

Morfologia e histoquímica do tecido muscular esquelético de ratos após estiramento

Morphological and histochemical skeletal muscle tissue of rats after stretch

MALHEIRO COM, CASTOLDI RC, ANARUMA CA. Morfologia e histoquímica do tecido muscular esquelético de ratos após estiramento. **R. bras. Ci. e Mov** 2013;21(4): 63-72.

Olga C. de M. Malheiro¹
Robson C. Castoldi¹
Carlos A. Anaruma¹

¹Universidade Estadual Paulista

RESUMO: A lesão muscular constitui parte integrante do processo de adaptação a certos tipos de treinamento físico. Em atletas altamente treinados, a lesão muscular, representa uma resposta capaz de acelerar o turnover protéico. O presente trabalho teve por finalidade avaliar a morfologia, e as características metabólicas e contráteis dos tipos de fibras musculares. Foram utilizados 10 ratos Wistar com peso corporal médio de 350g com idade de 70 dias. Os animais foram submetidos a um estímulo elétrico (tetania) e a um estímulo mecânico (estiramento). Após 48h os animais foram eutanasiados mediante uma dose de pentobarbital sódico. Fragmentos da cabeça medial do músculo gastrocnêmio foram imersas em N-Hexana a -70° Cortes (8 µm) obtidos em um micrótomo criostato, (-20°C), foram corados pela HE e outros submetidos as reações NADH-TR e m ATPase, (pH 4,6 e 10,4). O padrão fascicular mostrou-se desorganizado. Ao lado de várias fibras com diferentes estágios de fagocitose, observou-se um intenso infiltrado plasmolinfocitarios, com elevado numero de macrófagos, células miosatélites e células mesenquimatosas, e áreas com ausência de células musculares. A atividade oxidativa revelou-se levemente aumentada em todos os tipos de fibras normais e muito diminuída nas fibras em fase de fagocitose. Conforme revelado pela reação m-ATPase, após pré-incubação alcalina e ácida, lesões foram observadas nas fibras de contração lenta (Tipo I) e nas de contração rápida (Tipo II). Assim, decorridas 48h após o estímulo de tetania e estiramento mecânico, a lesão de fibras acompanhada de processo de fagocitose e o infiltrado de células miosatélites, macrófagos e células mesenquimatosas, foram os eventos mais evidentes. Em nível do tipo de fibras, as lesões comprometeram ambos os tipos.

Palavras-chave: Rato; Tetania; Lesão; Estiramento; Músculo Esquelético.

ABSTRACT: Muscular injury constitutes an integral part of the adaptation process to certain types of physical training. In highly trained athletes, muscular injury, or so it seems, represents a response capable of speeding up the protein turnover. The goal of the present work was to evaluate the degree of morphologic alteration, as well as the metabolic and contractile characteristics of types of muscle fibers. Ten Wistar rats were used with an average corporal weight of 350g. The animals were submitted to both an electrical stimulation (tetany) and a mechanical stimulation (stretching). After 48h the animals were euthanized by means of a dose of pentobarbital, followed by the removal of the medial head of the gastrocnemius muscle. The muscular samples were first immersed in N-Hexan at -70°C, and then placed in a microtome cryostat at -20°C, where transversal cuts (8 µm) at the longest axle of staple fibers were obtained. Some cuts were submitted to HE and others to the reactions for NADH-TR and mATPase, (pH 4.6 and 10.4). In addition to some staple fibers in different stages of phagocytosis, an intense infiltration was observed, with a large number of macrophages, mesenchyma and myosatellite type cells, and areas with an absence of muscular cells. The oxidative activity was seen to be slightly augmented in all types of normal fibers but significantly decreased in fibers in the phagocytosis phase. As revealed by the m ATPase reaction after the acid and alkaline pre-incubation phase, lesions were observed in the two types of fibers, slow and fast contraction (Type I e II). Thus, 48 hours after the tetany/stretching, the lesion of fibers followed by the phagocytosis process and the infiltration of myosatellite cells, macrophages and mesenchymal cells were the most observed events. Regarding the types of fibers, the lesion seems to compromise both types.

Key Words: Rat; Tetany; Injury; Stretch; Skeletal Muscle.

Enviado em: 15/01/2013
Aceito em: 18/09/2013

Contato: Olga Cristina de Mello Malheiro - olgaunesp@hotmail.com

Introdução

O exercício físico regular promove uma série de adaptações nos mais diversos sistemas orgânicos, sendo um deles, o músculo estriado esquelético¹. Em treinamentos de alta intensidade ou de longa duração, a fadiga muscular pode comprometer a biomecânica. Além disso, o aquecimento inadequado ou condições climáticas desfavoráveis podem desencadear lesões na musculatura esquelética^{2,3}.

Estudos relatam que a lesão muscular pode fazer parte integral do processo de adaptação a certos tipos de treinamento desencadeando o processo denominado “microtrauma adaptativo”^{4,5}. Em uma revisão de estudos de danos musculares causados por exercício, notaram que existem semelhanças entre as respostas inflamatórias agudas e imunológica⁶. De acordo com Xhardez⁷ Gould⁸ a lesão muscular é caracterizada pelo rompimento de fibras musculares, resultantes de traumatismo direto (impacto). No traumatismo indireto, a causa primária é proveniente de uma hiperextensão em músculos mal condicionados ou por uma contração muscular acima do limiar fisiológico de contratilidade.

As lesões decorrentes deste processo são geralmente provocadas por uma força excessiva aplicada de forma descontrolada. Neste contexto, enquadram-se as lesões decorrentes de contrações potentes combinadas com alongamento forçado do músculo, também denominadas de estiramento muscular^{9, 10}.

