Célia Aparecida Stellutti Pachioni

LESÃO POR ESTIRAMENTO DO MÚSCULO SOLEUS:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

RIBEIRÃO PRETO-SP

1996

CÉLIA APARECIDA STELLUTTI PACHIONI

**LESÃO POR ESTIRAMENTO DO MÚSCULO *SOLEUS*:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**RIBEIRÃO PRETO - SP
1996**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**LESÃO POR ESTIRAMENTO DO MÚSCULO *SOLEUS*:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

CÉLIA APARECIDA STELLUTTI PACHIONI

Dissertação de Mestrado apresentada à
Escola de Engenharia de São Carlos e
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo.
Área Interunidades de Bioengenharia.

Orientador : Prof. Dr. NILTON MAZZER
Co-Orientador: Prof. Dr. CLÁUDIO HENRIQUE BARBIERI

**RIBEIRÃO PRETO - SP
1996**

Class. TESE-EESC
Gutt. 4134
Tombo T0235/96
ST 1088207

Ficha catalográfica

PACHIONI, Célia Aparecida Stellutti. Lesão por estiramento do músculo *soleus*: estudo experimental em ratos. São Carlos e Ribeirão Preto: USP, 1996.
60 p.

Dissertação (Mestrado - Bioengenharia)

- Escola de Engenharia de São Carlos e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

1. Músculos - Lesão   2. Histologia   3. Histoquímica.
I. Autor.

*"Nunca lhe dão um desejo sem também
lhe darem o poder de realizá-lo.*

*Você pode ter de trabalhar por ele,
porém".*

(Richard Bach)

Dedicatória

*À meu esposo Carlos Eduardo,
pelo seu apoio e incentivo;
à meus filhos Fernanda e Eduardo,
pela paciência e amor incondicional,
fundamentais nesta minha jornada.*

*À meus pais,
por me mostrarem o caminho a seguir,
através de seus exemplos de vida.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Nilton Mazzer, minha homenagem especial, pelos ensinamentos, pela amizade, confiança e orientação com que sempre acompanhou a realização deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri, pela revisão criteriosa do trabalho, aperfeiçoando com suas valiosas sugestões e críticas;
- À Profa. Dra. Leila Maria Cardão Chimelli, pela acolhida em seu laboratório;
- Ao Engenheiro Dr. Antonio Carlos Shimano, pela ajuda na confecção do equipamento mecânico;
- Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia, na pessoa do Prof. Dr. José B. Portugal Paulin, pela colaboração e interesse demonstrados;
- À Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini, pela acolhida em seu laboratório, pela inestimável colaboração na interpretação dos achados de microscopia ótica;
- Ao funcionário Marcos Barros de Souza, Secretário do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP - Campus de Presidente Prudente, pelo precioso trabalho de digitação;
- Às funcionárias Sílvia e Maria Paula, pela realização dos cortes e coloração das lâminas;
- Ao funcionário Sebastião Assis Mazzeto, da Cirurgia Experimental da FMRP-USP, pela preciosa colaboração;

- À Senhora Rosa Pereira Brittes Alves, funcionária do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da FMRP-USP, pela colaboração na finalização deste trabalho;
- Aos meus amigos José Carlos, Denise, Marisa, Jayro e Valdir pelo apoio e carinho a mim dedicados;
- À CAPES (Coordenação para Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), através do PICD, pela concessão da Bolsa de Mestrado Integral, indispensável na realização deste trabalho;
- À todos aqueles que, de forma direta ou indireta, favoreceram para que fosse possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Lesão muscular	3
1.2 Modelos experimentais de lesão muscular	4
2 OBJETIVO	10
3 MATERIAL E MÉTODO	12
3.1 Animais de experimentação	13
3.2 Grupos experimentais	13
3.3 Equipamento utilizado no estudo	15
3.4 Coleta do material	18
3.5 Técnicas de avaliação	19
3.6 Caracterização dos sinais de lesão nas fibras musculares	20
3.7 Análise estatística	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Generalidades	23
4.2 Observações histológicas e histoquímicas	25
4.2.1 Grupo A (controle)	25
4.2.2 Grupo B (tetanização seguida de estiramento)	25
4.2.3 Grupo C (somente tetanização)	25
4.3 Análise quantitativa das fibras musculares com sinais de lesão	29
4.3.1 Grupo A (controle)	29
4.3.2 Grupo B (tetanização seguida de estiramento)	30
4.3.3 Grupo C (somente tetanização)	31
4.4 Análise estatística	35
4.4.1 Região proximal	35
4.4.2 Região média	35
4.4.3 Região distal	37
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	45
7 RESUMO	47
8 SUMMARY	50
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

---

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão muscular

1.2 Modelos experimentais de lesão muscular

---

1 INTRODUÇÃO

A lesão muscular esquelética é um fenômeno comum associada a uma atividade motora intensa, tanto em humanos (FRIDÉN, SJÖSTRÖM, EKBLOM, 1983; NEWHAM et al., 1983 a, b, 1988), como em animais (JONES et al., 1986; ARMSTRONG, 1984, 1990; ARMSTRONG, WARREN, WARREN, 1991; IRINTCHEV et al., 1993). Pode ser provocada por vários tipos de doenças (miopatias) que afetam o tecido muscular ou, ainda, estar associada ao trauma e à isquemia. Os estiramentos forçados, ou seja, aqueles além da capacidade elástica do músculo, e os exercícios em que predominam contrações excêntricas também provocam lesões musculares em diferentes níveis, dependendo do tipo, da intensidade e da duração (McCULLY & FAULKNER, 1986). A fibra muscular lesada geralmente apresenta necrose segmentar, observando-se ausência de organização miofibrilar e de organelas citoplasmáticas, o que compromete sua capacidade funcional (TIDBALL, 1995).

Os termos alongamento forçado, estiramento e distensão podem ser utilizados como sinônimos para situações em que a capacidade elástica do músculo foi ultrapassada, provocando um foco de lesão muscular. Neste trabalho será utilizado apenas o termo estiramento para designar essa situação.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de modelos experimentais de lesão muscular nas últimas décadas contribuíram para conhecer melhor as alterações morfológicas e fisiológicas envolvidas (GARRETT Jr et al., 1987; GARRETT Jr, 1990; TAYLOR et al., 1993; NOONAN et al., 1994; HASSELMAN et al., 1995).

1.1 Lesão muscular

A lesão muscular por estiramento é reconhecida como uma das mais frequentes no esporte (NIKOLAOU et al., 1987; PETERSON & RENSTRÖM, 1989; TAYLOR et al., 1990; NOONAN et al., 1994), sendo uma lesão indireta provocada por uma força excessiva ou por "stress" no músculo; frequentemente decorre de contrações potentes combinadas com alongamento forçado do músculo (ALMEKINDERS & GILBERT, 1986; STAUBER, 1989; GARRETT Jr, 1990; FRIDÉN & LIEBER, 1992; SPEER, LOOHNES, GARRETT Jr, 1993).

O músculo submetido a um grau de estiramento para o qual ele não está preparado sofre rupturas no sarcolema, ou nas membranas mais resistentes (endomísio, perimísio, epimísio e lamina basal), cuja função é manter a integridade estrutural do tecido muscular (WEINECK, 1991; LAURINO & ALLOZA, 1994), sendo que alterações estruturais na fibra muscular foram observadas em alguns estudos experimentais realizados em humanos (FRIDÉN, SJÖSTRÖM, EKBLOM, 1983; NEWHAM et al., 1983 a, b, 1988; JONES et al., 1986; STAUBER et al., 1990), e também em animais (VIHKO, SALMINEN, ROENTAMÄKI, 1979; ARMSTRONG, OGILVIE, SCHWANE, 1983; STAUBER et al., 1988; FAULKNER, JONES, ROUND, 1989; WARREN et al., 1993 a, b, c, 1994).

Estas alterações são caracterizadas pela migração de células, do tipo macrófagos, monócitos e fagócitos, em direção às fibras lesadas; elas atravessam a lâmina basal e fagocitam o tecido necrosado, deixando a fibra muscular lesada pronta para iniciar um processo de reparação. Em seguida, os ribossomos passam a realizar uma intensa síntese proteica, responsabilizando-se pela reorganização miofibrilar dos filamentos proteicos do sarcoplasma. Entretanto, o que realmente marca o processo de reparação, é a migração das células satélites que, ao chegarem nos focos de lesão, sofrem um processo de

diferenciação celular que se completa com a restauração da fibra muscular (CARLSON & FAULKNER, 1983; ENGEL & BANKER, 1986; WERNIG, SALVINI, IRINTCHEV, 1991).

