

ANÁLISE MORFOLÓGICA A CURTO E LONGO PRAZO DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR APÓS CONTUSÃO

Morphological Analyse in a Short and Long-Term of Tibialis Anterior Muscle After Contusion

Fábio Augusto Facio¹
Viviane Balisardo Minamoto²

Resumo

Apesar de documentada a regeneração muscular após contusão, existe a preocupação dos profissionais envolvidos com a reabilitação na determinação do início do retorno das atividades dos atletas, uma vez que não existe relação direta entre regeneração e sinais e/ou sintomas indicativos de restabelecimento muscular. O objetivo deste trabalho foi analisar a curto e longo prazo o músculo tibial anterior (TA) de rato após contusão. Vinte e oito ratos foram divididos em grupos controle e contusão. A contusão foi realizada por meio de carga (284g) liberada de altura de 30cm sobre o músculo TA, sendo estes analisados após 3 e 28 dias. Cortes histológicos (10 mm) dos músculos congelados foram obtidos de micrótomo criostato e corados com Azul de Toluidina. Animais contundidos e analisados após 3 dias apresentaram alta incidência de sinais de fibras lesadas e/ou em regeneração. No grupo contundido e analisado após 28 dias os sinais predominantes foram de fibras regeneradas, embora tenha sido observada presença de fibras em regeneração. A presença de fibras musculares lesadas e em regeneração, 3 e 28 dias pós-lesão, sugere cuidados na prática desportiva tanto a curto quanto a longo prazo, a fim de se evitar recidivas a lesões.

Palavras-chave: Lesão muscular; Contusão; Regeneração muscular; Tibial anterior.

Abstract

It is well-documented the muscle regeneration after contusion, although the timing of return to the activities, after muscle damage, is a challenging management decision for the therapist, since there is no direct relation between regeneration and signs and/or symptoms related to muscle recovery. The aim of this study was to analyze short and long-term rat tibialis anterior (TA) muscle regeneration after contusion. Twenty-eight rats were divided into control and contusion groups. The contusion was produced by a mass (284g) dropped from a height of 30 cm in the TA muscle, and the muscles were analyzed after 3 and 28 days. Histological sections (10mm) from the frozen muscles were obtained by a cryostat microtome and they were stained with Toluidine Blue. Animals submitted to contusion and analyzed after 3 days showed high incidence of muscle fiber injury and signs of muscle fiber in process of regeneration. In the group submitted to contusion and analyzed after 28 days it was observed predominance of regenerated muscle fiber, although it was also observed muscle fiber in process of regeneration. The presence of damaged muscle fiber and signs of muscle fiber in regeneration, 3 and 28 days after the contusion, suggest attention in the physical activities, to avoid the increased risk of reinjury.

Keywords: Muscle injury; Contusion; Muscle regeneration; Tibialis anterior.

¹ Aluno de Iniciação Científica do Curso de Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba.

² Docente do PPG Fisioterapia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba.

Correspondência: Prof.^a Dr.^a Viviane Balisardo Minamoto

Curso de Mestrado em Fisioterapia, FACIS - UNIMEP

Rodovia do Açúcar, km 156, 13400-911, Piracicaba/SP e-mail: vbminamo@unimep.br

Introdução

Atualmente, um grande número de pessoas encontra-se envolvida na área desportiva. Esse aumento na realização de exercícios acabou por incrementar em grande escala o número e tipo de lesões que acometem os indivíduos. Entre os sistemas mais lesados nessas atividades está o muscular, mais especificamente, o músculo esquelético (1, 2, 3).

Por muito tempo acreditou-se que, uma vez lesado, o músculo sempre responderia à lesão com a formação de tecido fibrótico. Entretanto, Mauro (4) relatou a existência da célula satélite e, desde então, a capacidade de regeneração muscular está bem estabelecida (2, 5, 6, 7).

Assim, a fibra muscular pode responder à lesão com regeneração ou formação de fibrose no local lesado. Esses dois eventos podem ocorrer simultaneamente, sendo o último capaz de inibir completamente a regeneração (8, 9). O sucesso da regeneração em detrimento da fibrose dependerá da severidade, causa e intervenção realizada após a lesão, entre outros fatores (3, 8, 10).

