

Fisioter Bras 2018;19(6):768-73
<https://doi.org/10.33233/fb.v19i6.2286>

ARTIGO ORIGINAL

Avaliações funcionais e morfométrica de modelo de lesão muscular por agulha de biópsia em gastrocnêmio de ratos

Functional and morphometric evaluations of model of muscle lesion with biopsy needle in gastrocnemius of rats

Maria Cecília Ribeiro Bruning, Ft. M.Sc.*, Alana Ludemila de Freitas Tavares**, Aline Daiane de Lima**, Juliana Roncini Gomes da Costa**, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, D.Sc.**; Rose Meire Costa Brancalhão**, Adriana Pertille, Ft. D.Sc*, Gladson Ricardo Flor Bertolini, Ft., D.Sc.**

*Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba/SP, **Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel/PR

Recebido em 26 de abril de 2018; aceito em 6 de novembro de 2018.

Endereço de correspondência: Maria Cecília Ribeiro Bruning, Rua Fagundes Varela, 2548, 85807-480 Cascavel PR, E-mail: marycribeiro6@hotmail.com; Alana Ludemila de Freitas Tavares: alanatavares-@hotmail.com; Juliana Roncini Gomes da Costa: ronciniju@gmail.com; Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro: lucineia.cr@gmail.com; Rose Meire Costa Brancalhão: rosecb@gmail.com; Adriana Pertille: pertille.adri@gmail.com; Gladson Ricardo Flor Bertolini: gladsonricardo@gmail.com

Resumo

Introdução: Dentre os modelos experimentais, o uso de agulha de biópsia mostrou ser eficaz para reproduzir as lesões em atletas. **Objetivo:** Avaliar a força de preensão, a nocicepção e as alterações morfológicas do músculo gastrocnêmio de animais submetidos à lesão muscular. **Métodos:** Foram utilizados seis ratos Wistar. A lesão foi realizada na junção miotendínea do músculo gastrocnêmio direito, utilizando agulha de biópsia. Para avaliação funcional utilizou-se o teste de força de preensão e avaliação nociceptiva em três momentos: 24 horas antes da lesão (AV1); no segundo dia pós-lesão (AV2) e no sexto dia pós-lesão (AV3). Ao final do experimento o músculo foi retirado para análise morfológica. **Resultados:** Houve redução da força de preensão entre AV1 e AV2 ($p=0,0031$). Para a nocicepção os valores de AV2 ($p<0,001$) e AV3 ($p=0,0109$) foram maiores que AV1. Na região das fibras musculares observou-se desarranjo do padrão fascicular, aumento do calibre de vasos sanguíneos, da quantidade de tecido conjuntivo, de fibroblastos e de células inflamatórias. **Conclusão:** A lesão muscular por agulha de biópsia provocou redução da força de preensão e da nocicepção do membro lesado, como também evidenciou as etapas características do processo de degeneração muscular e início do processo de regeneração.

Palavras-chave: força, nociceptividade, músculo esquelético, biópsia por agulha.

Abstract

Introduction: Among the experimental models, the use of a biopsy needle was shown to be effective to reproduce lesions that occur with athletes. **Objective:** To evaluate the grip strength, nociception and morphological alterations of the gastrocnemius muscle of animals submitted to muscle injury. **Methods:** Six Wistar rats were used. The lesion was performed at the myotendinous junction of the right gastrocnemius muscle using a biopsy needle. For functional evaluation, the grip strength test and nociceptive evaluation were used at three moments: 24 hours before the injury (AV1); on the second postoperative day (AV2) and on the sixth postoperative day (AV3). At the end of the experiment the muscle was removed for morphological analysis. **Results:** There was a reduction in grip strength between AV1 and AV2 ($p = 0.0031$). For the nociception the values of AV2 ($p < 0.001$) and AV3 ($p = 0.0109$) were higher than AV1. In the muscle fibers region, there was disarrangement of the fascicular pattern, increased blood vessel size, the amount of connective tissue, fibroblasts and inflammatory cells. **Conclusion:** Muscle lesion by biopsy needle caused reduction of grip strength and nociception

of the damaged limb, as well as the characteristic stages of the muscular degeneration process and the beginning of the regeneration process.