1.2 Modelos experimentais de lesão muscular

HOUGH (1901) foi o primeiro a descrever as lesões musculares. Em indivíduos que realizavam contrações rítmicas do músculo flexor dos dedos até a exaustão, observou 8 a 10 horas após o início do exercício, dor e inflamação, que pioravam nas 48 a 60 horas seguintes.

McMASTER (1933) realizou, em músculos gastrocnêmios de coelhos, um dos primeiros estudos experimentais de rupturas musculares por estiramento, tendo observado rupturas no ventre muscular e na junção miotendinosa. Porém, utilizou uma preparação osso-tendão-músculo avascular e a força de estiramento não foi controlada.

Mais recentemente, diversos modelos experimentais de lesão muscular foram descritos para estudar as respostas celulares dos músculos lesados, alguns relacionados aos exercícios intensos (ARMSTRONG, OGILVIE, SCHWANE, 1983; KUIPERS et al., 1983; IRINTCHEV & WERNIG, 1987; OGILVIE et al., 1988; BROOKS & FAULKNER, 1990; CLARKSON, 1992; WARREN et al., 1993a, 1993c, 1994) e outros aos estiramentos, quer produzidos de maneira lenta e num único movimento (TAYLOR, SEABER, GARRETT Jr, 1986; ALMEKINDERS & GILBERT, 1986; NIKOLAOU et al., 1987; GARRETT Jr et al., 1987, 1988; REDDY et al., 1993; TAYLOR et al., 1993; TIDBALL, SALEM, ZERNICKE, 1993; NOONAN et al., 1993, 1994; HASSELMAN et al., 1995) quer por movimentos repetitivos ou cíclicos (McCULLY & FAULKNER, 1985, 1986; FRITZ & STAUBER, 1988; STAUBER et al., 1988; FAULKNER, JONES, ROUND, 1989; FRIDÉN, LIEBER, THORNELL, 1991; LIEBER, WOODBURN, FRIDÉN, 1991; LIEBER & FRIDÉN, 1993).

GARRETT Jr et al. (1984), em estudo experimental em coelhos, demonstraram que a ativação muscular provocada pela estimulação de um nervo isolado não provocava, por si só, rupturas musculares. Concluíram que para se obter uma lesão muscular microscópica era necessário o estiramento do músculo.

GARRETT Jr, ALMEKINDERS, SEABER (1984) realizaram um estudo experimental em diferentes músculos de coelhos, provocando uma lesão muscular por estiramento passivo (estiramento sem estímulo muscular). O membro inferior era imobilizado através de um pino e o tendão do músculo era fixado numa máquina universal de ensaio. Demonstraram que as rupturas ocorreram preferentemente próximo à junção miotendinosa, indiferentemente das características arquitetônicas dos músculos utilizados.

GARRETT Jr et al. (1987), em estudo experimental utilizando o músculo extensor longo dos dedos de coelhos, avaliaram a resposta muscular ao estiramento. Os animais foram divididos em três grupos: no primeiro, os músculos eram submetidos a um estímulo elétrico com frequência de 64 Hz (tetania máxima); no segundo, eram estimulados com uma frequência de 16 Hz (estímulo submáximo); e no terceiro, não eram estimulados. Todos os músculos eram estirados até a ruptura, durante a fase de tetania. Observaram que a ruptura, em todos os grupos, ocorria próximo à junção miotendinosa e concluíram que os músculos podem ser lesados quando são incapazes de resistir ao estiramento ou se adaptar a ele.

NIKOLAOU et al. (1987) estudaram experimentalmente o músculo tibial anterior de coelhos submetido a estiramento passivo, sem estimulação muscular, com 80% da força necessária para romper o músculo contralateral, obtendo uma lesão do músculo sem ruptura. Demonstraram, através de análises histológicas, que havia lesão de um pequeno número de fibras musculares, próximo à junção miotendinosa. Vinte e quatro a 48 horas após a produção da lesão ocorria uma reação inflamatória pronunciada.

TAYLOR et al. (1993) avaliaram experimentalmente, em coelhos, as características funcionais e estruturais do músculo extensor longo dos dedos,

após provocarem uma ruptura muscular parcial através de um estiramento passivo. Observaram áreas de ruptura com hemorragia na fibra muscular, próximo à junção miotendinosa distal, correspondente ao mesmo local das lesões musculares nos humanos, com a diferença que nestes as lesões estão associadas a estiramentos ativos, isto é, ao alongamento do músculo enquanto contraído.

TIDBALL, SALEM, ZERNICKE (1993), em estudo experimental utilizando o músculo semitendinoso de rãs, examinaram a localização da lesão no músculo estimulado e não estimulado, submetido ao estiramento até a ruptura. Concluíram que a localização da lesão varia com o estado de ativação muscular. Nos músculos não estimulados a lesão ocorria no ventre muscular próximo da junção miotendinosa, já nos músculos estimulados ocorria na junção miotendinosa.

NOONAN et al. (1994) realizaram um estudo experimental em coelhos, utilizando os músculos extensor longo dos dedos e tibial anterior, com o objetivo de identificar o limiar para se provocar uma lesão muscular, induzida por estiramento passivo com força correspondente a 20% ou 30% da força necessária para causar ruptura. As análises histológicas e biomecânicas dos músculos estirados com 30% da força de ruptura mostraram áreas de ruptura das fibras musculares, acompanhadas de hemorragia, próximo à junção miotendinosa distal e, ainda, uma diminuição das habilidades contráteis. Ao contrário, os músculos extensor longo dos dedos e tibial anterior estirados com 20% da força de ruptura não sofreram alterações histológicas nem biomecânicas, o que sugere a existência de um limiar para se provocar lesão muscular através de um estiramento passivo.

HASSELMAN et al. (1995) realizaram um estudo experimental para determinar a força mínima necessária para lesar o músculo, através de um estiramento ativo, associado à estimulação elétrica. Utilizando uma máquina universal de ensaio, os músculos extensor longo dos dedos e tibial anterior foram estirados ativamente, a uma velocidade de 10cm/seg, com forças de 60%,

70%, 80% e 90% daquela necessária para romper o músculo controle através de estiramento passivo. Os músculos do grupo de 60% não apresentaram anormalidades. No entanto, nos grupos de 70%, 80% e 90% observaram diminuição da força de contração isométrica máxima e ruptura, edema e hemorragia das fibras musculares. As lesões localizaram-se na junção miotendinosa e no ventre muscular.

McCULLY & FAULKNER (1985) relataram um estudo experimental em camundongos, utilizando o músculo extensor longo dos dedos, em que as lesões eram provocadas através de contrações isométricas, concêntricas e excêntricas (alongamento do músculo enquanto contraído), numa máquina de ensaio. Os músculos eram estudados após um, três, sete, quatorze e trinta dias. Com três dias após as contrações excêntricas, as análises histológicas demonstraram a presença de fibras musculares degeneradas, com sinais de ruptura. A regeneração muscular iniciava-se já com quatro dias e era completa ao redor de trinta dias. Concluíram que as contrações excêntricas podem provocar lesões nos músculos esqueléticos, ao contrário das contrações isométricas e das concêntricas.

À partir dessa observação McCULLY & FAULKNER (1986), em experimento semelhante, testaram a influência da duração e da força de estiramento sobre a extensão da lesão, durante as contrações excêntricas. Demonstraram que a lesão aumentava com estiramentos por mais de cinco minutos e que existia uma relação entre o pico da força aplicada e as lesões.

STAUBER et al. (1988), com o objetivo de elucidar o papel das células infiltradas no processo de lesão e reparo muscular, realizaram um estudo experimental em músculos *soleus* de ratos em que as lesões eram induzidas através de um alongamento forçado. Inicialmente, era induzida a tetania do músculo por meio de um estímulo elétrico; durante a contração, era realizado um alongamento forçado, através da flexão dorsal da pata do animal. O procedimento foi realizado 50 vezes em cada músculo (cinco conjuntos de dez repetições). Em

todos os músculos foram observadas lesões graves, com muitas células infiltradas nos espaços intersticiais das miofibrilas.

FAULKNER, JONES, ROUND (1989), com a finalidade de quantificar as lesões nos músculos extensor longo dos dedos e tibial anterior de camundongos, realizaram um estudo experimental em que provocaram um alongamento forçado durante contrações concêntricas e excêntricas. A duração do ciclo alongamento-encurtamento foi de 600ms, com repetição a cada cinco segundos, durante trinta minutos. As contrações musculares eram produzidas em cada fase de encurtamento ou alongamento, através da estimulação elétrica de frequência de 100Hz e duração de 300ms. Demonstraram que, após três a cinco dias da contração excêntrica, todos os músculos extensor longo dos dedos e tibial anterior apresentaram resposta inflamatória e que 65% das fibras do músculo extensor longo dos dedos apresentaram lesão em relação ao controle; nenhuma alteração foi observada no número de fibras do músculo tibial anterior lesado.

