

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

ANA CAROLINA BRANDT DE MACEDO

**ESTUDO COMPARATIVO MORFOLÓGICO E
IMUNOHISTOQUÍMICO ENTRE DIFERENTES
MÉTODOS DE TRATAMENTO DA CONTUSÃO
MUSCULAR DE GASTROCNEMIO EM RATOS**



CURITIBA
2014

ANA CAROLINA BRANDT DE MACEDO

**ESTUDO COMPARATIVO MORFOLÓGICO E
IMUNOHISTOQUÍMICO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE
TRATAMENTO DA CONTUSÃO MUSCULAR DE
GASTROCNEMIO EM RATOS**

**Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do Título de
Doutor em Educação Física do
Programa de Pós-Graduação em
Educação Física, do Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Paraná.**


**Orientadora: Profa. Dra. Anna Raquel Silveira Gomes
Coorientadora: Profa. Dra. Lucia de Noronha**

TERMO DE APROVAÇÃO


ANA CAROLINA BRANDT DE MACEDO

“Estudo comparativo morfológico e imunohistoquímico entre diferentes métodos de tratamento da contusão muscular de gastrocnemio em ratos”


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Educação Física – Área de Concentração: Exercício e Esporte; Linha de Pesquisa: Atividade Física e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:




Prof.ª Dr.ª Anna Raquel Silveira Gomes
Presidente / Orientadora - BL/UFPR




Prof.ª Dr.ª Lucia de Noronha
Coorientadora



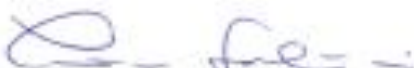
Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Membro Interno



Prof. Dr. Paulo Cesar Barauce Bento
Membro Interno



Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza
Membro Externo



Prof.ª Dr.ª Tania de Fatima Salvini
Membro Externo

Curitiba, 28 de Março de 2014.

Dedicatória

Aos meus pais, marido e filhos

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Ao meu marido Rafael Michel de Macedo, que me incentivou a iniciar o doutorado mesmo com um bebê pequeno. Obrigado por ser meu amigo, meu companheiro, meu amor, por me ajudar nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Sem você esse sonho não seria possível;

Aos meus filhos Leonardo, Gabriel e Pedro que são a razão do meu viver;

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram a terminar essa caminhada;

A minha orientadora Anna Raquel Silveira Gomes que me aceitou como orientanda e realizou meu sonho de trabalhar com pesquisa experimental. Você é um exemplo de pessoa, profissional e pesquisadora. Obrigada por me apoiar nos momentos difíceis e acreditar que meu trabalho seria possível, mesmo com tantas dificuldades que passamos;

À minha coorientadora Lucia de Noronha que tornou possível a realização desse trabalho;

A minha grande amiga e companheira Julye Leiko Ywazaki, por todo ensinamento e ajuda durante a parte prática do meu trabalho. Sem você nada seria possível. Obrigada pela força em todos os momentos de dificuldades. Só nós sabemos o que passamos... Serei eternamente grata....

Aos meus alunos da Unibrasil, em especial a Sibelly Blum Gonçalves, Jaqueline Pacheco, Tallyta Camargo, Carolina Cantuário e Fabrizio Conduto pelo auxílio no laboratório;

A minha Sogra Sandra Maria Michel de Macedo que ajudou a cuidar dos meus filhos;

A minha irmã Ana Paula Brandt Mielke pela ajuda no meu primeiro ano com o meu filho pra que eu pudesse cursar as disciplinas;

À PUC-Pr pela utilização do laboratório de Patologia;

A Unibrasil pelo empréstimo do biotério e laboratório de fisiologia;

