.1, p.87-95, 2002.

PETTE, D. & STARON, R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc Res Tech**, vol.50, p.500-509, 2000.

RAWSON, E.S. & VOLEK, J.S. Effects of creatine supplementation and resistance training on muscle strength and weightlifting performance. **J Strength Cond Res**, vol.17, n.4, p.822-831, 2003.

SHARMAN, M.J.; NEWTON, R.U.; TRIPLETT-MCBRIDE, T.; MCGUIGAN, M.R.M.; MCBRIDE, J.M.; HAKKINEN, A.; HAKKINEN, K.; KRAEMER, W.J. Changes in myosin heavy chain composition with heavy resistance training in 60-to 75-year old men and women. **Eur J Appl Physiol**, vol.84, p.127-132, 2001.

STARON, R.S.; KRAEMER, W.J.; HIKIDA, R.S.; FRY, A.C.; MURRAY, J.D.; CAMPOS, G.E. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. **Histochem Cell Biol**, vol.111, n.2, p.117-123, 1999.

STOUT, J.R.; ECHERSON, J.; NOONAN, D.; MOORE, G.; CULLEN, D. Effects of creatine supplementation on exercise performance and fat free weight in football players during training. **Nutritional Research**, Vol. 19, p.217-225, 1999.

THOMPSON, C.H.; KEMP, G.J.; SANDERSON, A.L.; DIXON, R.M.; STYLES, P.; TAYLOR, D. J.; RADDA, G.K. Effect of creatine on aerobic and anaerobic metabolism in skeletal muscle of swimmers. **British Journal of Sports Medicine**, vol.30, p.222-225, 1996.

VOLEK, J.S.; DUNCAN, N.D.; MAZZETTI, S.A.; STARON, R.S.; PUTUKIAN, M.; GÓMEZ, A.L.; PEARSON, D.R.; FINK, W.J.; KRAEMER, W.J. Performance and muscle fibre adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. **Med Sci Sports and Exerc**, vol.31, p.1147–1156, 1999.

VOLEK, J.S. & RAWSON, E.S. Scientific basis and practical aspects of creatine supplementation for athletes. **Nutrition**, vol.20, p.609–614, 2004.

WILLIAMS, M.H.; BRANCH, J.D. Creatine supplementation and exercise performance: an update. **J Am Coll Nutr**, vol.17, p. 216–234, 1998.

YOUNG, R.E.; YOUNG, J.C. (2007) The effect of creatine supplementation on mass and performance of rat skeletal muscle. **Life Sci**, vol.81, n.9, p. 710-716, 2007.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice-Hall New Jersey, 633p, 1999.

¹ Departamento de Morfologia, UNESP, Botucatu, 18618-000, São Paulo, Brasil.