Estiramentos são lesões traumáticas da unidade miotendínea causadas de modo agudo como uma contração abrupta, ou crônico como no uso excessivo, também podem ocorrer pelo alongamento muscular ou pela combinação de contração e alongamento^{11,12}. No exercício, o dano que acontece durante o movimento excêntrico, é provavelmente resultado de uma alta tensão mecânica imposta às fibras, seguida de uma resposta inflamatória cálcio-induzida, como também da produção de radicais livres que causam danos adicionais durante vários dias após o exercício^{13,14}.

Neste campo da investigação, existe uma grande dificuldade de se obter amostras musculares por meio de biópsias em seres humanos. Dessa forma, pesquisas

utilizando animais, podem ser uma forma de se explorar os mecanismos da lesão muscular provocadas por estiramentos. Além disso, modelos de aparelhos mecânicos elétricos podem induzir uma lesão muscular e assim possibilitar o estudo desse processo.

A lesão do músculo esquelético e sua subsequente regeneração são inicialmente caracterizadas por inflamação e infiltração de neutrófilos, seguida de fagocitose de restos necróticos por macrófagos que invadem a região danificada^{15,16}. Um dos primeiros estudos experimentais de rupturas musculares induzidas por estiramento foi realizado por McMaster¹⁷, que observou rupturas no ventre muscular e na junção miotendinosa. Neste contexto, embora a lesão induzida por tetania seguida de estiramento em ratos de laboratório tenha sido estudada seguindo variável metodologia, os estudos que enfocam as alterações do metabolismo e as características contráteis dos três tipos de fibras musculares envolvidas no processo da lesão, ainda são carentes de informação.

Assim a presente pesquisa teve a finalidade de estudar a cabeça medial do músculo gastrocnêmio de ratos submetido à indução de tetania seguida de estiramento nos seguintes aspectos: a morfologia das fibras musculares e do tecido conjuntivo, o metabolismo e as características contráteis dos tipos de fibras.

Materiais e Métodos

Amostra

Na presente pesquisa foram utilizados 10 ratos machos adultos (90 dias) da linhagem Wistar. Os animais foram divididos em 2 grupos de cinco animais cada: Grupo Controle (Gctl) - Eutanásia sem estímulo. Grupo 48h (T/E) (Gt48) - Eutanásia após 48 horas de estímulo.

Permaneceram em grupos de cinco animais por gaiola (polietileno), com temperatura ambiente de (22±2°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de doze horas) controlados, com livre acesso à água e alimentação (ração padrão Labina da Purina, para ratos de laboratório). Todos os procedimentos estiveram de acordo com às normas e os Princípios Éticos de Experimentação Animal, e aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa da

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Presidente Prudente (Processo 03/2010).

Nos animais do grupo Gt48, foram produzidas lesões por meio de dois aparelhos; um mecânico e um elétrico. Obteve-se a tetania por meio do aparelho de estimulação elétrica de corrente pulsada, bifásica, triangular assimétrica com largura de pulso de 15ms e intervalo de pulso de 15ms, uma frequência de 33Hz, amplitude de pico de 2 Voltz para uma resistência de 1000 Ω e P = 1/8 W.

As medidas de intensidade foram aferidas referentes ao peso dos animais. O aparelho eletroestimulador era conectado aos animais por meio de dois eletrodos, conectados a uma agulha de acupuntura, onde o positivo era introduzido próximo à região postero-lateral da fossa poplíteia, o negativo próximo à inserção do tendão de Aquiles, na pata posterior direita.

Obteve-se uma corrente que mantinha por 10 segundos o músculo em tetania. O aparelho que produz o alongamento brusco, utilizado na presente pesquisa, trata-se de um modelo experimental de lesão muscular por estiramento mecânico não invasivo desenvolvido por Pachioni¹⁸. O procedimento completo Tetania seguida de Estiramento brusco (TE), foi repetido por dez vezes consecutivas, com trinta segundos de repouso entre um estímulo e outro. Após 48h horas da indução da lesão muscular, os animais foram sacrificados mediante injeção de Pentobarbital sódico administrado intraperitonalmente.

O mesmo procedimento foi utilizado para o sacrifício dos animais pertencentes ao grupo controle. Removia-se o ventre medial do músculo gastrocnêmio do membro posterior direito e cada fragmento retirado era seccionado em 3 porções (regiões proximal, média e distal). Cada fragmento era emblocado nos dois eixos da fibra, transversal e longitudinal e mergulhados em nitrogênio líquido, seguindo o procedimento recomendado por Dal Pai¹⁹.

Após a congelação, o material era transferido para um micrótomo criostato e obtidos cortes histológicos com 10 μ m de espessura, alguns submetidos à coloração pela técnica Hematoxilina e Eosina. Para a tipagem das fibras,

outros cortes foram submetidos aos métodos: Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Tetrazolio Redutase (NADH TR)²⁰ e ATPase miofibrilar (m-ATPase), em pH = 9,4 após incubação em meio alcalino (pH-10,4) e em meio ácido (pH – 4,35), de acordo com Brooke; Kaiser²¹.

Análise microscópica e fotodocumentação

Os cortes foram observados em microscópio óptico Zeiss® e fotomicrografados. Para avaliação do grau do processo lesivo, foram analisadas dez lâminas (01/animal), onde em cada uma delas foi composta por 10 campos diferentes do tecido muscular específico (porções proximais, médias e distais).

A melhor imagem produzida foi escolhida para as análises. Dessa maneira, foram observadas 100 fibras musculares por imagem, de acordo com o protocolo estabelecido por Dal Pai²². Foi determinada por marcação interativa pelo sistema de análise de imagem computadorizada, por meio do software AxioVision 4.8. Para uma melhor observação, as áreas fotografadas receberam aumento de 50 a 500 vezes.

Análise Qualitativa

Após a preparação das imagens, os dois grupos foram analisados de qualitativa, por meio visual. Dessa maneira, foram observados os dois grupos de animais, a partir de cada uma das reações aplicadas ao tecido muscular. Para melhor efeito de comparação, foram observados os cortes transversais e longitudinais.