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

PARTE I

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos agudos do alongamento após contusão do gastrocnêmio de ratos. Foram selecionados 33 ratos *Wistar* machos (8 semanas, 219 ± 35 g) que foram divididos em 4 grupos: Controle (GC, n=3)- intacto; Lesão (GL, n=10); Alongamento (GA, n=10); Lesão e Alongamento (GLA, n=10). O gastrocnêmio direito (GD) foi submetido à contusão. O alongamento do GD foi realizado manualmente, 4 repetições de 30s, durante 5 dias, iniciado 72h após a lesão. Após 1 semana, os ratos foram pesados e os músculos de ambas as patas foram retirados para análise do peso e comprimento muscular, número e comprimento dos sarcômeros. O peso corporal final aumentou em todos os grupos. O peso, comprimento muscular e número de sarcômeros em série (NSS) do GL foram maiores que o GA. Porém, NSS do GLA foi superior ao GA. O comprimento dos sarcômeros do GA foi maior que os demais grupos. Conclui-se que a contusão e alongamento não interferiram no ganho de peso corporal. O alongamento induziu sarcomerogênese em músculos lesados, porém, não modificou o músculo hígido.

Palavras-chave: sistema musculoesquelético, lesões, exercícios de alongamento muscular, sarcômeros, ratos.

PARTE I

ABSTRACT

The aim of this study was evaluated the acute effects of stretching after gastrocnemius contusion in rats. It was selected 33 Male *Wistar* rats (8 weeks, 219±35g) were divided into 4 groups: Control (GC, n=3)- intact, Lesion (GL, n=10); Stretching (GS, n=10): Lesion and stretching (GLS, n=10). The right gastrocnemius (GR) was submitted to contusion. The stretching on GR was performed manually, 4 repetitions of 30s each day, for 5 consecutive days, beginning 72 h after contusion. One week later, the rats were weighed and both were removed for investigation of muscle length, serial sarcomere number and sarcomere length. The final body weight increased in all groups. The muscle weight and length, serial sarcomere number (SSN) of GL were greater than GS. However, the SSN of GLS was higher than GS. The sarcomere length of GS was higher than all groups. It was concluded that the contusion and stretching doesn't affect the body weight gain. The stretching induced sarcomerogenesis in injured muscle, but did not modify the healthy muscle.

key-words: muscle skeletal system, injuries, muscle stretching exercise, sarcomeres, rats.

PARTE II

RESUMO

Objetivo: comparar os efeitos do alongamento e/ou ultrassom terapêutico, na morfologia e imunohistoquímica muscular após contusão em ratos. Metodologia: Ratos albinos machos (n=35, 8-9 semanas, 271±14g), foram divididos em cinco grupos: Grupo Controle (GC, n=03); Grupo Lesão (GL, n=8); Grupo Lesão + Ultrassom (GLUS, n=8); Grupo Lesão + Alongamento (GLA, n=8); Grupo Lesão + Ultrassom + Alongamento (GLUSA, n=8). O gastrocnêmio direito foi submetido à contusão. A aplicação do ultrassom foi iniciada 72h após a contusão e os parâmetros utilizados foram: modo pulsado 50%, 0,5 W/cm², 5 min. Foram realizadas 5 aplicações, uma por dia, durante 5 dias consecutivos. No 10^o dia foi iniciado o alongamento passivo manual do MG direito, 4 repetições de 30s, com 30s de repouso entre cada repetição, 1 vez por dia, de segunda à sexta-feira, por 2 semanas, totalizando 10 aplicações. Após 22 dias, os ratos foram pesados e os músculos de ambas as patas foram retirados para análise do peso e comprimento muscular, número e comprimento dos sarcômeros, área de secção transversa e porcentagem de colágeno (I e III), área da desmina e laminina. A análise dos resultados foi realizada por meio da ANOVA *post hoc Tukey* e para valores não paramétricos foi usado Kruskal Wallis (p<0,05). Resultados: Foi encontrado aumento significativo do peso corporal final em relação ao inicial em todos os grupos. Não foi encontrada diferença significativa no peso e comprimento musculares. Na estimativa do número de sarcômeros em série foi encontrado aumento significativo (p<0,05) entre GLA e GLUS (8479±276 vs 6856±1133); GLUSA e GLUS (8811±648 vs 6856±1133) e GLUSA e GC (8811±648 vs 6615±233) e no comprimento dos sarcômeros entre GLUS e GLA (3,2±0,4 µm vs 2,7±0,4µm). Na área de secção transversa foi observado aumento do GL quando comparado com o GLA (12787± 995µm² vs 8721±2341µm²) e na porcentagem de colágeno (I) entre GL e GLA (40±12% vs 24±14%); GL e GC (40±12% vs 21±9%); GLUS e GLA (37±10% vs 24±14%); GLUS e GC (38±10% vs 21%) e GLUSA e GC (36±12% vs 21±9%). A área de desmina encontrada no GLUSA foi maior do que no GLA (3069±989 µm² vs 1549±513 µm², p=0,02). Não foi encontrada diferença significativa