BROOKS & FAULKNER (1990) confirmaram os achados de FAULKNER, JONES, ROUND (1989). Utilizando o mesmo modelo em camundongos jovens e idosos, não observaram nenhuma diferença estatística em relação à lesão, porém a regeneração dos músculos lesados no grupo de camundongos idosos foi mais lenta.

ZERBA & FAULKNER (1993) compararam experimentalmente a quantidade de lesão produzida por um único estiramento no músculo extensor longo dos dedos, estimulado eletricamente ao máximo, com a quantidade de lesão produzida por um único estiramento no músculo contralateral não estimulado, mas com o mesmo deslocamento e a mesma velocidade. Demonstraram que ocorria lesões focais, acompanhadas de diminuição de força maior nos músculos estimulados do que nos não estimulados.

As propriedades contráteis e parâmetros morfológicos foram mensuradas experimentalmente (LIEBER, WOODBURN, FRIDÉN, 1991) no músculo tibial anterior de coelhos, uma hora após serem submetidos a contração isométrica, estiramento passivo e estiramento ativo. Observaram no grupo com

estiramento ativo que uma parte significativa das fibras musculares apresentavam graus variados de desorganização do padrão morfológico da banda do sarcômero.

LIEBER & FRIDÉN (1993) estudaram as propriedades contráteis de músculos tibiais anteriores de coelhos, após serem submetidos a contrações excêntricas. Os animais foram divididos em dois grupos, segundo o comprimento final das fibras musculares estiradas, sendo um grupo com estiramento de 25% e o outro com estiramento de 12,5% em relação ao comprimento da fibra muscular normal. A análise morfométrica evidenciou nas secções transversais das fibras a presença de áreas lesadas no músculo e concluíram que não só a intensidade da força aplicada ao músculo provocava as lesões, mas também a magnitude do estiramento muscular ativo.

Como se percebe pela análise dos trabalhos publicados, a compreensão dos fenômenos envolvidos nas lesões por estiramento do músculo esquelético ainda não é completa, demandando novos estudos, que possam eventualmente contribuir para a prevenção e o tratamento daquelas lesões musculares. Além disso, a maioria dos modelos experimentais de lesões musculares por estiramento estudaram a resposta do músculo estirado passiva ou ativamente até a ruptura completa, sendo que as lesões musculares que encontramos clinicamente são devidas ao estiramento ativo, ou seja, estiramento do músculo enquanto contraído, e geralmente incompletas. No esforço para estudar este problema, um modelo experimental de lesão foi desenvolvido para investigar a resposta do músculo *soleus* com tetanização seguida de estiramento.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo experimental de lesão muscular por estiramento mecânico não invasivo, associado à tetania, no músculo *soleus* de ratos adultos (Wistar).

Os efeitos lesivos nas fibras musculares foram avaliados através das técnicas histológicas e histoquímicas e por meio de microscópio óptico, nas regiões proximal, média e distal do músculo *soleus*.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais de experimentação

3.2 Grupos experimentais

3.3 Equipamento utilizado no estudo

3.4 Coleta do material

3.5 Técnicas de avaliação

3.6 Caracterização dos sinais de lesão nas fibras musculares

3.7 Análise estatística

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados vinte e quatro ratos machos da raça Wistar, com peso médio de 245g (variação: 236-254g), obtidos do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Todos foram mantidos em grupos de três a quatro animais em gaiolas plásticas no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de doze horas) controlados, com livre acesso à água e alimentação padrão (ração peletizada).

Previamente à indução da lesão muscular, todos os animais eram pesados, identificados e numerados com marcas produzidas em suas orelhas.

Inicialmente foram utilizados vinte e sete ratos. Três foram excluídos do estudo, sendo um por morte decorrente de acidente anestésico, um por acidente na retirada do músculo para o estudo histológico e outro por artefato de congelamento dos fragmentos do músculo *soleus*, de modo que o grupo final ficou com vinte e quatro ratos, distribuídos em três grupos experimentais.

3.2 Grupos experimentais

Os vinte e quatro animais do grupo final foram distribuídos em três grupos experimentais (A, B e C), de acordo com o tipo de experimento realizado, sendo cinco no Grupo A (Controle), onze no Grupo B (Tetanização seguida de Estiramento) e oito no Grupo C (Somente Tetanização) (Tabela 1). Os animais foram previamente anestesiados na região intraperitonal com Pentobarbital

Sódico¹ na dose de 0,5mg para 100g de peso corporal. No Grupo A (Controle), o músculo *soleus* era simplesmente retirado, à fim de fornecer os parâmetros histológicos normais para comparação com os demais grupos.

No Grupo B (Tetanização seguida de Estiramento), os animais tinham o músculo *soleus* esquerdo submetido à tetania elétrica e, durante a tetania, a um rápido alongamento, de modo a produzir um estiramento muscular. A tetania era obtida com estimulação elétrica de frequência de 25Hz, através de dois eletrodos pequenos, tipo agulha de acupuntura, com 0,29mm de diâmetro e 34mm de comprimento, conectados a um estimulador elétrico e mantida por cinco segundos. O eletrodo positivo era introduzido próximo à região póstero-lateral da fossa poplíteia, e o negativo próximo à inserção do tendão de Aquiles, na pata posterior esquerda. O procedimento completo (tetania seguida de estiramento brusco) era repetido dez vezes consecutivamente, com trinta segundos de repouso entre um e outro, quando a estimulação também era relaxada.

No Grupo C (Somente Tetanização), os animais eram apenas submetidos à tetania do músculo *soleus* esquerdo, com procedimento similar ao utilizado no Grupo B, sem, entretanto, o estiramento.

Após o término do experimento, os animais eram recolocados em suas gaiolas, com livre acesso à ração e água.

Tabela 1 - Grupos Experimentais

A	Controle	5 animais
B	Tetanização seguida de Estiramento	11 animais
C	Somente Tetanização	8 animais
Total		24 animais

¹ Nembutal - Abbott

3.3 Equipamento utilizado no estudo

O equipamento utilizado para o estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

a) Descrição

O equipamento utilizado era composto basicamente por um tubo, uma haste telescópica dentro do tubo, um sistema de suporte (travas) e acessórios (Figura 1).

O tubo media 20cm de comprimento por 6,7mm de diâmetro e dentro dele havia uma haste telescópica, cuja extremidade livre era dobrada em L e que era impulsionada para dentro do tubo por meio de uma mola espiral dupla. A haste media 30cm de comprimento por 6,4mm de diâmetro.

O tubo era dotado de um sistema de travas que permitia manter a haste em posição fixa dentro dele, mesmo estando as molas de telescopiação tensionadas. Uma das travas era de acionamento lento, por meio de um parafuso, e cuja finalidade era permitir a regulação da haste dentro do tubo; a outra trava, funcionava por meio de uma mola, sendo de ação rápida, e sua finalidade era liberar rapidamente a haste, que telescopava imediatamente dentro do tubo.

As molas espirais eram de tensão conhecida ($K=0,0225\text{kgf/mm}$) e estavam presas, de um lado, a um sistema de força, que podia ser destravado e deslizar ao longo do tubo, assim permitindo a regulação da tensão. Do outro lado, estava presa à extremidade em L da haste telescópica, de modo a impulsioná-la para dentro do tubo, uma vez que estivesse armado o sistema.

Uma chapa metálica foi soldada externamente ao tubo, no sentido longitudinal, de modo a permitir a fixação de todo o conjunto a uma morsa.

b) Funcionamento

O animal era posicionado e fixado à mesa de trabalho, em decúbito lateral direito e ao lado do dispositivo de estiramento e sua pata era fixada à extremidade em L da haste telescópica com fitas adesivas.

A haste era protraída 4,0cm até que a pata ficasse na posição desejada, e travada com o parafuso (trava de ação lenta); o sistema de força era ajustado e fixado no tubo, sendo que o ajuste não diferia de um animal para outro.

Acionava-se, então, a trava de ação rápida e soltava-se a de ação lenta, estando agora o sistema armado. Com o músculo *soleus* eletricamente estimulado e em tetania, a trava de ação rápida era solta, com o que a haste era disparada para dentro do tubo sob ação das molas, produzindo uma brusca dorsiflexão da pata do animal, assim estirando o músculo contraído (Figura 2).