Resultados

Após a análise das três porções do músculo Gastrocnêmio, foi observado que em relação à porção proximal, após 48h da ocorrência da lesão muscular, as laminais histológicas preparadas pelas colorações HE revelaram um intenso infiltrado plasmolinfocitário estando associado às áreas ocupadas por material equivalente a edema (I). Este infiltrado mostrou-se com menor intensidade nos espaços entre as fibras que circundam a lesão as quais possuem morfologia com aspecto normal. Na área de maior concentração de células livres, bem como na sua periferia notaram-se fibras de

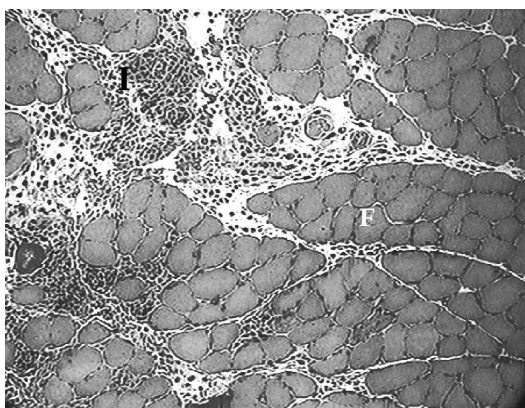
diferentes tamanhos e formas em diferentes estágios de necrose juntamente com uma acentuada perda de fibras. (Fig 1A.)

Em maior ampliação, muitas fibras situadas nas proximidades da área da lesão mostram-se com aspecto mais arredondado. O citoplasma é acidófilo, em sua maior área, porém em pequenas áreas contem vacúolos e com acidofilia diminuída. Alguns núcleos são vistos na região central ou intermediária do citoplasma. No tecido conjuntivo circundante observa-se grande número de células de diferentes formas, tamanho e aspecto cromatínico também variável. Sendo equivalentes a macrófagos, fibroblastos e/ou miofibroblastos. (Fig. 1B).

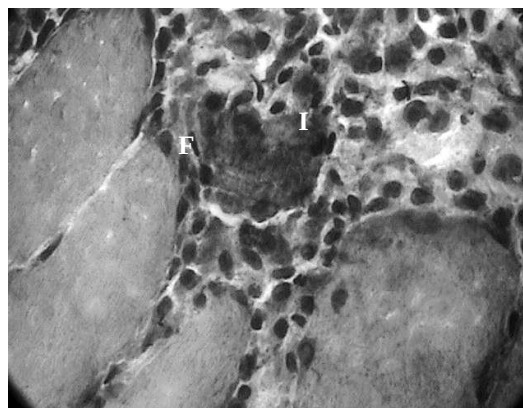
Nas preparações submetidas à enzima NADH-TR, observa-se intensa atividade na maioria das fibras da região normal que circunda a área lesada. No interior desta, nota-se o infiltrado celular característico cujas células mostram moderada reatividade. Nesta área, as fibras de maior tamanho possuem uma reatividade menos

intensa que as fibras normais que circundam a área lesada. Já as fibras com diferentes formas e tamanhos, especialmente nas polimórficas, a reação mostra-se particularmente intensa especialmente na periferia. Em outras fibras deste grupo nota-se áreas de citoplasma com intensidade aumentada ao lado de outras com reatividade fraca a negativa (Figs. 1C e 1D)

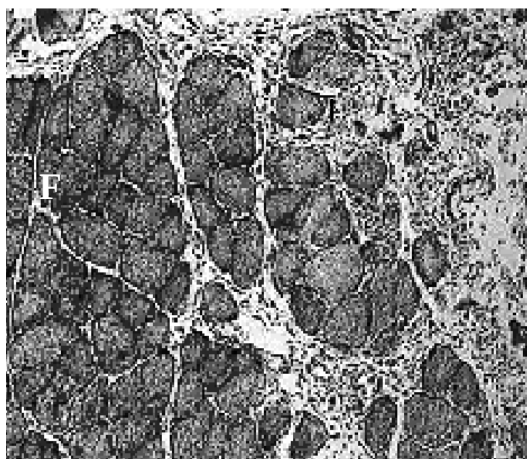
Nas preparações histológicas submetidas à reação m-ATPase que possibilita a observação da capacidade contrátil rápida e lenta das fibras, quando efetuada após pré-incubação em meio ácido (pH 4,6) revelou fibras em avançado estágio de fagocitose, sendo polimórficas com intensa reatividade. Nas demais fibras nota-se atividade variável dentro de um único tipo de fibra, enquanto que em outras o padrão de reação é normal. Na região do tecido que circunda a área mais lesada nota-se um padrão de alteração das fibras menos acentuado, sendo normal na região mais afastada (Figs. 1E e 1F).



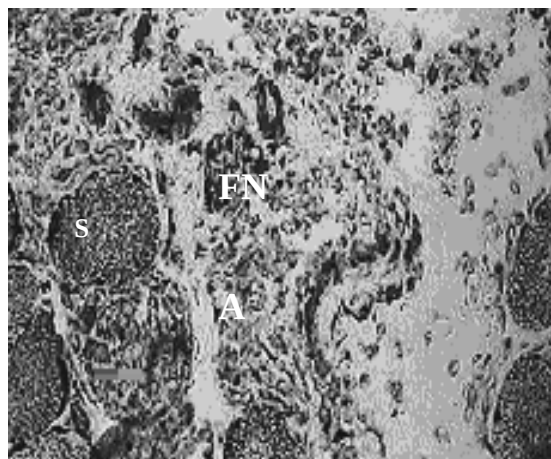
A. Notar o intenso infiltrado celular (I); perda de fibras em diferente estágio de fagocitose (P); presença de infiltrados celulares entre os fascículos e fibras adjacentes à lesão (F). H/E 50x