Key-words: force, nociception, skeletal muscle, biopsy needle.

Introdução

As lesões musculares são comuns em atletas e indivíduos fisicamente ativos, causam transtornos e gastos tanto pessoais como institucionais, e seu tratamento depende de um diagnóstico eficiente e monitorização do estado da lesão [1]. A alta taxa de recidivas representa um grande desafio para a medicina esportiva e um grande impacto para atletas e clubes esportivos. Atualmente existem várias modalidades terapêuticas para seu tratamento, porém as evidências de eficácia dessas modalidades nas lesões musculares ainda não estão bem estabelecidas [2].

As lesões musculares se caracterizam por alterações no aspecto morfológico e histoquímico, levando a déficit de funcionalidade no segmento acometido. As principais formas de lesão na prática esportiva são o estiramento e a contusão. O estiramento é mais frequente sendo classificado em: grau I, no qual há ruptura estrutural mínima e retorno rápido a função normal; grau II, ruptura parcial com dor e alguma perda de função; e grau III, ruptura tecidual completa com retração muscular e incapacidade funcional [3,4]. A contusão muscular ocorre por um trauma direto, resultado de forças externas, caracterizada pela presença de dor, edema, rigidez muscular e restrição na amplitude de movimento, atingindo quaisquer músculos, sendo o quadríceps e o gastrocnêmio os mais acometidos [3].

Um novo sistema de classificação denominado consenso de Munique, distingue os seguintes tipos de lesões musculares: desordem muscular funcional (tipo 1: relacionada com esforço excessivo, e tipo 2: distúrbios de origem neuromuscular), sendo essas caracterizadas por não apresentarem evidências macroscópicas de lesão na fibra muscular; e desordem muscular estrutural (tipo 3: lesões musculares parciais e o tipo 4: lesões totais ou subtotais que podem apresentar avulsão tendínea), oferecem evidência macroscópica de lesão, ou seja, dano estrutural [5].

A busca do entendimento de mecanismos e tratamento das doenças tem levado ao desenvolvimento de vários modelos animais de lesões ou outras patologias. Para que essas sejam investigadas a condição ou doença é induzida de forma experimental [6]. O uso do modelo animal permite superar limitações de estudos com humanos, como alguns aspectos éticos de experimentação em seres humanos e obtenção de número suficiente de casos com características homogêneas [7].

Pesquisas com lesão muscular têm sido realizadas com diversos protocolos, como trauma direto, lesão cirúrgica e tração mecânica [8-14]. Contreras-Muñoz *et al.* [15] apresentaram um modelo, no qual a lesão foi realizada com uso de agulha de biópsia transfixando os gastrocnêmios, que mimetizam lesões musculares observadas em atletas humanos. Os resultados foram observados por análises histológicas e imunofluorescência, por imagens de ressonância nuclear magnética, por avaliação da força tetânica e mostraram que esse tipo de lesão muscular reproduziu as lesões grau I-II observadas em profissionais de futebol, incluindo edema ao redor do tendão, alteração da morfologia das fibras musculares e uma redução significativa de 30% na força tetânica máxima registrada após duas semanas de lesão muscular.

Considerando a importância do estudo do processo de regeneração muscular, como também a disponibilidade de recursos dos laboratórios de pesquisa, a hipótese do presente estudo é que o modelo de lesão por agulha de biópsia permite a avaliação funcional e morfológica por meio de técnicas mais simples, como a força de preensão e nocicepção. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a força de preensão e a nocicepção, além de descrever as alterações histológicas do músculo gastrocnêmio de animais submetidos à lesão muscular por agulha de biópsia.

Material e métodos

Foram utilizados 6 ratos machos da linhagem *Wistar*, com $320 \pm 20,8$ g, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), mantidos em ambiente com temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo (12 horas) e higiene controlados, recebendo água e ração *ad libitum*. Após a aclimatação de uma semana, os animais foram submetidos ao

protocolo de lesão. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Unioeste.