na área de laminina. Conclusão: os protocolos de intervenção não interferiam no ganho de peso corporal dos animais. A associação do ultrassom com o alongamento foi determinante para a sarcomerogênese, porém, somente o alongamento preveniu o aumento de colágeno nos músculos lesados. O ultrassom associado ao alongamento melhorou a regeneração muscular.

Palavras-chave: sistema músculo esquelético, lesões, exercícios de alongamento muscular, terapia por ultrassom, desmina, laminina.

PARTE II

ABSTRACT

Objective: compare the effects of therapeutic ultrasound and/or stretching on muscle morphology and immuno-histochemical after rat muscle contusion. Methodology: Male albin rats (n=35, 8-9 weeks, 271±14g) were divided in five groups: control group (CG, n=3); lesion group (LG, n=8); lesion + ultrasound group (LUG, n=8); lesion + stretching group (LSG, n=8); lesion + ultrasound + stretching group (LUSG, n=8). The right gastrocnemius was submitted by contusion. The ultrasound was initiated after 72h of contusion in 50% pulsed mode, 0,5 W/cm², 5 min. It was realized 5 applications, once a day, during 5 consecutive days. In the tenth day, the passive stretching was initiated (4 stretches lasting 30s each with 30s of rest), once a day, during 2 weeks, totalizing 10 applications. Initial and final body weight, muscle weight and length, number and length sarcomere, muscle fiber cross sectional area, percentage of collagen (I e III), laminin and desmin were evaluated after 22 days. The statistical analysis was made by ANOVA *post hoc Tukey* to parametric values and *Kruskall Wallis* to non-parametric values (p<0,05). Results: The final body weight was higher than initial in all groups. The sarcomeres number was statistical higher (p<0,05) in LSG than LUG (8479±276 vs 6856±1133); LUSG and LUG (8811±648 vs 6856±1133) and LUSG and CG (8811±648 vs 6615±233); in length sarcomere between LUG and LSG (3,2±0,4 µm vs 2,7±0,4 µm). The cross sectional area in LG was higher than LSG (12787± 995 µm² vs 8721±2341µm²) and the percentage of collagen (I) between LG and LUG (40±12% vs 24±14%), LG e CG (40±12% vs 21±9%; LUG e LSG (37±10% vs 24±14%); LUG e CG (38±10% vs 21%) e LUSG e CG (36±12% vs 21±9%). A larger area of desmin was found in LUSG than in LSG (3069±989 µm² vs 1549±513 µm², p=0,02). No significant differences were found for the area of laminin. Conclusion: the protocols did not interfere in increase of body weight. The combination of ultrasound with the stretch was crucial to the sarcomerogenesis, however, only stretching prevented the increase of collagen in the injured muscles. The combination ultrasound and stretching increase muscle regeneration.