Figura 1 - Equipamento utilizado no protocolo de lesão

a - haste de aço	b - sistema de travas
c - sistema de força	d - parafuso
e - 2 molas espirais	

Figura 2 - Fotografia do animal posicionado junto ao equipamento mecânico e estimulador elétrico

c) Energia armazenada nos ensaios

Conhecendo-se a tensão intrínseca das molas (K) e a distância percorrida pela haste, subitamente liberada, dentro do tubo, medida em milímetros, era calculada a energia potencial acumulada em cada procedimento de estiramento, aplicando-se a fórmula:

$$E = \frac{K \cdot x^2}{2}$$

$$E = \frac{2 \times 0,0225 \times (100)^2}{2}$$

$$E = 225 \text{ kgf/mm} = 2,225 \text{ Joule}$$

E = Energia potencial acumulada

K = Constante das molas

x = Curso total do aparelho (já estendido 4cm do ensaio)

Sendo o procedimento repetido 10 vezes consecutivas, a energia acumulada era a soma dos cálculos de cada procedimento individual.

3.4 Coleta do material

Após três dias do experimento, os animais eram sacrificados por inalação de éter anestésico² e em cada um, o músculo *soleus* esquerdo era retirado com ambos os tendões intactos. Uma vez retirado, o músculo era cortado em três fragmentos (região proximal, média e distal) que eram envoltos em talco e colocados em uma placa metálica redonda na posição vertical, com goma adragante. Posteriormente, eram mergulhados em nitrogênio líquido por aproximadamente 45 segundos para congelação e armazenados, separadamente dentro de um recipiente plástico, em um freezer à temperatura de -80°C, até a preparação histológica e histoquímica.

---

² Éter etílico, Rhodia

3.5 Técnicas de avaliação

Cortes histológicos transversais seriados de 8 μ m de espessura foram obtidos dos três fragmentos de cada músculo *soleus* armazenados, em um micrótomo criostato³, mantidos a uma temperatura de -15°C. Três pontos de referência foram utilizados para a obtenção dos cortes:

- a) fragmento proximal: presença do primeiro fusco muscular;
- b) fragmento médio: o ponto de entrada do ramo nervoso no músculo *soleus*;
- c) fragmento distal: ausência de feixes nervosos intramusculares, com presença de tecido conjuntivo na periferia do músculo, indicando proximidade do tendão de sua inserção.

Cortes alternados eram corados, respectivamente pela técnica histológica de azul de toluidina e pelo método histoquímico da reação enzimática para a fosfatase ácida (BARKA & ANDERSON, 1963; BECHMER, TOLOZA, FREITAS NETO, 1976). No primeiro caso, os cortes eram montados em lâminas de vidro e no segundo em lamínulas.

A análise dos cortes corados era realizada num microscópio óptico⁴ e fotomicrografados com filme Kodak Ektar (Asa 25).

Do mesmo modo que para o estudo histológico, cortes transversais seriados de 8 μ m de espessura, obtidos exatamente pelo mesmo processo, foram montados em lamínulas de vidro, submetidos a reação enzimática para fosfatase ácida, depois examinadas e fotografadas da mesma maneira.

Para análise quantitativa das fibras lesadas, foram selecionados dois cortes de cada fragmento (regiões proximal, média e distal), com a coloração pelo azul de toluidina e reação enzimática para fosfatase ácida, respectivamente. A contagem foi realizada no Laboratório de Histologia da Faculdade de Ciências e

---

³ STARLET 2212

⁴ ZEISS, Alemanha

Tecnologia, Universidade Estadual Paulista - Campus de Presidente Prudente, utilizando microscópio óptico⁵.

3.6 Caracterização dos sinais de lesão nas fibras musculares

Uma fibra muscular era considerada portadora de lesão aguda quando era observada a presença de sinais patológicos nas duas colorações realizadas (CARPENTER & KARPATI, 1984; IRINTCHEV & WERNIG, 1987; WERNIG, IRINTCHEV, WERSSHAUPT, 1990). Na coloração pelo azul de toluidina, observavam-se fibras necróticas, com a periferia bem delimitada e o interior com aspecto de vidro fosco e, ainda, basofilia difusa e núcleo centralizado, único ou múltiplos, caracterizando uma completa ausência de organização miofibrilar. As fibras estavam em regeneração, com a mesma coloração, quando se observava também proeminente basofilia periférica, consequente à proliferação ribossômica, e padrão não homogêneo de distribuição das miofibrilas, devido à destruição e fagocitose miofibrilares, que ocorrem durante a reparação das lesões celulares.

À coloração histoquímica eram evidenciados os lisossomos e sua atividade fagocitária nas fibras lesadas. Como tal fenômeno não ocorre nas fibras musculares normais, que não apresentam atividade de fosfatase ácida, a positividade é o melhor critério para caracterização da lesão (CARPENTER & KARPATI, 1984).

Como sinais de lesão crônico foram considerados a presença do núcleo centralizado ou as fibras fragmentadas na ausência dos sinais de lesão agudo descritos acima (IRINTCHEV & WERNIG, 1987; WERNIG, IRINTCHEV, WERSSHAUPT, 1990).

---

⁵ ZEISS, Alemanha

Além dos sinais acima descritos, as técnicas histológicas empregadas demonstraram a presença, tanto no tecido muscular como no tecido conjuntivo, de células invasivas, como macrófagos e fagócitos, que chegam através da circulação, e de células satélites, que migram para os focos de lesão por estarem diretamente envolvidas nas etapas do processo de reparação.

3.7 Análise estatística

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos nos diferentes grupos experimentais (controle, tetanização seguida de estiramento e somente tetanização) foram avaliados três aspectos: a) o número de fibras em regeneração; b) o número de fibras com núcleo centralizado ou fragmentadas; e c) o número total de fibras lesadas. O procedimento estatístico empregado para estas comparações foi o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, que é um teste alternativo à Análise de Variância usual para um fator, sendo utilizado quando as suposições de normalidade dos dados e variância constante dentro dos tratamentos não se verificam.

Nos casos em que a hipótese de igualdade dos tratamentos foi rejeitada, utilizamos testes de comparações múltiplas, que consistem nas comparações de todos os pares de tratamento. O mesmo nível de significância α foi usado aqui, como no teste de Kruskal-Wallis (CONOVER, 1980).

O objetivo destes testes foi determinar quais tratamentos resultaram em mudanças significativas em relação ao grupo controle e entre os grupos tratados. As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$, assinalando-se com asterisco os valores significantes.

Todos os dados estatísticos foram analisados através do Sistema de Análise Estatística (SAS).

4 RESULTADOS

4.1 Generalidades

4.2 Observações histológicas e histoquímicas

4.2.1 Grupo A (controle)

4.2.2 Grupo B (tetanização seguida de estiramento)

4.2.3 Grupo C (somente tetanização)

4.3 Análise quantitativa das fibras musculares com sinais de lesão

4.3.1 Grupo A (controle)

4.3.2 Grupo B (tetanização seguida de estiramento)

4.3.3 Grupo C (somente tetanização)

4.4 Análise estatística

4.4.1 Região proximal

4.4.2 Região média

4.4.3 Região distal

4 RESULTADOS

4.1 Generalidades

Os animais que receberam dose adequada (0,5mg para 100g de peso corporal) de solução de pentobarbital sódico⁶, toleraram bem a anestesia, sendo que apenas um animal não resistiu. Nas horas seguintes ao procedimento, já conseguiam locomover-se nas gaiolas e nos dias subsequentes a marcha era aparentemente normal.

Para constatar se a variação do peso final dos animais não era significativamente diferente entre os grupos, foram obtidos a média e o desvio padrão dos pesos em cada grupo, sendo que não foram observadas alterações estatísticas significativas ($p > 0,05$) (Tabela 2).

---

⁶ Nembutal, Abbott

Tabela 2 - Peso corporal final de ratos dos grupos controle, tetanização seguida de estiramento e somente tetanização

Animais	Grupos Experimentais	Peso Corporal Final (g)	X $\pm$ SD
1	Controle	240	X = 236 SD = 8,21
2		245	
3		240	
4		230	
5		225	
6	Tetanização Seguida de Estiramento	265	X = 249.54 SD = 16.80
7		250	
8		245	
9		250	
10		260	
11		265	
12		250	
13		205	
14		260	
15		255	
16		240	
17	Somente Tetanização	270	X = 253.12 SD = 23.59
18		225	
19		250	
20		295	
21		270	
22		245	
23		230	
24		240	

4.2 Observações histológicas e histoquímicas

4.2.1 Grupo A (controle)

Neste grupo, as fibras musculares, na grande maioria, apresentaram-se com o aspecto morfológico em mosaico e os núcleos situados perifericamente, típico do músculo normal (Figura 3 A, B, C e D).

4.2.2 Grupo B (tetanização seguida de estiramento)

Em todos os animais deste grupo foram observadas fibras com sinais de lesão em graus variados, com diferenças entre os animais.