Protocolo de lesão

Inicialmente os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg). Após verificação do estado de consciência (observado pela ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda e pregas interdigitais), foi feita a tricotomia da região do músculo tríceps sural direito e os animais colocados em posição prona para fixação do membro e exposição do ventre muscular. O procedimento de lesão foi realizado com o auxílio de agulha de biópsia (AdvantiVe® - 18G, 1,2 mm de diâmetro) que foi inserida na junção miotendínea do músculo gastrocnêmio a 90° no membro pélvico direito (3 mm do início do tendão muscular e 2 mm de profundidade), a agulha foi inserida uma vez em cada animal seguindo o protocolo de Contreras-Muñoz *et al.* [15], após o procedimento os animais foram realocados de dois em dois nas gaiolas.

Análises funcionais

Previamente à cirurgia, os animais foram adaptados e treinados no equipamento por três dias durante uma semana. A primeira avaliação (AV1) foi realizada 24 horas antes da lesão muscular, para obtenção de valores basais, a segunda avaliação no segundo dia após a lesão (AV2) e a terceira avaliação (AV3) no sexto dia após a lesão.

Para a avaliação da força muscular foi usado um medidor de força de preensão (Insight®) [16]. Na avaliação, o animal era posicionado de modo que agarrasse em uma grade conectada a um transdutor de força com o membro pélvico direito, sendo em seguida tracionado pela cauda com força crescente até que a preensão fosse perdida, momento no qual o aparelho fornecia a força exercida pelo animal. O membro pélvico esquerdo foi imobilizado pela mão do avaliador para não interferir na avaliação. O teste foi repetido três vezes e utilizado o valor médio das repetições.

A avaliação da nocicepção foi realizada por meio do filamento de Von Frey digital (Insight®) graduado em gramas (g) [17]. Para isto o animal foi contido manualmente e a ponteira do equipamento aplicada na região do procedimento lesivo no membro pélvico direito. A ponta de polipropileno foi aplicada perpendicularmente à área, com gradual aumento de pressão, e logo que o animal retirou a pata o teste foi interrompido para o registro do limiar de retirada.

Avaliação histomorfométrica

No último dia de experimento, com os animais anestesiados com cloridrato de quetamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), os mesmos foram eutanasiados por meio de decapitação em guilhotina. Posteriormente, o músculo gastrocnêmio lateral direito foi dissecado, seccionado em seu sentido transversal, fixado em metacarn durante 2 horas e armazenados em álcool 70% até o momento do procedimento histológico. Os músculos foram desidratados em série crescente de álcoois, diafanizados, infiltrados e emblocados em parafina histológica, para a obtenção de lâminas com cortes transversais de espessura de 7 µm.

As lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina (HE), e avaliadas em microscópio de luz, com objetiva de 40x. Posteriormente, as lâminas foram fotomicrografadas em 10 campos por músculo e analisadas quanto a formato das fibras, presença de fibroblastos e tecido conjuntivo.

Análise estatística

Os dados foram apresentados em média e desvio-padrão e a análise estatística foi realizada no programa Biostat 5.0 utilizando-se Anova unidirecional com pós-teste t. O nível de significância foi 5%.