Key-words: muscle skeletal system, injuries, muscle stretching exercise , ultrasonic therapy, desmin, laminin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Representação esquemática do processo de regeneração muscular	33
FIGURA 2- Desenho esquemático da interação das células inflamatórias com o músculo lesado	36
FIGURA 3- Proteínas auxiliaadoras na manutenção do sarcômero	60
FIGURA 4- Mecanismos envolvidos no músculo submetido a uma carga mecânica intensa e resposta adaptativa da matrix extracelular	61
FIGURA 5- Desenho esquemático da laminina demonstrando a organização dos seus domínios 111 e 121.	63
FIGURA 6- Receptores de laminina 211 e sua ligação com as integrinas e distroglicanas. Adaptado de DURBEEJ, 2010.	65
FIGURA 7- Fluxograma do estudo- Parte I	67
FIGURA 8- Contusão do músculo gastrocnêmio	68
FIGURA 9- Alongamento manual passivo do músculo gastrocnêmio direito	69
FIGURA 10- Músculo gastrocnêmio sendo manipulado com pinças ultrafinas para o isolamento das fibras musculares	70
FIGURA 11- Fotomicrografia de uma fibra muscular isolada (Objetiva de 100x)	71
FIGURA 12- Efeito do alongamento no peso muscular do gastrocnêmio de ratos	73
FIGURA 13- Comprimento muscular dos sarcômeros de gastrocnêmio de ratos	74
FIGURA 14- Estimativa do número dos sarcômeros dos gastrocnêmios dos ratos	75
FIGURA 15- Comprimento do sarcômero dos gastrocnêmios dos ratos	76
FIGURA 16- Fluxograma do experimento	82
FIGURA 17- Aplicação do ultrassom no músculo gastrocnêmio direito.	83
FIGURA 18- Aparelho de ultrassom e o cabeçote utilizados	84
FIGURA 19- Pesagem do músculo na balança	85
FIGURA 20- Mensuração do comprimento muscular com o paquímetro	85
FIGURA 21- - Desenho esquemático da divisão do músculo gastrocnêmio para posterior análise histomorfométrica	86
FIGURA 22- Corte histológico transversal do músculo gastrocnêmio para mensuração da ASTFM por meio do programa <i>Image Pro Plus 4.0</i>	88

FIGURA 23- Lâminas com cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio coradas com <i>Sirius Red</i>	90
FIGURA 24- Blocos receptores amostrais	91
FIGURA 25- Mapeamento do bloco amostral	91
FIGURA 26- Câmara úmida contendo os cortes histológicos com o anticorpo	92
FIGURA 27- Fotomicrografia de cortes histológicos transversais do gastrocnêmio com reação imunohistoquímica para desmina	94
FIGURA 28- Imunohistoquímica para laminina	95
FIGURA 29- Efeitos do alongamento e/ou ultrassom no peso muscular do gastrocnêmio de ratos	97
FIGURA 30- Efeitos do alongamento e/ou ultrassom no comprimento muscular do gastrocnêmio de ratos	98
FIGURA 31- Efeitos do alongamento e/ou ultrassom na estimativa do número de sarcômero em série (enss) do músculo gastrocnêmio de ratos	99
FIGURA 32- Efeitos do alongamento e/ou ultrassom no comprimento do sarcômero do músculo gastrocnêmio de ratos	100
FIGURA 33- Efeitos do alongamento e/ou ultrassom na área de secção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio de ratos	101
FIGURA 34- Cortes histológicos da ASTFM do músculo gastrocnêmio dos ratos	102
FIGURA 35- Efeitos do alongamento e/ou ultrassom na porcentagem do colágeno do músculo gastrocnêmio de ratos	104
FIGURA 36- Cortes histológicos da porcentagem de colágeno do músculo gastrocnêmio dos ratos	105
FIGURA 37- Lâminas da porcentagem de desmina do músculo gastrocnêmio de ratos	107
FIGURA 38- Lâminas da porcentagem de laminina do músculo gastrocnêmio de ratos	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Efeito do alongamento no peso corporal dos ratos	72
TABELA 2– Efeitos do ultrassom e/ou alongamento no peso corporal dos ratos.	96
TABELA 3- Efeitos do alongamento e/ou ultrassom na área de desmina do músculo gastrocnemio dos ratos	106
TABELA 4- Efeitos do alongamento e/ou ultrassom na área de laminina do músculo gastrocnêmio dos ratos	108