Com a coloração de azul de toluidina, foi observada a perda da homogeneidade de distribuição das miofibrilas, devida à destruição e fagocitose miofibrilar, além de basofilia periférica, devida à presença de ribossomos, e fibras musculares com núcleo centralizado. Observaram-se, ainda, graus variados de infiltração celular entre as fibras musculares (Figura 4 A e C).

Na reação enzimática para fosfatase ácida, observaram-se fibras com atividade enzimática intracelular positiva, indicando concentração de lisossomos, que significavam fagocitose (Figura 4 B e D).

4.2.3 Grupo C (somente tetanização)

Neste grupo também foram observadas fibras com sinais de lesão, principalmente a presença de fibras musculares com núcleo centralizado, porém em menor número. Em apenas um dos animais, na região proximal havia infiltração celular (Figuras 5 A, B, C e D).

Figura 3 - Cortes transversais do músculo *soleus* de um animal do grupo controle, corados pelo azul de toluidina (A - 250x e C - 400x) e submetidos à reação enzimática para fosfatase ácida (B - 250x e D - 400x), mostrando as fibras musculares sem alterações morfológicas.

Figura 4 - Cortes transversais do músculo *soleus* de um animal do grupo tetanização seguida de estiramento na região média, corados com azul de toluidina (A - 175x e C - 400x) e submetidos à reação enzimática para fosfatase ácida (B - 175x e D - 400x), mostrando fibras em regeneração (seta), núcleo centralizado (asterisco), bem como numerosas células infiltradas entre as fibras musculares. Em B e D, as fibras musculares mostram grânulos corados indicando concentração de lisossomos (estrela). Notar também a infiltração celular.

Figura 5 - Cortes transversais do músculo *soleus* de um animal do grupo somente tetanização na região média, corados com azul de toluidina (A - 250x e C - 400x) e submetidos à reação enzimática para fosfatase ácida (B - 250x e D - 400x), mostrando fibras com núcleo centralizado (asterisco). Notar que não há infiltração celular.

4.3 Análise quantitativa das fibras musculares com sinais de lesão

A análise quantitativa dos sinais de lesão, ou seja, a contagem do número de fibras em regeneração, do número de fibras com núcleo centralizado ou fragmentadas e do número total das fibras lesadas (Tabelas 3, 4 e 5) foi realizada nas regiões proximal, média e distal do músculo *soleus* dos animais do grupo controle ($n = 5$), com tetanização seguida de estiramento ($n = 11$) e somente com tetanização ($n = 8$).

4.3.1 Grupo A (controle)

No grupo controle, o número de fibras com sinais de lesão na região proximal do músculo *soleus* variou de 3 a 9 ($6,8 \pm 2,68$); na região média variou de 2 a 13 ($7,4 \pm 5,31$); e na região distal variou de 11 a 14 ($12 \pm 1,22$) (Tabelas 3, 4 e 5 e Figura 6).

Figura 6 - Número de fibras lesadas no músculo *soleus* de ratos do grupo controle, nas regiões proximal, média e distal.

4.3.2 Grupo B (tetanização seguida de estiramento)

No grupo de animais submetidos à tetanização seguida de estiramento, o número de fibras com sinais de lesão na região proximal do músculo *soleus* variou de 9 a 73 ($42,18 \pm 22,40$); na região média variou de 23 a 118 ($63,36 \pm 37,82$); e na região distal variou de 18 a 47 ($30,81 \pm 11,09$) (Tabelas 3, 4 e 5 e Figura 7).

Figura 7 - Número de fibras lesadas no músculo *soleus* de ratos submetidos à tetanização seguida de estiramento, nas regiões proximal, média e distal.

4.3.2 Grupo C (somente tetanização)

No grupo de animais submetidos somente à tetanização, o número de fibras com sinais de lesão na região proximal do músculo *soleus* variou de 9 a 18 ($12 \pm 3,7$); na região média variou de 20 a 131 ($40,87 \pm 36,88$); e na região distal variou de 9 a 29 ($20 \pm 6,27$) (Tabelas 3, 4 e 5 e Figura 8).

Figura 8 - Número de fibras lesadas no músculo *soleus* de ratos submetidos somente à tetanização, nas regiões proximal, média e distal.

Tabela 3 - Número de fibras com sinais de lesão na região proximal do músculo *soleus* de ratos dos grupos controle, com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização

Animais	Sinais de lesão muscular				Média $\pm$ SD
	Necrose	Infiltração cel. e grumos de cel. infiltradas	No. de fibras em regeneração	No. de fibras com núcleo centralizado	No. total de fibras lesadas
Controle					
1	-	-	8	1	9
2	-	-	3	0	3
3	-	-	4	1	5
4	-	-	3	5	8
5	-	-	4	5	9
					6,8 $\pm$ 2,68
Tetanização seguida de Estiramento					
6	-	+	38	9	47
7	-	+	8	1	9
8	+	++	45	4	49
9	-	-	11	3	14
10	+	-	13	14	27
11	+	++	50	6	56
12	-	-	8	5	13
13	+	++	55	18	73
14	+	++	52	6	58
15	+	+	47	8	56
16	+	++	54	8	62
					42,18 $\pm$ 22,40
Somente com Tetanização					
17	-	-	4	6	10
18	-	-	4	6	10
19	-	-	13	3	16
20	-	-	7	11	18
21	-	-	7	2	9
22	-	-	2	5	7
23	-	+	5	8	13
24	-	-	8	5	13
					12 $\pm$ 3,7

* A presença de infiltração intersticial e necrose foram qualitativamente indicadas: ausente (-), presente (+) e pronunciada (++)

Tabela 4 - Número de fibras com sinais de lesão na região média do músculo *soleus* de ratos dos grupos controle, com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização

Animais	Sinais de lesão muscular				Média $\pm$ SD
	Necrose	Infiltração cel. e grumos de cel. infiltradas	No. de fibras em regeneração	No. de fibras com núcleo centralizado	No. total de fibras lesadas
Controle					
1	-	-	2	0	2
2	-	-	6	0	6
3	-	-	8	5	13
4	-	-	3	0	3
5	-	-	6	7	13
					7,4 $\pm$ 5,31
Tetanização seguida de Estiramento					
6	-	-	39	21	60
7	-	-	18	5	23
8	++	+	93	19	112
9	-	-	16	10	26
10	-	-	19	8	27
11	-	+	16	11	27
12	+	+	58	23	81
13	+	+	40	13	53
14	+	++	96	20	116
15	+	++	105	13	118
16	-	+	43	11	54
					63,36 $\pm$ 37,82
Somente com Tetanização					
17	-	-	16	17	33
18	-	-	25	14	39
19	-	-	19	8	27
20	-	-	19	112	131
21	-	-	16	10	26
22	-	-	12	8	20
23	-	-	10	18	28
24	-	-	16	7	23
					40,87 $\pm$ 36,88

* A presença de infiltração intersticial e necrose foram qualitativamente indicadas: ausente (-), presente (+) e pronunciada (++)

Tabela 5 - Número de fibras com sinais de lesão na região distal do músculo *soleus* de ratos dos grupos controle, com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização

Animais	Sinais de lesão muscular				Média $\pm$ SD
	Necrose	Infiltração cel. e grumos de cel. infiltradas	No. de fibras em regeneração	No. de fibras com núcleo centralizado	No. total de fibras lesadas
Controle					
1	-	-	7	7	14
2	-	-	8	3	11
3	-	-	8	4	12
4	-	-	3	8	11
5	-	-	8	4	12
					12 $\pm$ 1,22
Tetanização seguida de Estiramento					
6	-	-	12	10	22
7	-	-	10	11	21
8	-	+	25	22	47
9	-	-	11	11	22
10	-	-	16	11	27
11	-	+	14	9	23
12	-	+	34	8	42
13	+	+	33	11	44
14	-	+	13	5	18
15	-	-	19	10	29
16	-	+	36	8	44
					30,81 $\pm$ 11,09
Somente com Tetanização					
17	-	-	13	10	23
18	-	-	4	5	9
19	-	-	11	5	16
20	-	-	14	10	24
21	-	-	9	6	15
22	-	-	14	8	22
23	-	-	17	12	29
24	-	-	14	8	22
					20 $\pm$ 6,27

* A presença de infiltração intersticial e necrose foram qualitativamente indicadas: ausente (-), presente (+) e pronunciada (++)

4.4 Análise estatística

4.4.1 Região proximal

Na análise quantitativa dos sinais de lesão da região proximal do músculo *soleus* dos grupos controle, com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização, com relação ao número total de fibras lesadas, foi observada diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$), todavia não identificando qual grupo se mostrava significativamente diferente. Portanto, quando houve diferença significativa entre os grupos, esta análise foi complementada pelo teste de comparações múltiplas, comparando todos os grupos em relação ao grupo controle e entre si. Observamos, então, diferença estatística significativa entre os grupos controle e com tetanização seguida de estiramento e entre este e o grupo somente com tetanização. Entretanto, entre os grupos controle e somente com tetanização não observamos diferença estatística significativa, mostrando que houve maior número de fibras lesadas no grupo com tetanização seguida de estiramento, conforme os resultados da Tabela 3 e da Figura 9.