Resultados

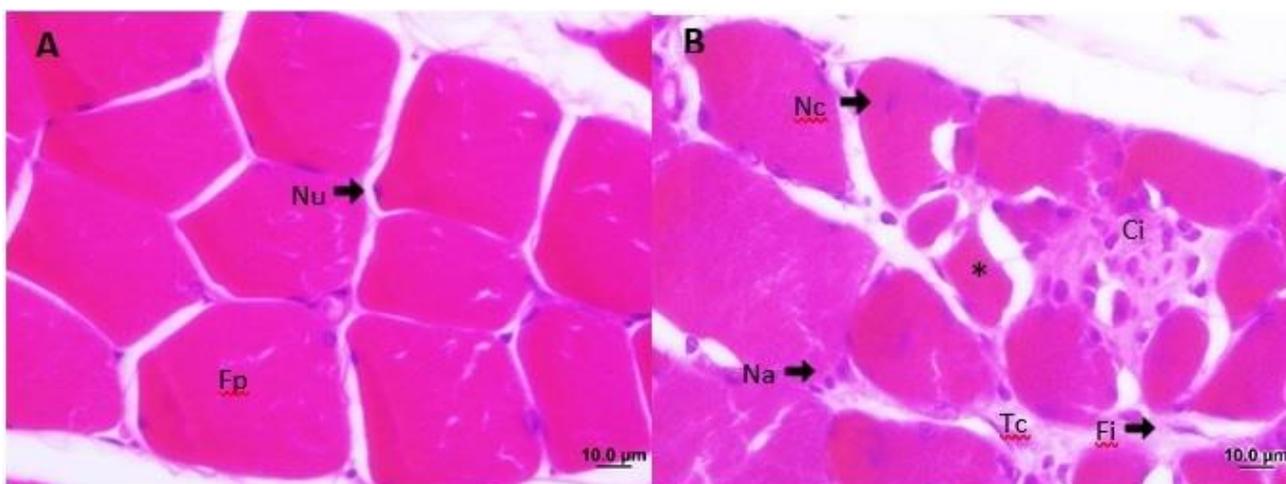
Para a força de preensão houve redução significativa nos valores ($F = 6,18$; $p = 0,011$), sendo encontradas as diferenças entre AV1 e AV2 ($p = 0,0031$). Para a nocicepção também foram observadas diferenças significativas ($F = 9,25$, $p = 0,0027$), os valores de AV2 ($p < 0,001$) e AV3 ($p = 0,0109$) foram maiores do que AV1 (Tabela I).

Tabela I - Análise da força e da nocicepção nos três períodos de avaliação.

	AV1	AV2	AV3
Força (g)	63,3 ± 37,5 ^a	9,3 ± 7,1 ^b	36,3 ± 25,8 ^{ab}
Nocicepção (ms)	72,1 ± 24,9 ^a	114,7 ± 16,4 ^b	101,5 ± 8,0 ^b

AV1 = pré-lesão; AV2 = segundo dia pós-lesão; AV3 = sexto dia pós-lesão; g = gramas; ms = milissegundos. Letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas.

Na análise morfológica do músculo gastrocnêmio dos animais em região controle (fora da lesão), foram visualizadas fibras musculares com aspecto normal, ou seja, formato poligonal, núcleos dispostos periféricamente, com padrão fascicular de organização, delimitado pelo perimísio e cada fibra circundada pelo endomísio. O conjuntivo de aspecto frouxo, com fibras colágenas eosinófilas, fibroblastos e presença de vasos sanguíneos. Na região das fibras musculares, adjacentes à lesão induzida por agulha, observou-se a redução do tamanho da área de secção transversa, fibras em formato polimórfico, presença de núcleos centrais, bem como alinhados na periferia da fibra, desarranjo do padrão fascicular, aumento do calibre de vasos sanguíneos, aumento da quantidade de tecido conjuntivo entre as fibras e fascículo, bem como de fibroblastos e células inflamatórias (Figura 1).



Em A, região controle (sem lesão): fibras poligonais (Fp) com seus respectivos núcleos periféricos (Nu), organizados em fascículos. Em B, região lesão, fibras musculares polimórficas (*), alguns núcleos centrais (Nc), outros aglomerados (Na) na periferia da fibra, fibroblastos (Fi), células inflamatórias (Ci), proliferação e desorganização do tecido conjuntivo (Tc). Barra 10 µm.

Figura 1 - Fotomicrografias do músculo gastrocnêmio de ratos Wistar, corte transversal, coloração hematoxilina e eosina.