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Perfil histoquímico das unidades musculares do gastrocnêmio (adaptado de BURKE et al., 1973).	31
QUADRO 2- Espessuras necessárias para cada tecido para reduzir 50% da energia ultrasônica (HOOGLAND, 1986)	44
QUADRO 3- Resposta dos Fisioterapeutas sobre os parâmetros utilizados para tratamento (Adaptado de WONG et al., 2007)	50
QUADRO 4- Uso do ultrassom e seu nível de evidência durante as fases do processo de cicatrização e reparo (MICHLOVITZ et al., 2012).	51

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADM- amplitude de movimento
ADP- adenosina difosfato
ASTFM- área de secção transversa das fibras musculares
ATP- adenosina trifosfato
ATPase- Ac- Adenosina trifosfatase acetato veronal
ATPase EDTA: adenosina trifosfatase ácido etilendiamino tetra-acético
Ca⁺²- cálcio
CR- contrair- relaxar
CRC- contrair- relaxar- contrair
ENSS- estimativa do número de sarcômeros em série
FGF - fator de crescimento de fibroblasto
FKN- fractalquina
FNP- facilitação neuromuscular proprioceptiva
GA- grupo alongamento
GC- grupo controle
GLA- grupo lesão + alongamento
GL- grupo lesão
GLUS- grupo lesão + ultrassom
GLUSA- grupo lesão + ultrassom + alongamento
HE- hemotoxilina eosina
HGF- fator de crescimento hepatócito
HSPs- proteínas de choque térmico
Hz- hertz
IGF- fator de crescimento similar a insulina
IL-1- interleucina 1
IL-6- interleucina 6
KHz- kilohertz
MCR- manter-contrair-relaxar
MCP-1- proteína 1 quimioatraente de monócito
MDC- quimiocina derivada de macrófagos
MG- músculo gastrocnêmio

MGD- músculo gastrocnêmio direito
MPO- mieloperoxidase
ms- milissegundos
m/s- metros por segundo
Na⁺¹⁻ sódio
NaCl- cloreto de sódio
NaDH- nicotinamida nucleotideo desidrogenase
NO- óxido nítrico
SDH- desidrogenase succinica
SOD- superóxido dismutase
TGF- fator de transformação do crescimento
TnC- troponina C
TNF α - fator α de necrose tumoral
TnI- tronina I
TnT- troponina T
UST- ultrassom terapêutico
VEGF- NO- fator de crescimento endotelial vascular - óxido nítrico
VEGF- fator de crescimento endotelial vascular
W/cm²- watts por centímetros quadrados
 μ PAR- receptor ativador de plasminogênio tipo uroquinase
 μ PA- uroquinase;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. HIPÓTESES	26
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
4.1 ESTRUTURA DO SISTEMA MUSCULOESQUELETICO	27
4.2 MÚSCULO GASTROCNÊMIO	29
4.3 LESÃO MUSCULOESQUELETICA	31
4.4 REGENERAÇÃO MUSCULOESQUELETICA	32
4.4.1 Fase inflamatória	33
4.4.2 Fase proliferativa	37
4.4.3 Fase de remodelação	39
4.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA CONTUSÃO MÚSCULO ESQUELÉTICA	40
4.6 CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO	42
4.6.1 Efeitos biofísicos do ultrassom	43
4.6.2 Interação do ultrassom com o tecido	47
4.6.3 Ultrassom e contusão muscular	49
4.7 ALONGAMENTO	49
4.7.1 Alongamento e contusão muscular	55
4.8 ARQUITETURA MUSCULAR	57
4.9 DESMINA	59
4.10 LAMININA	62
PARTE I	66
5. MATERIAL E MÉTODO	66
5.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	66
5.2 PROTOCOLO PARA PROMOVER A CONTUSÃO MUSCULAR	67