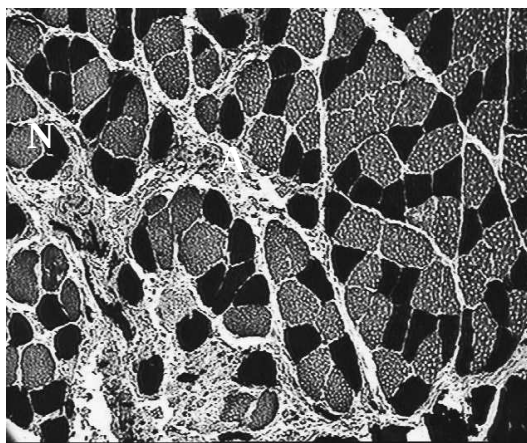
B. Em detalhe o intenso infiltrado plasmolinfocitário (I), fibras musculares com aparência normal (N), e outra em processo de fagocitose (F). H/E 500x



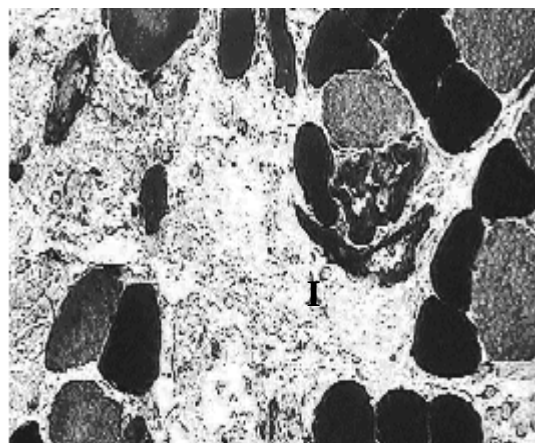
C. Notar a intensa reatividade na maioria das fibras musculares (I), e reatividade mais fraca em outras fibras (F). NADH-TR 50x



D. Notar a intensa reatividade das fibras, algumas com aspecto aparentemente normal (FN). Nas fibras de diferentes estágios de fagocitose notar a distribuição focal da formazana no sarcoplasma (S), ao lado de focos com ausência de formazana (A). NADH-TR 200x



E. Notar uma região adjacente à lesão com aspecto normal (N); e as alterações nas fibras e no tecido conjuntivo da região lesada (A) mATPase (pH4,6) 50x



F. Fibras com reatividade mais intensa na periferia do sarcoplasma (I). mATPase (pH4,6) 200x

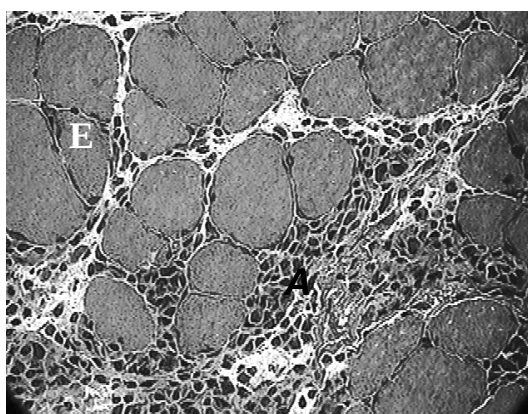
Figura 1. Corte transversal da porção proximal da cabeça medial do músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a estiramento muscular

Quando observada a porção média, conforme revelado pelas preparações coradas pela HE, notaram-se fascículos inteiros contendo lesão, ao lado de outros totalmente preservados. Foram observados fragmentos de fibras dispersas em meio a diferentes tipos de células, em sua maioria, similar a macrófagos (Fig.2 A). Em corte longitudinal em evidencia uma fibra rompida transversalmente com partições de filamentos soltos em meio a células infiltradas, bem como vários núcleos no interior (Fig 2B).

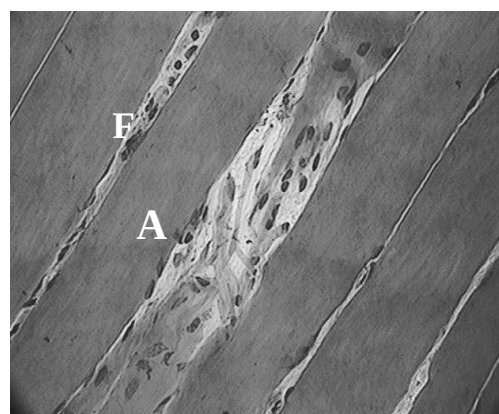
Nas preparações histológicas submetidas à técnica para demonstração da atividade da enzima NADH-TR que revela a habilidade oxidativa e glicolítica, após 48h

da lesão, foi observada uma atividade oxidativa aumentada em algumas fibras de menor diâmetro, enquanto que pedaços de fibras com pouca reatividade se encontravam dispersos na área de lesão (Fig. 2C e 2D).

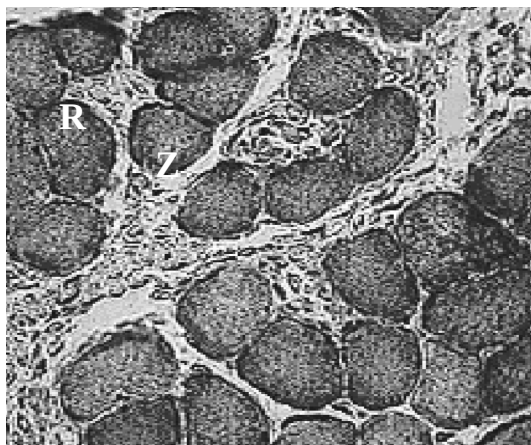
Nas preparações histológicas submetidas à reação m-ATPase que revela a habilidade contrátil rápida e lenta das fibras após pré-incubação em meio ácido (pH 4,6), reação moderada foi observada para fibras de diâmetro intermediário ou grande, com sua estrutura morfológica preservada, ao lado da área da lesão (Fig.2E), a reação também revelou fibras do tipo I com evidente perda de filamentos isoladas em meio à área com ocorrência de lesão (Fig.2F).