Após uma contusão, os segmentos íntegros, adjacentes ao segmento lesado, retraem-se fazendo com que um espaço seja formado entre eles. Devido à lesão de capilares existentes no músculo, que é ricamente vascularizado, ocorre infiltração de sangue no local lesado que posteriormente será substituído por tecido cicatricial frouxo (3, 11). Este tecido de granulação é necessário para manter os segmentos unidos, o que permitirá posteriormente a regeneração muscular. Entretanto, quando a formação dele é excessiva, ele impedirá tanto a regeneração quanto a inervação das miofibras (8).

A fase da necrose tecidual, iniciada pelo aumento do influxo de cálcio gerado pelos danos ocorridos no sarcoplasma ou no retículo sarcoplasmático da fibra, é seguida de resposta inflamatória, que se inicia por meio das células inflamatórias que invadem a área lesada e também por enzimas quimiotáticas liberadas pelas fibras necrosadas. Deste modo, ocorre a fagocitose das células lesadas, fator de grande importância para que ocorra a regeneração muscular (7, 12).

Quando os fatores envolvidos na lesão são mais propícios para a regeneração do que para a formação de fibrose, ocorre a ativação das células miogênicas, conhecidas como células satélites.

Estas são células quiescentes localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema das miofibras e estão envolvidas com o processo de regeneração (13). O estímulo lesivo é suficiente para sua ativação, ocorrendo então a multiplicação delas e diferenciação em fibras musculares, que se fundem com as fibras previamente lesadas. Vários são os fatores envolvidos na ativação das células satélites para multiplicação e fusão delas e estudos mostram que o IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) e o HGF (*hepatocyte growth factor*) possuem importante papel nesse processo (7, 14).

Por fim, ocorre a reinervação das fibras regeneradas, indispensável pela maturidade funcional e histoquímica delas (3, 7, 15).

Apesar de bem esclarecida na literatura a seqüência de eventos que ocorre após a lesão muscular, existe a preocupação em relação ao tempo necessário para o atleta retornar às suas atividades posteriormente a ela. Deste modo, é um desafio para os profissionais envolvidos com a reabilitação a determinação do início das atividades após lesão muscular, uma vez que não existe relação direta entre regeneração completa e sinais e/ou sintomas indicativos de restabelecimento muscular observados na prática. Assim, o tempo de regeneração é mais lento do que os achados clínicos observados (16).

Com base no exposto, o presente estudo tem como objetivo a análise morfológica, a curto e longo prazo, do Tibial Anterior de rato submetido à lesão causada por contusão, lesão esta bastante semelhante a traumas encontrados no meio esportivo. Essa análise mostra-se de importância para a escolha da conduta terapêutica indicada ao paciente encaminhado à fisioterapia.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 28 ratos machos *Wistar* com peso corporal entre 290 e 333 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP). Os animais foram mantidos em grupos de 4 em gaiolas de polietileno com ração peletizada e água *ad libitum* e foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12h, com temperatura controlada. Foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

a) grupo controle: animais foram sacrificados após 3 (n=7) e 28 dias (n=7).

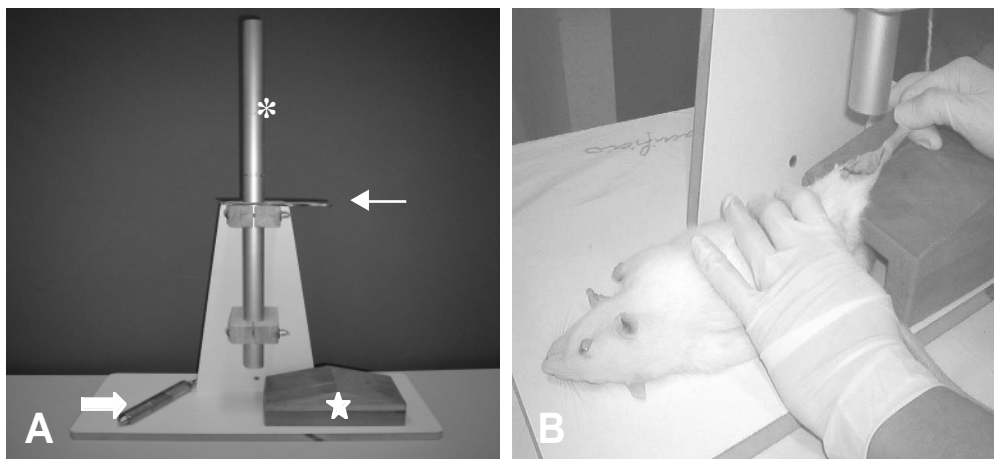
b) grupo contusão: animais foram submetidos à contusão no tibial anterior direito (TAD) e sacrificados após 3 (n=7) e 28 dias (n=7).