4.4.2 Região média

Na análise quantitativa dos sinais de lesão na região média do músculo *soleus* dos grupos controle, com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização, com relação ao número total de fibras lesadas, foi observada diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$), porém sem identificar qual grupo se mostrava significativamente diferente. No teste de

comparações múltiplas, todavia, observou-se diferença estatística significativa entre os grupos controle e com tetanização seguida de estiramento e entre os grupos controle e somente com tetanização. Já entre os grupos com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização não encontramos diferença estatística significativa (Tabela 4 e Figura 10).

Figura 9 - Número de fibras lesadas na região proximal do músculo *soleus* de ratos dos grupos controle, com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização.

Observando a Figura 9, verificamos que o número de fibras lesadas no grupo com tetanização seguida de estiramento foi maior que os grupos controle e somente com tetanização.

Figura 10 - Número de fibras lesadas na região média do músculo *soleus* de ratos dos grupos controle, com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização.

Observando a Figura 10, verificamos que o número de fibras lesadas nos grupos com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização foi maior que no grupo controle; porém, não há diferença significativa entre os dois grupos tratados.

4.4.3 Região distal

Na análise quantitativa das fibras musculares com sinais de lesão na região distal do músculo *soleus* nos grupos controle, com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização, foi observada diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Em função deste resultado foi realizado o teste de comparações múltiplas e observou-se, então, que diferença estatística significativa ocorria entre os grupos controle e com tetanização seguida de

estiramento e entre os grupos controle e somente com tetanização, porém sem diferença significativa entre os grupos com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização (Tabela 5 e Figura 11).

Figura 11 - Número de fibras lesadas na região distal do músculo *soleus* de ratos dos grupos controle, com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização.

Observando a Figura 11, verificamos que o número de fibras lesadas nos grupos com tetanização seguida de estiramento e somente com tetanização foi maior que no grupo controle, porém sem diferença significativa entre os dois grupos tratados.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Embora seja conhecido que existe uma alta incidência de lesões musculares em atividades esportivas, principalmente devidas ao estiramento muscular, diversos aspectos sobre as características dessas lesões permanecem obscuras (STAUBER, 1989; GARRETT Jr, 1990; CLARKSON, 1992; FRIDÉN & LIEBER, 1992). Por outro lado, é muito difícil estudar essas lesões em humanos, nos quais seriam necessárias biópsias, com todo seu potencial de recusa e de complicações. Assim, têm-se procurado desenvolver modelos experimentais em que tentam-se reproduzir lesões musculares por estiramento. A maioria desses modelos examinaram a resposta do músculo estirado passivamente até a ruptura completa, sendo que as lesões musculares que encontramos clinicamente são devidas principalmente ao estiramento ativo incompleto, em que uma separação total dos tecidos não ocorre. Neste trabalho, um modelo experimental de lesão foi utilizado para investigar a resposta do músculo *soleus* submetido a tetanização seguida de estiramento, por meio de um equipamento mecânico desenvolvido especialmente para este fim.

Uma grande variedade de animais, como o coelho, o camundongo, o rato e a rã, tem sido empregada nos estudos experimentais. Optamos aqui pelo rato, por ser um animal de fácil manuseio e baixo custo, resistente à anestesia geral e cuja estrutura músculo-esquelética assemelha-se à de humanos. Já o músculo *soleus* foi escolhido por possuir uma estrutura fusiforme e por suas fibras estenderem-se de tendão a tendão, o que lhe confere a característica de terem aproximadamente o mesmo comprimento, de modo que todas elas podem ser analisadas em um único corte histológico transversal obtido na região média do músculo (WILLIAMS & GOLDSPINK, 1973).

Optou-se pelo modelo de estimulação elétrica transcutânea por ser um método praticamente não invasivo, o mesmo ocorrendo com a produção do estiramento, efetuado por meio do equipamento, associado à tetania. Com isso,

houve a vantagem de não introduzir variáveis de difícil controle, como a agressão cirúrgica ao músculo e as suturas. Logo, com o método empregado, simulou-se o mecanismo de lesão por estiramento ativo, similar ao que ocorre nas atividades esportivas em humanos, e que caracteriza-se pelo alongamento abrupto do músculo enquanto contraído, sem, no entanto, resultar em ruptura completa.

A análise histológica foi efetuada no terceiro dia após o procedimento experimental porque, conforme observações de um experimento-piloto realizado anteriormente, é nesse período que as alterações histológicas tornam-se mais claras e evidentes, podendo ser avaliadas qualitativa e quantitativamente, o que também já havia sido relatado por McCULLY & FAULKNER (1985, 1986) e STAUBER et al. (1988). Em humanos também foi demonstrado que nos primeiros dias após o estiramento aparecem no músculo regiões de necrose tecidual e de início de processo reparativo anárquico, que impedem distinguir até mesmo os contornos das fibras musculares lesadas; depois do terceiro dia, as lesões encontram-se em plena fase de reparação, de modo que a diferença entre as fibras lesadas e as normais ficam mais evidentes (FRIDÉN, SJÖSTROM, EKBLOM, 1983; NEWHAM et al., 1983b; CLARKSON, 1992). Assim, foi possível demonstrar nos três níveis pesquisados dos músculos uma ampla variação no número de fibras musculares lesadas entre os animais de um mesmo grupo e entre os grupos (Tabelas 3, 4 e 5), sugerindo que animais da mesma espécie podem ter susceptibilidades diferentes e individuais ao estiramento. Sinais agudos de lesão, como a necrose muscular, o infiltrado celular e a basofilia celular, associados a sinais crônicos de lesão, como o núcleo centralizado, eram achados frequentes no terceiro dia após a tetania seguida de estiramento. Resultados semelhantes também foram relatados por McCULLY & FAULKNER (1985, 1986) e por STAUBER et al. (1988).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o número de fibras lesadas foi maior no grupo de tetanização seguida de estiramento, em relação aos demais grupos, nas três regiões estudadas. A diferença foi estatisticamente significativa em todas as regiões somente em relação ao grupo

controle. Já quando comparado ao grupo somente com tetanização, embora tenha havido diferença considerável em todos os grupos, ela foi estatisticamente significativa apenas na região proximal do músculo. O número de fibras lesadas também foi maior no grupo somente com tetanização do que no grupo controle, em todas as regiões do músculo *soleus*, mas as diferenças observadas foram estatisticamente significantes apenas nas regiões média e distal. Esse fato indica que a tetania por si só pode provocar lesões nas fibras musculares.

Outro achado interessante foi que numa mesma secção transversal do músculo observaram-se, concomitantemente, feixes de fibras lesadas circundados por fibras musculares de aspecto normal, caracterizando heterogeneidade e segmentação das lesões ao longo do músculo, o que provavelmente significa que as tensões transmitidas ao músculo pelo método empregado não se distribuem igualmente por todas as fibras, havendo maior concentração em alguns locais. Onde as tensões foram maiores ocorria a lesão.

Em estudo prévio com músculo *soleus* de ratos submetidos à tetania seguida de alongamento lento e suave, sendo o procedimento repetido 50 vezes (cinco conjunto de dez repetições), foi observada grave lesão muscular, com grande número de fibras lesadas e intenso infiltrado de células mononucleares (STAUBER et al., 1988). No presente estudo, identificou-se também fibras lesadas nos músculos submetidos à tetania seguida de estiramento, porém em número muito menor e com infiltrado celular menos intenso do que no trabalho de Stauber e colaboradores. Esta diferença na quantidade de fibras lesadas entre os dois trabalhos pode ser explicada pelo reduzido número de repetições aqui utilizadas.

Um dos aspectos não devidamente esclarecido na literatura, foi o da localização preferencial da lesão ao longo da fibra muscular. Alguns estudos propuseram que a lesão por estiramento estava restrita somente à região próxima da junção miotendinosa (GARRETT Jr. et al., 1987; TAYLOR et al., 1993; REDDY et al., 1993); já outros autores propuseram que, além da região próxima da junção miotendinosa, a lesão poderia ocorrer também no ventre muscular (STAUBER et

al.,1988; TIDBALL, SALEM, ZERNICKE, 1993; LIEBER & FRIDÉN, 1993; HASSELMAN et al.,1995). No presente estudo, observou-se que a lesão não se restringia somente à região próxima da junção miotendinosa, mas foi observada nas três regiões. Ainda mais, em todas elas, as lesões foram sempre segmentares, ou, seja, acometeram sítios delimitados da fibra muscular e não toda a fibra. A discrepância entre estes locais preferenciais de lesão, pode ser atribuída a diversas variáveis, como o animal utilizado, o mecanismo de estiramento (único ou repetido) e o estado de ativação muscular.