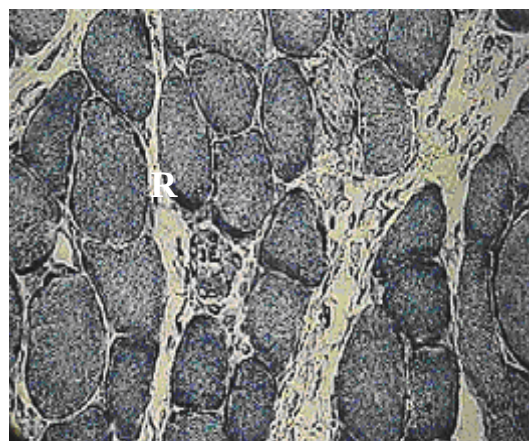
A. Notar uma área com intenso infiltrado celular e uma região com ausência de fibras (A); infiltrados entre as fibras no tecido adjacente (I). Neste caso o endomísio aumentado circundando fibras com aspecto arredondado (E). H/E 200x



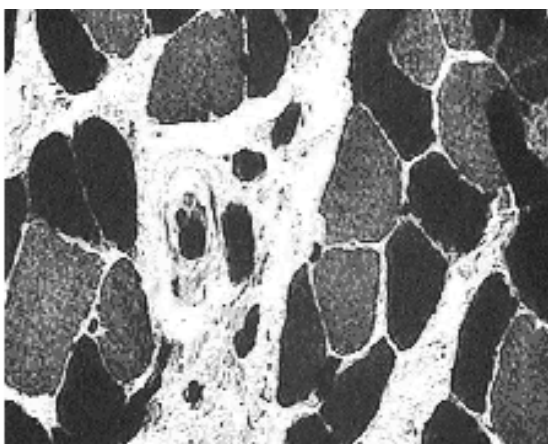
B. Além das fibras com aspecto normal (F), presença de fibras contendo em seu interior grande número de células fagocitárias e ausência de miofilamentos (A). H/E 200x



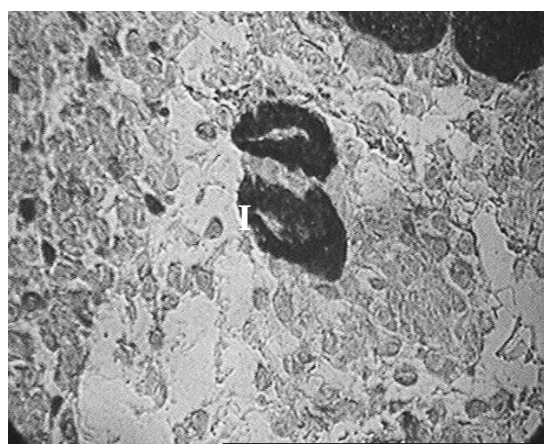
C. Notar a reatividade relativamente intensa na maioria das fibras (R). Nas fibras em processo de fagocitose a formazana mostra distribuição irregular e com diferentes concentrações (Z). NADH-TR 200x



D Corte transversal da porção média da cabeça medial do músculo gastrocnêmio do rato. Menor reatividade nas fibras em processo de fagocitose (R). NADH-TR 200X



E. Notar fibras do tipo I com intensa reatividade (i) e o polimorfismo das fibras em processo de fagocitose (P). mATPase (pH4,6) 100x



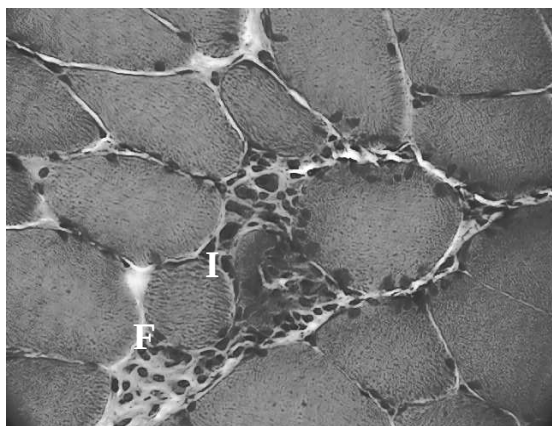
F. Em destaque o polimorfismo de duas fibras do tipo I e a perda de material contrátil na sua região central. mATPase (pH4,6) 200x

Figura 2. Corte transversal/longitudinal da porção média da cabeça medial do músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a estiramento muscular

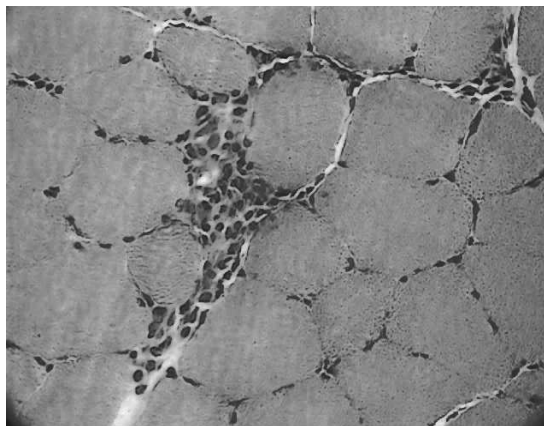
Em relação à porção distal, nas preparações coradas pela HE, pode-se observar fibras arredondadas, além de fibras em fase de necrose. Ao menor aumento identificou-se uma grande área acometida pela lesão (Fig. 3A). Fibras com ausência de miofilamentos e edema foram evidenciados ao lado de uma área de grande concentração de células plasmolinfocitárias (Fig. 3B).