Previamente à contusão, os animais foram anestesiados com Ketalar® (50mg/mL) e Rompun® (2g/100mL), na proporção de 1:1, na dose de 0,3ml/300g, via intramuscular, na região do tríceps sural esquerdo, tricotomizados na região ântero-lateral da pata direita e a região referente ao músculo TAD foi delimitada superficialmente com o auxílio de caneta.

A contusão muscular foi produzida com equipamento específico, em que foi li-

berada carga de 284 g a uma altura de 30 cm na região do músculo TAD (Figura 1A), sendo realizadas quatro descargas de peso sobre o músculo, sendo duas na região média-proximal e outras duas na região média-distal. A descarga foi realizada com o animal em decúbito lateral e a pata posterior direita imobilizada manualmente em alongamento por meio da flexão plantar do tornozelo (Figura 1B). Segundo Armstrong, Ogilvie, Schwane (17), o músculo fica mais susceptível à lesão quando se encontra em alongamento.

Figura 1- A: Equipamento para a produção da contusão no músculo tibial anterior do rato. Observa-se a plataforma de madeira, o tubo de alumínio (asterisco) por onde corre livremente a carga de aço inoxidável (seta grossa), uma base de madeira de 4cm de altura com inclinação de 14° (estrela), para o correto posicionamento da pata direita do rato e um dispositivo que trava e gradua a altura em que é liberada a carga de aço inoxidável (seta fina). B: Animal imobilizado manualmente, com flexão plantar máxima da pata.



Todos os animais foram pesados no primeiro e último dia do experimento, para obtenção do peso corporal inicial e final. Após o sacrifício, os músculos foram pesados em balança analítica (UMARK, mod. 210A) para obtenção do peso muscular, calculado por meio da relação com o peso corporal.

Baseados em estudos prévios realizados no nosso laboratório, foi possível verificar que a região distal dos músculos apresentou maior porcentagem de lesão em relação às regiões média e proximal. Sendo assim, esta foi a região escolhida para análise histológica. Deste modo, após a pesagem do músculo, a porção distal foi obtida e

fixada com “gum tragacanth” em pequeno pedaço de madeira. As amostras foram pré-congeladas em iso-pentano e posteriormente em nitrogênio líquido, sendo estocadas em galões de nitrogênio líquido até o momento da obtenção dos cortes histológicos.

Foram obtidos cortes histológicos transversais de 10 mm, por meio de micrótomo criostato (Ancap, mod. 300), sendo as lâminas coradas com Azul de Toluidina. A característica morfológica do músculo TA foi analisada por meio de microscópio de luz (Olympus BX 41), e somente 1 corte por lâmina foi analisado.

Os sinais de lesão ou de fibras em regeneração foram caracterizados por: necrose celular; hipercontração dos miofilamentos, infiltração tecidual de células, basofilia periférica ou generalizada e fibras musculares com núcleo centralizado e nucléolo proeminente (5). Já os sinais de fibras regeneradas foram caracterizados pela presença de fibras musculares fragmentadas e fibras com núcleo centralizado (13, 18).

A análise da intensidade dos sinais de lesão (leve, moderada e grave) foi realizada por um mesmo observador para minimizar a subjetividade da avaliação. A intensidade leve foi atribuída quando os sinais de lesão apresentavam-se de forma discreta, quando poucas fibras/área foram observadas com os sinais. As intensidades moderada e

grave foram atribuídas conforme o aumento da presença dos sinais.