Discussão

As lesões musculares são extremamente comuns, principalmente na prática esportiva, contudo, ainda é relativamente pouco explorada, com relação aos seus mecanismos e formas de tratamento [18]. Assim, o presente estudo buscou avaliar um modelo de lesão muscular proposto, tendo como base tanto avaliações funcionais quanto morfológicas teciduais, mais simples e factíveis a maior parte de laboratórios de pesquisa, do que imunofluorescência, imagens de Ressonância Nuclear Magnética e força tetânica utilizada por Contreras-Muñoz et al. [15].

No presente estudo, o modelo de lesão por agulha de biópsia proposto por Contreras-Muñoz et al. [15] se mostrou eficaz na indução da lesão muscular, com evidente diminuição da força no segundo dia pós-lesão. Paulsen et al. [19] relatam que alterações nas capacidades

funcionais estão associadas às mudanças histológicas e histoquímicas do tecido muscular estriado esquelético, caracterizadas por presença de células inflamatórias, degeneração das miofibrilas, rompimento dos miofilamentos e desorganização da arquitetura dos sarcômeros, prejudicando a funcionalidade muscular.

Contreras-Muñoz *et al.* [15] observaram redução na capacidade contrátil muscular, porém para isso realizaram isolamento do músculo e eletroestimulação. No presente estudo buscou-se analisar a força muscular com o animal vivo, realizando uma tarefa funcional, que é a preensão. Assim, provavelmente o prejuízo funcional causado pela redução da força muscular observada nos animais após a lesão é consequência direta das alterações morfológicas e bioquímicas promovidas pelo processo inflamatório em curso, e mesmo que para a preensão o músculo gastrocnêmio não seja efector primário, pela característica de sinergismo muscular [20,21] afetou tal função.

As lesões musculares, além de promoverem o quadro álgico, geram edema e aumento da síntese de proteínas, caracterizando o início do processo inflamatório [22]. Na análise morfológica foi possível observar a presença de vasos, células inflamatórias, fibroblastos além de aumento no tecido conjuntivo, característico do processo de inflamação/reparo tecidual [18,23]. O que também responde ao período de redução do limiar nociceptivo, observado tanto no segundo quanto no sexto dia de avaliação.

Com o modelo de lesão utilizado foi possível avaliar o estado da lesão, por meio de avaliações funcionais simples, como força de preensão e nocicepção, bem como achados morfológicos com coloração por HE.

Conclusão

A lesão muscular por agulha de biópsia provocou redução da força de preensão e da nocicepção do membro lesado dos animais. Além disso, a análise morfológica do músculo gastrocnêmio evidenciou as etapas características do processo de degeneração muscular e início do processo de regeneração.

Referências

1. Bandeira F, Neves EB, Barroso GC, Nohama P. Métodos de apoio ao diagnóstico de lesões musculares. *Revista Brasileira Inovação Tecnológica em Saúde* 2013;3(3):27-44. <https://doi.org/10.18816/r-bits.v3i3.4509>
2. Ramos GA, Arliani GG, Astur DC, Pochini A de C, Ejnisman B, Cohen M. Reabilitação nas lesões musculares dos isquiotibiais: revisão da literatura. *Rev Bras Ortop* 2017;52(1):11-6. <https://doi.org/10.1016/j.rbo.2016.02.006>
3. Uebliacker P, Müller-Wohlfahrt HW, Ekstrand J. Epidemiological and clinical outcome comparison of indirect ('strain') versus direct ('contusion') anterior and posterior thigh muscle injuries in male elite football players: UEFA Elite League study of 2287 thigh injuries (2001-2013). *Br J Sports Med* 2015;49(22):1461-5. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2014-094285>
4. Ekstrand J, Hägglund M, Waldén M. Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). *Am J Sports Med* 2011;39(6):1226-32. <https://doi.org/10.1177/0363546510395879>
5. Mueller-Wohlfahrt H-W, Haensel L, Mithoefer K, Ekstrand J, English B, McNally S et al. Terminology and classification of muscle injuries in sport: the Munich consensus statement. *Br J Sports Med* 2013;47(6):342-50. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2012-091448>
6. Monteiro R, Brandau R, Gomes WJ, Braile DM. Tendências em experimentação animal. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2009;24(4):506-13. <https://doi.org/10.1590/s0102-76382009000500012>
7. Fagundes DJ, Taha MO. Animal disease model: choice's criteria and current animals specimens. *Acta Cir Bras* 2004;19(1):59-65. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502004000100010>
8. Abreu VGC, Correa GM, Silva TM, Fontoura HS, Cara DC, Piló-Veloso D et al. Anti-inflammatory effects in muscle injury by transdermal application of gel with *Lychnophora pinaster* aerial parts using phonophoresis in rats. *BMC Complement Altern Med* 2013;13(270). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-270>