A técnica para demonstração da atividade da enzima NADH-TR, revelou restos de fibras com forte reatividade dispersos na área da lesão (Fig. 3C). As fibras de menor diâmetro apresentaram uma forte atividade oxidativa subsarcolemal, enquanto que fibras de diâmetros maiores revelaram uma atividade oxidativa moderada (Fig. 3D).

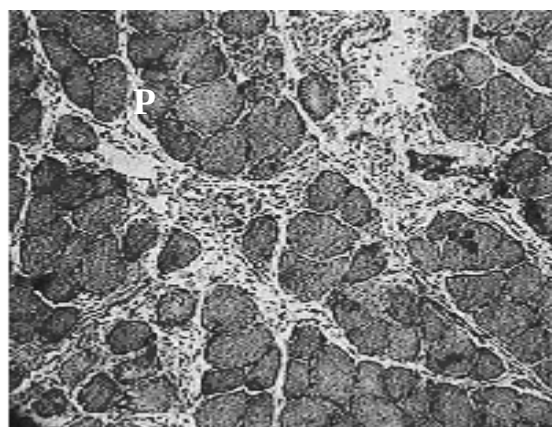
Nas preparações histológicas submetidas à reação mATPase que revelam a habilidade contrátil rápida e lenta das fibras após pré-incubação em meio ácido (pH 4,6), observou-se fibras com reação variando de forte a fraca, em fase adiantada de fagocitose, ao lado de fibras com forte reação, com sua morfologia preservada (Fig. 3E). Em uma visão panorâmica pode-se notar uma grande área acometida pela lesão. Fibras de pequeno e grande diâmetro mostram-se presentes nessa área, além de fibras com forte reação, quase que totalmente fagocitadas, como também algumas fibras com ausência de miofilamentos (Fig. 3F).



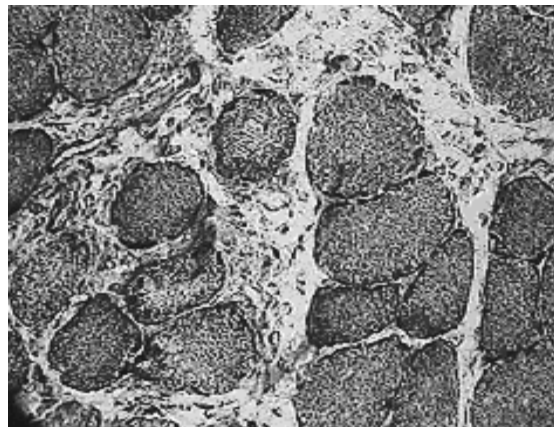
A. Presença de infiltrados plasmolinfocitário (I) e de fibras em diferentes fases de fagocitose (F). H/E 200x.



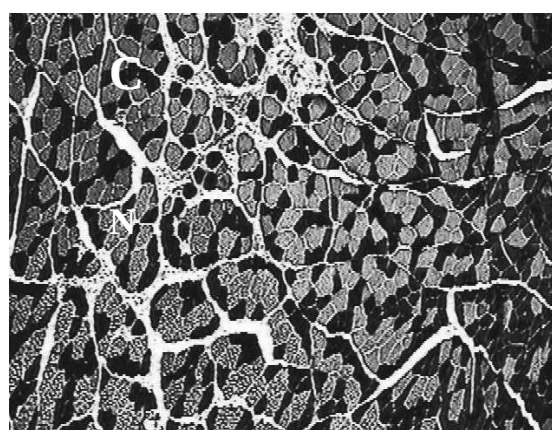
B. Notar o aspecto da lesão do tecido muscular com infiltrado inflamatório. H/E 200x



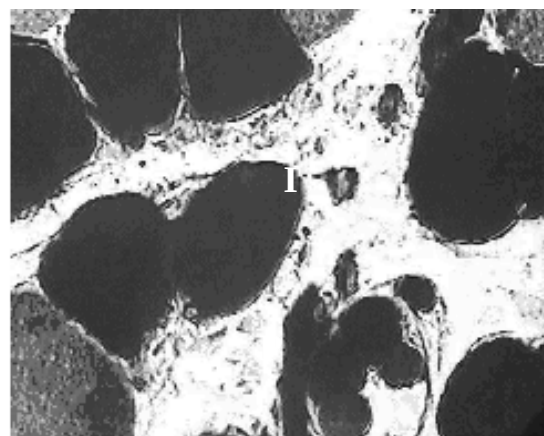
C. Notar o aspecto da reatividade das fibras e do infiltrado plasmolinfocitário (P). NADH-TR 50x



D. Destaque o infiltrado celular. NADH-TR 200x.



E. Notar o padrão fascicular das fibras com aspecto normal (N); na região central e superior da fig. nota-se aumento do tecido conjuntivo com desorganização dos fascículos (C). mATPase (pH4,6) 20x



F. Em destaque a intensa reatividade das fibras do tipo I das quais algumas, em processo de fagocitose com acentuado polimorfismo (P). mATPase (pH4,6) 200x

Figura 3. Corte transversal da porção distal da cabeça medial do músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a estiramento muscular

Discussão

O presente estudo se propôs a investigar as alterações nas fibras musculares de ratos submetidos a estiramento. Foi observado que o aparelho testado no presente estudo foi capaz de gerar o trauma no músculo esquelético. Além disso, pode-se verificar a ocorrência de

lesões musculares nos tipos de fibra I e II.

O músculo gastrocnêmio foi escolhido, pois de acordo com Lehmkühl e Smith²³, este músculo compõe a principal porção dos músculos da perna, também por ser um músculo superficial de fácil acesso cirúrgico e além de observar-se a presença dos três diferentes tipos de

fibras em seu ventre medial, é um músculo propulsor importante nos esportes e susceptível a vários tipos de lesão. Em humanos, os músculos gastrocnêmio e sóleo têm grande contribuição para o salto, com relatos na literatura onde os mesmos são responsáveis por 22% a 35,8% do impulso total produzido no salto vertical²⁴.