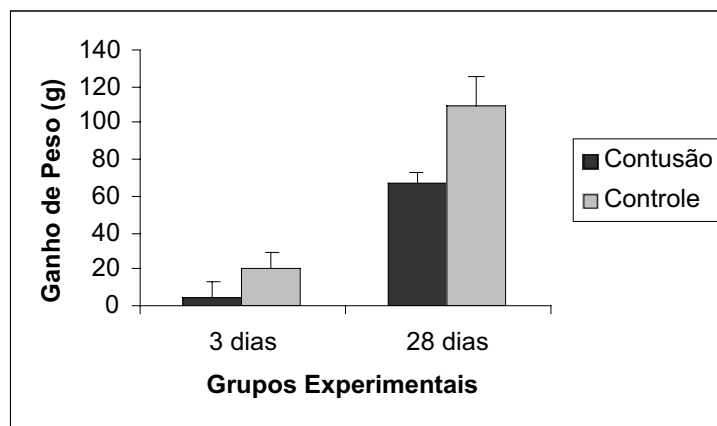
O procedimento estatístico utilizado foi o teste *T-Student*, com nível de significância de 5%.

Resultados

Peso Corporal e Muscular

Os resultados mostram que os animais submetidos à contusão apresentaram menor ganho de peso corporal quando comparados aos grupos controle, tanto no grupo 3 dias ($3,93 \pm 8,62$ g versus $20,2 \pm 9,1$ g, respectivamente, $p \leq 0,05$) quanto no 28 dias ($67 \pm 5,15$ g versus $109 \pm 16,60$ g, respectivamente; $p \leq 0,05$) (Figura 2).

Figura 2 – Média de Ganho de peso (g) dos animais traumatizados e não traumatizados
* diferença significativa quando comparado com o grupo controle ($p \leq 0,05$)

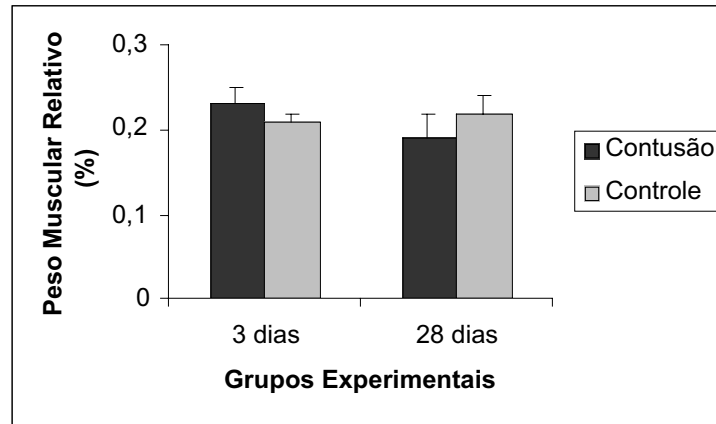


Com relação ao peso muscular, observou-se que os animais avaliados após 3 dias apresentaram maior peso muscular relativo no grupo contusão quando comparados com o grupo controle ($0,23 \pm 0,02\%$ versus $0,21 \pm 0,01\%$, $p \leq 0,05$, respec-

tivamente). Resultados contrários foram observados nos animais avaliados após 28 dias, ou seja, o grupo contusão apresentou menor peso muscular relativo que o grupo controle ($0,19 \pm 0,03\%$ versus $0,22 \pm 0,02\%$, $p \leq 0,05$; respectivamente) (Figura 3).

Figura 3 – Peso Muscular relativo (%) do TAD dos animais dos grupos controle e contusão

** diferença significativa quando comparado com o grupo controle (p£0,05)*



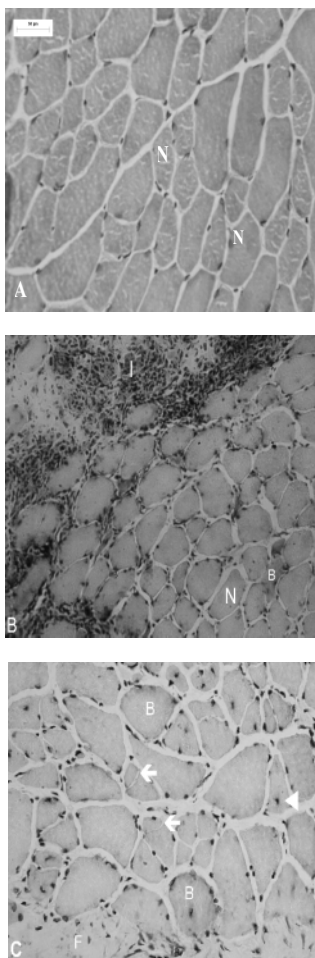
Característica Morfológica do Músculo TAD

Os animais do grupo controle não apresentaram incidência de sinais indicativos de lesão muscular, apresentando células com formato hexagonal e núcleos periféricos (Figura 4A).