5.3 PROTOCOLO PARA O ALONGAMENTO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO	68
5.4 ORTOTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS MÚSCULOS	69
5.5 ESTIMATIVA DE SARCÔMEROS EM SÉRIE E COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS	69
5.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS	71
6 RESULTADOS	72
6.1 PESO CORPORAL	72
6.2 PESO MUSCULAR	73
6.3 COMPRIMENTO MUSCULAR DO GASTROCNÊMIO	73
6.4 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE	74
6.5 COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS	75
7 DISCUSSÃO	76
8 CONCLUSÃO	80
PARTE II	81
9 MATERIAL E MÉTODO	81
9.1 PROTOCOLO PARA PROMOVER A CONTUSÃO MUSCULAR	83
9.2 PROTOCOLO PARA A TERAPIA POR UST	83
9.3 PROTOCOLO PARA O ALONGAMENTO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO	84
9.4 ORTOTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS MÚSCULOS	84
9.5 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	86
9.5.1 Parafinização do Material (Michalany, 1998)	86
9.5.2 Coloração dos Cortes Transversais com Hematoxilina e Eosina-HE (Michalany, 1998)	87
9.5.3 Análise da Área de Secção Transversa das Fibras Musculares-ASTFM (Histomorfometria) (Torres et al, 2009)	87
9.5.4 Coloração com <i>Sirius Red</i> (Michalany, 1998)	89
9.5.5 Análise do Tecido Conjuntivo (Biondo-Simões et al, 2005)	89
9.6 IDENTIFICAÇÃO DO NÚMERO E COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS EM SÉRIE (Gomes et al., 2006)	90
9.7 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA (WAKAMATSU et al., 1995)	90

9.8 ANÁLISES DOS RESULTADOS	95
10 RESULTADOS	95
10.1 PESO CORPORAL	95
10.2 PESO MUSCULAR	96
10.3 COMPRIMENTO MUSCULAR DO GASTROCNÊMIO	97
10.4 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE (ENSS)	98
10.5 COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS	99
10.6 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES (ASTFM)	100
10.7 ANÁLISE DOS COLÁGENOS I (MADURO) E III (IMATURO) (<i>PICROSIRIUS</i>)	103
10.8 DESMINA	106
10.9 LAMININA	108
11 DISCUSSÃO	110
11.1 PESO CORPORAL	110
11.2 PESO MUSCULAR	111
11.3 COMPRIMENTO MUSCULAR, ESTIMATIVA DO NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE, COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS	112
11.4 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES (ASTFM)	115
11.5 ANÁLISE DO COLÁGENO (<i>PICROSIRIUS</i>)	116
11.8 DESMINA E LAMININA	118
12 CONCLUSÕES	121
13 APOIO FINANCEIRO	122
14 APOIO TÉCNICO	123
15 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
ANEXOS	150
ANEXO I	151
ANEXO II	153

1. INTRODUÇÃO

A prática esportiva tem se tornado cada vez mais frequente ao longo dos anos e com isso aumenta-se a exigência do esforço físico dos atletas de alto nível, podendo acarretar lesões musculoesqueléticas (SMITH et al., 2008).

A contusão e as distensões envolvem 90% das lesões esportivas, sendo a contusão em torno de 60% (SMITH et al., 2008). Apesar da grande prevalência dessas lesões no ambiente esportivo, há poucos estudos clínicos sobre o tratamento dessas lesões, podendo ser devido aos diferentes graus de severidade da lesão e também por acometer músculos diversos, sendo difícil a padronização de tratamentos (JARVINEN et al., 2005; 2007).

A contusão é lesão causada por trauma direto no musculoesquelético, que aplica força compressiva sobre o tecido muscular (JARVINEN et al., 2007). Essa lesão resulta em: ruptura capilar, sangramento local e gera resposta inflamatória. Pode alterar a área (diminuição da área de secção transversa das fibras dos tipos I e II) e a incidência dos diferentes tipos de fibras (diminuição das do tipo II e aumento das híbridas) (MINAMOTO et al., 2001), o que pode comprometer o desempenho muscular. Os músculos mais comumente envolvidos são: o quadríceps e o gastrocnêmio, devido a colisões diretas durante a prática da atividade física e também em virtude desses músculos cruzarem duas articulações e serem predominantes fásicos (TOUMI et al., 2006; FERNANDES et al., 2011).