Estudando o músculo sóleo de ratos, Pacchioni¹⁸ desenvolveu um aparelho para a indução de lesão mecânica, não invasivo, que se mostrou eficiente para a indução de estiramento. O estiramento induzido por esse aparelho mecânico, possibilitou a identificação de lesões nos dias que se seguiram à indução. Constatou que três dias após o estímulo, em todos os animais foram encontradas fibras com sinais de lesão com variados graus, e com diferenças entre os animais.

Na presente pesquisa utilizou-se essa mesma metodologia, porém o músculo utilizado foi o gastrocnêmio de ratos e foram analisados após 2 dias (48h) da indução da lesão. Foram encontradas lesões focais nos cortes transversais das três porções do músculo analisadas (proximal, medial e distal), porém não foi possível detectar evidências que a lesão atingisse uma região ou outra especificamente. Também se pode verificar que 48h após a indução da lesão existia uma área danificada em várias fibras e muitos núcleos se deslocavam para a parte central da célula.

Mccully e Faulkner^{25,26} encontram sinais agudos de lesão, como necrose, infiltrados e a basofilia celular, associados a sinais crônicos de lesão, como o núcleo centralizado que eram achados frequentes no terceiro dia após a tetania seguida de estiramento. Na presente pesquisa, foram observados fascículos inteiros envolvidos no processo de lesão, ao lado de fascículos normalmente preservados. Em resposta à maioria das lesões, o músculo esquelético submete-se a uma progressão de eventos em ordem sequencial para a renovação do tecido, caracterizada por uma degeneração do músculo necrótico e uma resposta regenerativa subsequente.

O período inicial da degeneração miofibrilar foi caracterizado pela ruptura de miofibrilas. Algumas fibras apareceram completamente rompidas transversalmente, enquanto outras exibiam variados graus de desarranjo

intracelular com a lâmina basal intacta. Constatou-se também em maior ou menor concentração, a presença de infiltrados celulares por toda área da lesão em todas as porções do músculo. O tecido conjuntivo mostrou-se alterado e envolvido no processo inflamatório com grande atividade de células mononucleadas no endomísio e em locais próximos às áreas de lesão, embora o padrão fascicular tenha se mantido normal.

A literatura sugere que após uma lesão, a miogênese ocorre dentro da lâmina basal que persiste da fibra original, a qual fornece um suporte para o reparo do tecido²⁷. O período da avaria miofibrilar é sucedido por uma resposta fagocitária (dentro de 1-2 dias), onde um grande número de células mononucleares invade o local do ferimento.

Na reação enzimática para a fosfatase ácida, Pacchioni¹⁸, observou fibras com atividade enzimática intracelular positiva, indicando concentração de lisossomos, os quais são indicativos de uma reação fagocítica. No presente estudo observou-se que, após as 48h da lesão foram encontradas fibras em fase adiantada de fagocitose. Também foi observado que algumas fibras isoladas apresentavam-se atroficas, angulares, comprimidas por fibras vizinhas de maior tamanho entre outras de estrutura geral preservada. O citoplasma das células danificadas apresentou-se basófilo com intensa atividade macrofágica.

Diante de tal fato, os resultados expostos na presente pesquisa podem dar sustentação a respeito do entendimento do processo lesivo e demais fatores desencadeadores no traumatismo muscular. Além disso, o estímulo estressor utilizado no presente estudo (lesão por estiramento) permite identificar possíveis tratamentos da lesão muscular.

Foi observado também que, a atividade dos macrófagos foi periférica em algumas fibras e central em outras. Identificou-se necrose seguida de fagocitose da porção lesada da fibra, sugerindo que as células que se acumulavam na área inflamada removiam os restos de fibras alteradas pela inflamação, enquanto outras se reuniam para preencher novamente o espaço da lesão.

De acordo com a metodologia utilizada, em meio

às células que se deslocaram para a área da lesão, não foi possível afirmar quais eram células satélites que ali se encontravam. Em algumas fibras foi observada a presença de fendas localizadas paralelas ao seu eixo longitudinal (rachaduras), sendo este fato sugestivo de fragmentação ou *splitting* durante um processo de lesão e regeneração. Quando o *splitting* é observado em secção transversa, as fibras musculares são vistas proximamente e envoltas pelo mesmo tecido conectivo endomisial.

Em secção longitudinal, as duas fibras vêm de dentro de uma lâmina basal de uma única fibra, havendo apenas um pequeno espaço entre as duas, notado pela clivagem da membrana e dos capilares, sugerindo uma divisão. A reação NADH-TR que foi utilizada para a demonstração das características metabólicas dos diferentes tipos de fibras evidenciou fibras de metabolismo oxidativo, do tipo I, com forte reação. Também consideradas oxidativas, as fibras tipo IIa reagiram com intensidade moderada; já para as fibras Tipo IIb, a intensidade da reação foi fraca, pois seu metabolismo é glicolítico.

Armstrong e Phelps²⁸, em relação à massa muscular, concluíram que as fibras rápidas glicolíticas (FG) são claramente o tipo de fibra predominante na pata posterior de ratos. Em relação ao músculo gastrocnêmio, a quantidade de cada tipo de fibra em sua porção branca é: 84+-3% de FG, para 16+-3% de FOG e 0+-0% de SO.

A ATPase miofibrilar (m ATPase) foi utilizada com meio de incubação em pH 9.4, precedido de pré-incubação em meio ácido pH (4.3 – 4.6) e alcalino pH (10.4 – 10.6). Esta técnica demonstrou que os restos de fibras musculares encontradas em meio à lesão e que reagiram fortemente à pré-incubação ácida, e fracamente ao meio alcalino, caracterizavam-se como fibras do tipo I, de contração lenta, mas também se notou a presença de restos de fibras com fraca reação (tipoII) em meio a células plasmolinfocitárias. A lesão pareceu comprometer ambos os tipos de fibras.