Os animais do grupo contusão e analisado após 3 dias apresentaram sinais indicativos de

lesão muscular e de fibras em processo de regeneração. Dentre os sinais observados houve predominância de infiltração celular (Figura 4B). Por outro lado, nos animais avaliados após 28 dias, houve predominância de sinais de fibras regeneradas, mas sendo também observadas algumas fibras em processo de regeneração (Figura 4C).

Figura 4- Músculo tibial anterior dos grupos controle (A), contusão 3 dias (B) e contusão 28 dias (C). Observar fibras normais (N), infiltrado (I), basofilia (B), fibra com núcleo centralizado (cabeça de seta) e fibras fragmentadas (seta). Coloração Azul de Toluidina, A,C (400x), B (200x).



Discussão

O modelo de lesão muscular por meio da contusão foi o escolhido para este estudo devido à alta incidência deste tipo de lesão no meio desportivo.

Apesar de todos os animais apresentarem sinais de lesão, pôde ser observado que existe diferente susceptibilidade entre os animais a este estímulo lesivo, uma vez que houve variabilidade na severidade da lesão. Essa variabilidade pode também ser conseqüência do modelo de lesão utilizado, apesar de os cuidados para que não houvesse variáveis que interferissem na produção da lesão, como, por exemplo, a atenção para o bom

posicionamento de todos os animais no momento da contusão.

Os resultados do presente estudo mostram que uma lesão local pode ter influências sistêmicas, observada por meio da diminuição de ganho de peso corporal quando comparado os animais contundidos com os controles. Essa alteração pode ter decorrido do estresse submetido aos animais, o que pode influenciar na ingesta e/ou metabolismo deles (19).

A influência da lesão no peso muscular pode ser observada por meio do aumento de peso do músculo lesado e analisado após 3 dias, quando comparado ao contralateral. Esse aumento do peso pode ser conseqüência de processo

inflamatório evidente nos primeiros dias após a lesão, uma vez que autores descrevem que o maior pico de creatina quinase, enzima indicadora de lesão, é de 3 a 5 dias posteriormente a ela (20). Assim, o edema resultante do processo inflamatório pode estar envolvido nessa diferença de peso (1).

Já o período de 28 dias pode ter sido suficiente para a resolução do edema, e a diminuição de peso encontrada no músculo traumatizado pode ser devido à diminuição da síntese e/ou aumento da degradação protéica muscular (21). Importante enfatizar que período de 28 dias não foi o suficiente para que o músculo apresentasse peso similar ao controle, o que sugere atrofia muscular a longo prazo após a lesão.

A maioria dos estudos realizados que envolvem a análise estrutural do músculo utiliza-se de animais experimentais, mas esses resultados apresentam boa aplicabilidade em músculos de humanos. Sabe-se que as fases do processo de regeneração são similares entre os mamíferos, portanto, entre ratos e humanos, ocorrendo apenas diferença temporal em relação à duração do processo, sendo nos homens mais longo (10).

A análise histológica mostrou que após 3 dias de lesão as fibras do músculo contundido apresentaram diferentes estágios celulares. Assim, foi observado sinais precoce de lesão, evidenciado por meio da infiltração celular, e sinais de fibras já em regeneração, como basofilia e fibras com núcleo centralizado e nucléolo proeminente, sinais característicos de alta síntese protéica (7).

Sabe-se que a vascularização tem importante relação com a regeneração (22). Deste modo, as fibras que apresentam maior suprimento sanguíneo podem estar em estágio de regeneração mais avançado. Além disso, a diferença nos sinais de lesão observada entre as células pode ser decorrente da maior severidade da lesão em alguns feixes, ou seja, naqueles lesados diretamente pelo impacto.

Trabalhos prévios na literatura mostram que após contusão o músculo encontra-se totalmente regenerado entre o 14º e 24º dias (1, 23). Entretanto, esses dados não condizem com os resultados do presente trabalho, pois além de fibras regeneradas, o músculo analisado após 28 dias ainda apresentou incidência de fibras lesadas.