TIDBALL, SALEM e ZERNICKE (1993), trabalhando com o músculo semitendinoso de rãs, demonstraram que o local de lesão muscular pode variar com o estado de ativação muscular, ou seja, nos músculos submetidos ao estiramento sem estimulação prévia a lesão ocorre no ventre muscular próximo da junção miotendinosa, enquanto que nos músculos estimulados a lesão ocorre na junção miotendinosa. Estes achados diferem dos de GARRETT Jr et al. (1987), que observaram, no músculo extensor longo dos dedos de coelhos, que o local da lesão era próximo da junção miotendinosa, estivesse o músculo estimulado ou não. Porém, em ambos os casos o mecanismo de estiramento era através de um único movimento, numa máquina universal de ensaios. Já nos trabalhos de FRITZ & STAUBER (1988) e STAUBER et al. (1988), que estudaram as lesões no músculo *soleus* de rato, o mecanismo de estiramento foi repetitivo, ou seja, os músculos eram submetidos a 50 movimentos de alongamento forçado enquanto tetanizados e a lesão ocorria na região média do ventre muscular, semelhante em parte ao que foi observado neste trabalho, em que lesões foram observadas ao longo de todo o músculo. Tratando-se basicamente do mesmo modelo, as diferenças nos achados talvez possa ser explicada em razão das diferenças na aplicação do movimento de estiramento (lento e suave, mas repetido 50 vezes, no primeiro, e abrupto e violento, repetido dez vezes no segundo).

Os sinais qualitativos, como a necrose e, principalmente, o infiltrado celular mononuclear, foram encontrados nas três regiões investigadas no músculo *soleus*, indicando que a lesão pode ocorrer focalmente em todo o músculo. Mas, a

maior concentração desses sinais na região proximal, no grupo submetido à tetanização seguida de estiramento, neste trabalho, significa que esta é provavelmente a região mais susceptível, fato também observado por OGILVIE et al. (1988), embora a análise quantitativa tenha demonstrado maior número de fibras lesadas na região média.

Os resultados globais obtidos neste trabalho reforçam a idéia de que o estiramento do músculo *soleus* do rato enquanto contraído provoca lesão focal, ou segmentar das fibras musculares, de modo semelhante ao que se observa nas lesões decorrentes de atividades esportivas, em humanos.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. O modelo experimental desenvolvido mostrou-se eficiente para produzir lesão nas fibras musculares, nas regiões proximal, média e distal do músculo *soleus* de ratos (Wistar), detectáveis por estudos histológicos e histoquímicos, três dias após sua produção.

2. A lesão no músculo *soleus* restringiu-se a determinados sítios ao longo das fibras musculares e foi observada em todas as regiões (proximal, média e distal).

3. No grupo de tetanização seguida de estiramento houve maior número de fibras lesadas na região média e maior concentração de infiltrado celular na região proximal do músculo, comparativamente a qualquer outra região dos grupos controle e somente com tetanização.

7 RESUMO

7 RESUMO

Neste estudo foi desenvolvido um modelo experimental de lesão muscular por estiramento mecânico não invasivo do músculo *soleus* de rato.

Ratos machos da raça Wistar, de peso médio 245g, foram usados como animais de experimentação e um dispositivo destinado a causar o estiramento no músculo *soleus* esquerdo foi especialmente construído, sendo dotado de um mecanismo de disparo rápido, para produzir rápida dorsiflexão da pata esquerda.

Foram utilizados 24 ratos, divididos em 3 grupos, segundo o tipo de procedimento realizado, a saber: Grupo A - controle; Grupo B - tetanização seguida de estiramento; e Grupo C - somente tetanização. A tetanização era produzida por estimulação elétrica direta do músculo, através dos eletrodos implantados percutaneamente. Após 3 dias da produção da lesão, os músculos *soleus* esquerdo eram removidos, inseridos em nitrogênio líquido e armazenados em recipiente plástico a -80°C. De cada região do músculo *soleus* (proximal, média e distal) foram obtidos cortes transversais seriados de 8µm, em micrótomo-criostato a -15°C, para análise histológica e histoquímica, respectivamente pelo azul de toluidina e pela fosfatase ácida.

A análise quantitativa das fibras musculares com sinais de lesão era realizada utilizando sempre dois cortes seriados, representativos de cada região estudada, sucessivos e corados cada um por um dos métodos, respectivamente.

As alterações morfológicas indicaram lesão muscular nas 3 regiões estudadas (proximal, média e distal) nos grupos com tetanização seguida de estiramento, comparativamente ao controle, com maior incidência de infiltrado celular na região proximal. Lesão em grau menor foi também evidente nos animais submetidos somente à tetanização.

Esses resultados indicam que o modelo experimental de lesão por estiramento no músculo *soleus* foi eficiente, reproduzindo uma lesão semelhante a que ocorre por traumas esportivos em humanos.

8 SUMMARY

8 SUMMARY

In this study, an experimental model of non-invasive muscle lesion by stretching was developed, in the *soleus* muscle of rats.

Wistar male rats weighing average 245g were used and a device provided with a quick releasing trigger mechanism was specially built to produce stretching of the left *soleus* muscle by means of a sudden dorsiflexion of the left foot.

Twenty four rats were used and distributed in three groups according to the type of procedure under takers, as follows: Group A, control; Group B, *soleus* submitted to tetanus followed by stretching; and Group C, *soleus* submitted only to stretching. Tetanus was produced by means of direct electric stimulation with transcutaneous electrodes implanted in the muscles.

Three days after the procedure the *soleus* muscle were removed, divided in three parts (proximal, intermediate and distal), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Afterwards, 8µm-thick serial sections were obtained from each part of the muscle and dyed alternately by toluidin-blue, for histologic examination, and for acid phosphatase, for histochemical analysis.

Quantitative and qualitative studies of the muscle fibers with indicative signs of lesion were always carried out in two sequential sections for each region of the muscle, being one dyed by each method.

Morphological changes indicated muscle lesion in all three regions of the muscles submitted to tetanus and stretching, as compared to the control muscles, with greater incidence of inflammatory cell invasion in the proximal regions. A lesser degree of lesion was also observed in the muscles submitted only to tetanus.

The results observed are consistent to indicate that the experimental model of *soleus* muscle stretching as studied here was efficient and in some extent, reproduced a similar lesion to that observed in sports trauma, in humans.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁷

01. ALMEKINDERS, L. C., GILBERT, J. A. Healing of experimental muscle strains and the effects of nosteroidal antiinflammatory medication. The American Journal of Sports and Medicine, v. 14, n. 4, p. 303-308, 1986.
02. ARMSTRONG, R. B., OGILVIE, R. W., SCHWANE, J. A. Eccentric exercise - induced injury to rat skeletal muscle. American Physical Society, v. 54, n. 1, p. 80-93, 1983.
03. ARMSTRONG, R. B. Mechanisms of exercise induced delayed onset muscular soreness: a brief review. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 16, n. 6, p. 529-438, 1984.
04. _____. Initial events in exercise - induced muscular injury. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 22, n. 4, p. 429-435, 1990.
05. ARMSTRONG, R. B., WARREN, G. L., WARREN, J. A. Mechanisms of exercise - induced muscle fiber injury. Sports Medicine, v. 12, n. 3, p. 184-207, 1991.
06. BARKA, T., ANDERSON, P. J. Histochemistry: theory, practice and bibliography. New York: Harper & Row, 1963.
07. BECHMER, O. A., TOLOZA, E. M. C., FREITAS NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart e EDUSP, 1976. p. 256.
08. BROOKS, S. V., FAULKNER, J. A. Contraction-induced injury: recovey of skeletal muscles in young and old mice. American Journal Physiology, n. 258, p. 436-42, 1990.