O grau da contusão depende da severidade da lesão, podendo ser classificada em leve, moderada ou grave. Nas contusões leves (grau 1) ocorre pouco edema e dor, com mobilidade articular quase normal, sem alteração na marcha. Nas moderadas (grau 2) surge edema moderado e dor difusa, com diminuição da capacidade de contração muscular. Nas graves ou severas (grau 3) o quadro doloroso e o espasmo muscular são mais intensos, há perda completa da função e a marcha é claudicante (JARVINEN et al., 2005; FERNANDES et al., 2011).

O reparo rápido e completo da lesão muscular é alvo da traumatologia e medicina esportiva. Segundo Smith et al. (2008), devido aos diversos fatores envolvidos na lesão muscular, sugere-se que um único tratamento não seja suficiente para o tratamento global de todos os tipos e fases da contusão. A

recuperação da contusão músculo esquelética tem sido estudada em experimentos animais, por meio de modelos desenvolvidos para mimetizar as alterações musculares causadas por este tipo de lesão, dentre estes citam-se: a criolesão (MIYABARA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006); a laceração (PIEADADE et al., 2008) e a mecânica por trauma direto (STRATTON et al., 1984; MINAMOTO et al., 2001).

No presente estudo optou-se pelo modelo por trauma direto, já que a criolesão e a laceração exigiriam incisão na pele, sendo difícil a aplicação do ultrassom terapêutico, pois segundo Agne (2009) seria necessária a colocação de uma almofada especial de gel descartável ou uma fina película plástica (papel filme) para evitar o contato direto do cabeçote sobre a ferida. Além disso, os modelos de criolesão e/laceração poderiam aumentar o risco de infecção no local da contusão e/ou sutura, prejudicando o seguimento do protocolo experimental constituído pelo tratamento com ultrassom e/ou alongamento muscular (PESTANA et al., 2012).

Ainda, o projétil utilizado para gerar o trauma mecânico, para induzir a contusão muscular no presente estudo, possuía superfície plana, sendo que têm sido descrito que somente com este tipo de superfície é possível alcançar lesão uniforme, segundo Smith et al. (2008).

Poucos estudos clínicos ou experimentais têm sido feitos comparando os diferentes tratamentos da contusão (NOONAN; GARRETT, 1999). Várias técnicas de intervenção fisioterapêutica são utilizadas para acelerar o processo de reparo muscular e o reestabelecimento da função, tais como: crioterapia (SCHASER et al, 2010); o ultrassom terapêutico (UST) (PIEADADE et al., 2008; SHU et al., 2012); L.A.S.E.R. (FALCAI et al., 2010); plasma rico em plaquetas (RETTIG et al., 2013); a mobilização precoce e exercícios (JARVINEN et al., 2005 e 2007).

Dentre estas terapêuticas destacam-se as intervenções com UST (JARVINEN et al, 2007) e com alongamento (TORRES et al., 2012). Porém, ambas apresentam baixo nível de evidência quanto a sua eficácia (REURINK et al., 2012; MASON et al., 2012). Jarvinen et al. (2005) realizaram trabalho de revisão envolvendo 170 artigos relacionando lesões musculares e tratamento com medicação, UST e fisioterapia convencional. Quanto a terapêutica com o ultrassom, os autores concluem que apesar de recomendado para tratamento, seu nível de evidência quanto a eficácia é baixo. Em trabalho experimental, Wilkin et al. (2008) avaliaram a eficácia do UST para o tratamento de lesões agudas de gastrocnêmio de ratos perante as medidas de desfecho: área de secção transversal do músculo; massa muscular;

concentração total de proteínas. Os resultados encontrados, quando comparados ao grupo controle, revelaram que a administração do UST não trouxe maiores benefícios para a regeneração do músculo lesionado.