Além da lesão, também foi evidenciada área de fibrose, sugerindo comprometimento da

capacidade funcional do músculo. Sabe-se que o processo natural de reparo tecidual envolve um complexo balanço entre regeneração e formação de tecido de cicatrização (24), sendo alguns determinantes do aparecimento da fibrose o comprometimento vascular, a severidade da lesão e má intervenção realizada posteriormente a ela (8,10).

Conclusão

Com base no exposto, sugere-se que as mudanças morfológicas do músculo após lesão, como observadas neste estudo, sejam acompanhadas de comprometimento da *performance* muscular. Assim, são necessários cuidados tanto a curto (3 dias) quanto a longo (28 dias) prazo após contusão, uma vez que o músculo tibial anterior apresentou fibras em regeneração em ambos períodos, sendo, portanto, mais susceptível a recidivas.

Agradecimentos

Apoio Financeiro: FAPESP (02/07171-0), FAP-UNIMEP (314/02) e bolsa FAPIC (12803).

Ao aluno Renato Henrique Benatti Neto, do Curso de Graduação em Fisioterapia, pela confecção do equipamento utilizado para a realização da contusão muscular e pelo auxílio nos estudos pilotos para produção da lesão.

Referências

1. Fisher BD, Baracos VE, Shnitka TK, Mendryk SW. Ultrastructural events following acute muscle trauma. **Med Sci Sports Exerc** 1990;22(2):185-93.
2. Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. **Pathol Res Pract** 1991;187 (1):1-22.
3. Jarvinen TAH, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H. Muscle Strain Injuries. **Curr Opin Rheumatol** 2000;12 (2):155-61.
4. Mauro FS. Satellite cells of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol** 1961;9:493-5.
5. Minamoto VB, Bunho SR, Salvini TF. Regenerated rat skeletal muscle after periodic

- contusions. **Braz J Med Biol Res** 2001;34:1447-1452.
6. Lieber RL, Fridén J. Mechanisms of muscle injury gleaned from animal models. **Am J Phys Med Rehabil** 2002;81 (11 Suppl):S70-9.
 7. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev** 2004;84(1):209-38.
 8. Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. **Scand J Sci Sports** 2000;10 (6):332-7.
 9. Lehto M, Jarvinen M, Nelimarkka O. Scar formation after skeletal muscle injury. A histological and autoradiographical study in rats. **Arch Orthop Trauma Surg** 1986;104 (6):366-70.
 10. Kannus P, Parkkari J, Jarvinen TA, Jarvinen M. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. **Scand J Med Sci Sports** 2003;13 (3):150-4.
 11. Leech SJ. Review of muscle healing. **J Physiot** 1997:15-18.
 12. Vierck J et al. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. **Cell Biol Int** 2000;24 (5):263-72.
 13. Engel AG, Armstrong CF. **Myology**. United States of America: McGraw-Hill; 1994.
 14. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. **Dev Biol** 1998;194(1):114-28.
 15. Menetrey J et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. **J Bone Joint Surg Br** 2000;82(1):131-7.
 16. Orchard, J.; Best TM. The management of muscle strain injuries: an early return versus the risk of recurrence. **Clin J Sport Med** 2002;12(1):3-5.
 17. Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. **J Appl Physiol** 1983;54(1):80-93.
 18. Schmalbruch, H. Muscle fiber splitting and regeneration in diseased human muscle. **Neuro Appl Neurobiology** 1976;2:3-19.
 19. Hall JE, Guyton AC. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
 20. Sayers SP, Clarkson PM, Lee J. Activity and immobilization after eccentric exercise: II. Serum CK. **Med Sci Sports Exerc** 2000;32 (9):1593-7.
 21. Emery PW, Ghossein-Chouei A. Effect of surgical trauma on muscle protein synthesis in the rat. **Br J Surge** 1994;81(4):539-42.
 22. Lefaucheur JP, Sebillé A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. **Neuromuscul Disord** 1995;5(6):501-9.
 23. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. **Am J Sports Med** 1994;22(5):702-10.
 24. Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injuries: current treatment options. **J Am Acad Orthop Surg** 2001;9(4):227-37.

Recebido em: 06/06/2005

Received in: 06/06/2005

Aprovado em: 06/02/2006

Approved in: 02/06/2006