9. Borrione P, Grasso L, Chierito E, Geuna S, Racca S, Abbadessa G et al. Experimental model for the study of the effects of platelet-rich plasma on the early phases of muscle healing. *Blood Transfus* 2014;12(Supl1):s221-8.
10. Criswell TL, Corona BT, Ward CL, Miller M, Patel M, Wang Z et al. Compression-induced muscle injury in rats that mimics compartment syndrome in humans. *Am J Pathol* 2012;180(2):787-97. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.012>
11. Eardley WGP, Martin KR, Taylor C, Kirkman E, Clasper JC, Watts SA. The development of an experimental model of contaminated muscle injury in rabbits. *Int J Low Extrem Wounds* 2012;11(4):254-63. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1534734612465623>
12. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM. The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. *Inflamm Res* 2011;60(4):347-56. <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0277-2>
13. Karamanos DG, Karkos CD, Kamaroudis AG, Kritsepi M, Papadopoulos S, Spyridis CT et al. The effect of antithrombin-III on routine hematological and biochemical parameters in an experimental animal model of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Hippokratia* 2014;18(3):234-9.
14. Ramos L, Leal Junior ECP, Pallotta RC, Frigo L, Marcos RL, De Carvalho MHC et al. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in experimental model of strain-induced skeletal muscle injury in rats: Effects on functional outcomes. *Photochem Photobiol* 2012;88(1):154-60. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01030.x>
15. Contreras-Muñoz P, Fernández-Martín A, Torrella R, Serres X, De La Varga M, Viscor G et al. A new surgical model of skeletal muscle injuries in rats reproduces human sports lesions. *Int J Sports Med* 2016;37(3):183-90. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1555933>
16. Bertelli JA, Mira JC. The grasping test: a simple behavioral method assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods* 1995;58(1-2):151-5. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)00169-h](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)00169-h)
17. Vivancos GG, Verri Jr WA, Cunha TM, Schivo IRS, Parada CA, Cunha FQ et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian J Med Biol Res* 2004;37(3):391-9. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000300017>
18. Järvinen TAH, Järvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle. *Muscles Ligaments Tendons J* 2013;3(4):337-45.
19. Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exerc Immunol Rev* 2012;18:42-97.
20. Ribeiro SR, Tierra-Criollo CJ, Martins RÁBL. Efeitos de diferentes esforços de luta de judô na atividade enzimática, atividade elétrica muscular e parâmetros biomecânicos de atletas de elite. *Rev Bras Med Esporte* 2006;12:27-32. <https://doi.org/10.1590/s1517-86922006000100006>
21. Resende APM, Nakamura MU, Ferreira EAG, Petricelli CD, Alexandre SM et al. Eletromiografia de superfície para avaliação dos músculos do assoalho pélvico feminino: revisão de literatura. *Fisioter Pesqui* 2011;18(3):292-7. <https://doi.org/10.1590/s1809-29502011000300016>
22. Liu C, Zhi Z, Tuchin V V., Luo Q, Zhu D. Enhancement of skin optical clearing efficacy using photo-irradiation. *Lasers Surg Med* 2010;42(2):132-40. <https://doi.org/10.1002/lsm.20900>
23. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle Injuries. *Am J Sports Med* 2005;33(5):745-64. <https://doi.org/10.1177/0363546505274714>