Dessa forma, o presente estudo se limitou a observar de forma qualitativa o efeito lesivo nas fibras musculares após 48 horas de estiramento. Além disso, esta pesquisa se restringiu a análise do músculo

gastrocnêmio, não observando demais regiões musculares do membro inferior dos animais.

Estudos quantitativos, comparando as áreas afetadas das fibras musculares, podem vir a acrescentar os achados da presente pesquisa. Dessa forma, a exploração das demais regiões musculares, bem como, seus agrupamentos, pode vir a complementar os resultados expostos até o presente momento.

Conclusão

Pode-se constatar que transcorridas as 48 após o estiramento, a atividade oxidativa revelou-se levemente aumentada em todos os tipos de fibras, assim como a ocorrência de lesões musculares.

Agradecimentos

Agradecemos ao professor e grande amigo Vitalino Dal Pai, que contribui de forma significativa na elaboração do presente trabalho. Em sua memória, fica aqui a nossa homenagem.

Referências Bibliográficas

1. Rayegani SM, Shojae H, Sedighpour L, Soroush MR, Baghbani M, Amirani OB. The effect of electrical passive cycling on spasticity in war veterans with spinal cord injury. **Front Neurol** 2011;2.
2. Machado CN, Gevaerd MS, Goldfeder RT, Carvalho T. **Rev Bras Med Esp** 2010;16:378-381.
3. Chiereghin A, Martins MR, Gomes CMF, Rosa RF, Loduca SMAA, Chahade WH. Síndrome do impacto posterior do tornozelo: um diagnóstico que deve ser lembrado pelo reumatologista. Relato de dois casos. **Rev Bras Reum** 2011;51:286-288.
4. Gabbett T. J. Incidence, site, and nature of injuries in amateur rugby league over three consecutive seasons. **Br J Sports Med** 2000;34:98-103.
5. Paes MR, Fernandez R, Inácio da Silva A. Injuries to football (soccer) referees during matches, training and physical tests. **Int J Sports Med** 2011;12: 74-84.
6. Krinski K, Elsangedy HM, Colombo H, Buzzachera CF, Soares IA, Campos W, Gregório da Silva S. Efeitos do exercício físico no sistema imunológico. **Rev Bras Med** 2010;67:228-233.
7. Xhardez Y. **Manual de cinesioterapia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990
8. Gould JA. **Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1993.

9. Almeida TT, Jabur NM. Mitos e verdades sobre flexibilidade: reflexões sobre o treinamento de flexibilidade na saúde dos seres humanos. **Motricidade** 2007;3:337-344.
10. Garrett Jr WE. Muscle strain injuries: clinical and basic aspects. *Med Sci Sports Exerc* 1990;22:436-443.
11. Prasartwuth OTJ, Allen JT, Butler JE, Gandevia SC, Taylor JL. Length-dependent changes in voluntary activation, maximum voluntary torque and twitch responses after eccentric damage in humans. **J Physiol** 2006;571:243-252.
12. Diniz LS, Barros MLG, Fonseca ST, Rodrigues EL. **Características da contração muscular excêntrica e sua relação com as lesões musculares por estiramento: uma revisão da literatura.** (Monografia) - Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.
13. Fridén J, Lieber RL. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 1992; 24:521-530.
14. Garrett Jr WE. Muscle strain injuries. *Am J Sports Med* 1996;24:S2-S8.
15. Zheng B, Cao B, Crisan M, Sun B, Li G, Logar A, et al.. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nature Biotechnology* 2007;25:1025-1034.
16. Li G, Zheng B, Meszaros LB, Vella JB, Usas A; Matsumoto T, et al.. Identification and characterization of chondrogenic progenitor cells in the fascia of postnatal skeletal muscle. **J Mol Cell Biol** 2011;0:1-9.
17. McMaster PE. Tendon and muscle ruptures. **J Bone Joint Surg Am** 1933;15:705-722, 1933.
18. Pachioni CAS. **Lesão por estiramento do músculo soleo: estudo experimental em ratos.** (Dissertação de Mestrado)-faculdade de medicina, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 1996.
19. Dal Pai V. Esporte e lesão muscular. **Rev Bras Neurol** 1994;30:45-8.
20. Novikoff AB, Shin W, Drucker J. Mitochondrial localization of oxydative enzymes: staining results with two tetrazolium salts. **J Biophys Biochem Cytol** 1961;9:47-71.
21. Brooke MH, Kaiser KK. Three myosin adenosinetriphosphatase systems: the nature of their pH hability and sulphydryl dependence. **J Biophys Biochem Cytol** 1970;18:670-672.
22. Dal Pai V. **Histologia: teoria e pratica.** Botucatu: IB/UNESP, 1995.
23. Lehmkuhl LD, Smith LK. Brunnstrom: **Cinesiologia clínica.** 4ª ed. São Paulo: Manole, 1989.
24. Andrade RM, Gagliardi JFL, Kiss MAPD. Relação entre Índices de Muscularidade e o Desempenho do Salto Vertical. **Rev Bras Ciênc Mov** 2007;15:61-67.
25. McCully KK, Faulkner JA. Injury to sketal muscle fibers of mice following lengthening contractions. **J Applied Phys** 1985;59:119-126.
26. McCully KK, Faulkner JA. Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. **J Applied Phys** 1986;61:293-299.
27. Clebis NK; Natali MRM. Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. **Rev Bras Ciênc Mov** 2001;9:47-53.
28. Armstrong RB, Phelps RO. Muscle fiber type composition on the rat hind limb. **Am J Anat** 1984;171:259-272.