---

⁷ NBR 6023/89 - ABNT

09. CARLSON, B. M., FAULKNER, J. A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 15, n. 3, p. 187-98, 1983.
10. CARPENTER, S., KARPATI, C. Pathology of skeletal muscle. New York, Edinburgh, London, Melbourne: Churchill Livingstone, 1984.
11. CLARKSON, P. M. Exercise - induced muscle damage - animal and human models. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 24, n. 5, p. 510-11, 1992.
12. CONOVER, W. J. Practical nonparametric statistics. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1980. 493 p.
13. ENGEL, A. G., BANKER, B. Q. Myology: basic and clinical. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986.
14. FAULKNER, J. A., JONES, D. A., ROUND, J. M. Injury to skeletal muscle of mice by forced lengthening during contractions. Quarterly Journal of Experimental Physiology, v. 74, p. 661-70, 1989.
15. FRIDÉN, J., LIEBER, R. L. Structural and mechanical basis of exercise - induced muscle injury. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 24, n. 5, p. 521-30, 1992.
16. FRIDÉN, J., LIEBER, R. L., THORNELL, L. E. Subtle indications of muscle damage following eccentric contractions. Acta Physiology Scandinavian, v. 142, p. 523-24, 1991.
17. FRIDÉN, J., SJÖSTRÖM, M., EKBLOM, B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. Int. Journal of Sports and Medicine, v. 4, p. 170-76, 1983.
18. FRITZ, V. K., STAUBER, W. J. Characterization of muscles injured by forced lengthening. Proteoglycans. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 20, n. 4, p. 354-61, 1988.

19. GARRETT Jr, W. E. Muscle strain injuries. Clinical and basic aspects. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 22, n. 4, p. 436-43, 1990.
20. GARRETT Jr, W. E. et al. Recovery of skeletal muscle after laceration and repair. Journal Hand Surgery, v. 9a, p. 683-92, 1984.
21. _____. Biomechanical comparison of stimulated and nonstimulated skeletal muscle pulled to failure. The American Journal of Sports and Medicine, v. 15, n. 5, p. 448-54, 1987.
22. _____. The effect of muscle architecture on the biomechanical failure properties of skeletal muscle under passive extension. The American Journal of Sports and Medicine, v. 16, n. 1, p. 7-12, 1988.
23. GARRETT Jr, W. E., ALMEKINDERS, L., SEABER, A. V. Biomechanics of muscle tears in stretching injuries. Trans. Orthop. Res. Soc., v. 9, p. 384, 1984.
24. HASSELMAN, C. T. et al. A threshold and continuum of injury during active stretch of rabbit skeletal muscle. The American Journal of Sports and Medicine, v. 23, n. 1, p. 65-73, 1995.
25. HOUGH, T. Ergographic studies in muscular soreness. American Journal Physiology, v. 7, p. 76-92, 1901.
26. IRINTCHEV, A., WERNIG, A. Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscle differences. Cell Tissue Res., v. 259, p. 509-21, 1987.
27. IRINTCHEV, A. et al. Differential expression of tenascin after denervation, botulinum paralysis and damage of mouse soleus muscle. Journal of Neurocytology, v. 22, p. 955-65, 1993.
28. JONES, D. A. et al. Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. Journal of Physiology, v. 375, p. 435-438, 1986.

29. KUIPERS, H. et al. Muscle degeneration after exercise in rats. Int. Journal of Sports and Medicine, v. 4, p. 45-51, 1983.
30. LAURINO, C. F. S., ALLOZA, J. F. M. Lesão muscular. Supertreinamento. Arscvrandi - A revista da clínica médica, p. 46-60, julho, 1994.
31. LIEBER, R. L., FRIDÉN, J. Muscle damage is not a function of muscle force but active muscle strain. Journal Applied Physiology, v. 74, n. 2, p. 520-26, 1993.
32. LIEBER, R. L., WOODBURN, J. M., FRIDÉN, J. Muscle damage induced by eccentric contractions of 25% strain. Journal Applied Physiology, v. 70, n. 6, p. 2498-507, 1991.
33. McCULLY, K. K., FAULKNER, J. A. Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contractions. Journal Applied Physiology, v. 59, n. 1, p. 119-26, 1985.
34. _____. Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. Journal Applied Physiology, v. 61, n. 1, p. 293-99, 1986.
35. McMASTER, P. E. Tendon and muscle ruptures. Journal of Bone and Joint Surgery, v. 15, p. 705-22, 1933.
36. NEWHAM, D. J. et al. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contraction of human muscle. Journal of Neurological Sciences, v. 61, p. 109-22, 1983a.
37. _____. Pain and fatigue after concentric and eccentric muscle contractions. Clinical Science, v. 64, p. 55-62, 1983b.
38. _____. Muscle fatigue and pain after eccentric contractions at long and short length. Clinical Science, v. 74, p. 553-557, 1988.

39. NIKOLAOU, P. K. et al. Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury. The American Journal of Sports and Medicine, v. 15, n. 1, p. 9-14, 1987.
40. NOONAN, T. J. et al. Thermal effects on skeletal muscle tensile behavior. The American Journal of Sports and Medicine, v. 21, n. 4, p. 517-22, 1993.
41. _____. Identification of a threshold for skeletal muscle injury. The American Journal of Sports and Medicine, v. 22, n. 2, p. 257-61, 1994.
42. OGILVIE, R. W. et al. Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. The American Journal of Anatomy, v. 182, p. 335-46, 1988.
43. PETERSON, L., RENSTRÖM, P. Lesiones deportivas: su prevención y tratamiento. Barcelona: Jims, 1989.
44. REDDY, A. S. et al. Restriction of the injury response following an acute muscle strain. Medicine and Science of Sports and Exercise, v. 25, n. 3, p. 321-27, 1993.
45. SPEER, K. P., LOHNES, J., GARRETT Jr, W. E. Radiographic imaging of muscle strain injury. The American Journal of Sports and Medicine, v. 21, n. 1, p. 89-96, 1993.
46. STAUBER, W. T. Eccentric action of muscles: physiology, injury and adaptation. Exercise Sports Science Review, v. 17, p. 157-85, 1989.
47. STAUBER, W. T. et al. Characterization of muscles injured by forced lengthening. J. Cellular Infiltrates. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 20, n. 4, p. 345-53, 1988.
48. _____. Extracellular matrix disruption and pain after eccentric muscle action. Journal Applied Physiology, v. 69, n. 3, p. 868-874, 1990.

49. TAYLOR, D. C. et al. Viscoelastic properties of muscle-tendon units. The biomechanical effects of stretching. The American Journal of Sports and Medicine, v. 18, n. 3, p. 300-09, 1990.
50. _____. Experimental muscle strain injury. Early functional and structural deficits and the increased risk for reinjury. The American Journal of Sports and Medicine, v. 21, n. 2, p. 190-94, 1993.
51. TAYLOR, D. C., SEABER, A. V., GARRETT Jr, W. E. Immediate response of muscle to traumatic stretching. Surgical Forum, v. 37, p. 547-49, 1986.
52. TIDBALL, J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 27, n. 7, p. 1022-32, 1995.
53. TIDBALL, J. G., SALEM, G., ZERNICKE, R. Site and mechanical conditions for failure of skeletal muscle in experimental strain injuries. Journal Applied Physiology, v. 74, n. 3, p. 1280-86, 1993.
54. VIHKO, V., SALMINEN, A., ROENTAMÄKI, T. Exhaustive exercise, endurance training, and acid hydrolase activity in skeletal muscle. Journal Applied Physiology, v. 47, p. 43-50, 1979.
55. WARREN, G. L. et al. Excitation failure in eccentric contraction - induced injury of mouse soleus muscle. Journal of Physiology, v. 468, p. 487-99, 1993a.
56. _____. Materials fatigue initiates eccentric contraction - induced injury in rat soleus muscle. Journal of Physiology, v. 464, p. 477-89, 1993b.
57. _____. Mechanical factors in the initiation of eccentric contraction - induced injury in rat soleus muscle. Journal of Physiology, v. 464, p. 457-475, 1993c.
58. _____. Eccentric contraction - induced injury in normal and hindlimb - suspended mouse soleus and E.D.L. muscles. Journal Applied Physiology, v. 77, n. 3, p. 1421-30, 1994.

59. WEINECK, J. Biologia do esporte. São Paulo: Manole, 1991. p. 599.
60. WERNIG, A., IRINTCHEV, A., WERSSHAUPT, P. Muscle injury cross - sectional area and fibre type distribution in mouse soleus after intermittent wheel - running. Journal of Physiology, v. 428, p. 639-52, 1990.
61. WERNIG, A., SALVINI, T. F., IRINTCHEV, A. Axonal sprouting and changes in fibre types after running - induced muscle damage. Journal Of Neurocytology, v. 20, p. 903-13, 1991.
62. WILLIAMS, P. E., GOLDSPINK, G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibers. Journal of Anatomy, v. 116, n. 1, p. 45-55, 1973.
63. ZERBA, E., FAULKNER, J. A. Injury after single stretches of passive and maximally activated whole muscle of anaesthetized mice. Journal of Physiology, v. 459, p. 443, 1993.