Já Torres et al (2012) realizaram metanálise envolvendo 35 trabalhos, 651 pacientes, com o objetivo de verificar a eficácia da intervenção com massagem (n=137), crioterapia (n=158), alongamento (n=184) e exercícios de baixa carga (n=192), para o tratamento da lesão muscular induzida por treinamento físico. O desfecho do estudo demonstrou que apenas a massagem apresentou resultado estatístico positivo de melhora para as medidas de desfecho dor e capacidade funcional, contrariando as expectativas principalmente relacionadas a eficácia do alongamento. Hwang e colaboradores (2006) verificaram, através de estudo experimental em ratos, os efeitos do alongamento passivo nas fases inflamatória, regenerativa e proliferativa e concluíram que todos os grupos alongados (iniciados no 2º, 7º e 14º dia) mostraram melhora significativa na regeneração e força muscular, sendo os melhores resultados obtidos quando se iniciou o alongamento no 14º dia.

Portanto, sabe-se que tanto o UST quanto os exercícios de alongamento são largamente utilizados no tratamento da lesão muscular, porém ainda não existe consenso sobre quando e como se deve prescrever o ultrassom, o alongamento e ainda se a associação destas duas estratégias terapêuticas poderia favorecer o mecanismo de regeneração muscular esquelética. Assim, o presente estudo teve como objetivo comparar os efeitos do UST terapêutico e/ou alongamento, na contusão muscular em ratos.

O presente estudo foi dividido em 2 partes: I e II. A parte I consistiu em avaliar os efeitos agudos do alongamento após contusão na morfologia do gastrocnêmio de ratos. A parte II teve como objetivo investigar os efeitos do UST e/ou alongamento no tratamento da contusão muscular do gastrocnêmio em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar os efeitos agudos do alongamento após contusão muscular em ratos.
- Avaliar os efeitos do ultrassom e do exercício de alongamento na regeneração do músculo gastrocnêmio de ratos após contusão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o peso corporal e peso muscular;
- Medir o comprimento muscular;
- Contar o número de sarcômeros em série;
- Estimar o comprimento dos sarcômeros;
- Mensurar a área de secção transversa das fibras musculares;
- Quantificar a porcentagem de tecido conjuntivo;
- Analisar as proteínas desmina e laminina.

3. HIPÓTESES

H0- O UST e o alongamento não afetarão a histomorfometria e sarcomerogênese do músculo gastrocnêmio após contusão muscular;

H1- O UST e/ou o alongamento não afetará a área de secção transversa, somente aumentará sarcomerogênese e favorecerá o processo de regeneração do músculo gastrocnêmio após contusão;

H2- O UST e/ou alongamento impedirá a proliferação do tecido conjuntivo após a contusão muscular;

H3- O UST e/ou alongamento aumentará a quantidade de desmina após a contusão muscular, favorecendo o processo de regeneração muscular;

H4- O UST e/ou alongamento não modificará a quantidade de laminina, indicando melhora no processo de regeneração.

4. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

4.1 ESTRUTURA DO SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO

O sistema musculoesquelético é formado pelas fibras musculares, que são células longas, cilíndricas, multinucleadas e com diâmetro em torno de 10 a 100 μm (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Segundo Lieber (2002), a mensuração do diâmetro da fibra é importante, pois pode determinar a força da fibra, sendo que a mudança em sua medida pode sugerir alteração em nível muscular.

O músculo é envolvido externamente por uma membrana de tecido conjuntivo, o epimísio. Cada fibra muscular contém várias fibrilas paralelas, as miofibrilas, que preenchem o citoplasma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). As fibras musculares presentes no músculo são separadas por septos, que agrupam de dez a cem fibras musculares em fascículos, também oriundos de tecido conjuntivo que são chamados de perimísio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Este tem a função de envolver o ventre muscular para proteger e manter as fibras e fascículos organizados para potencializar a ação muscular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Tanto o epimísio quanto o perimísio contém quantidades maiores de fibras de colágeno tipo I (fibras colágenas propriamente ditas) que fibras reticulares (formadas por colágeno tipo III) (KETEYIAN; FOSS, 2000). Cada fibra muscular existente no feixe está envolvida pelo endomísio onde há predomínio de fibras reticulares (KETEYIAN; FOSS, 2000).

A miofibrila tem como característica a presença de estriações transversais (visíveis ao microscópio) e por este motivo o sistema músculo esquelético é designado estriado. Ela é formada por dois tipos de miofilamentos protéicos: o grosso que é formado pela miosina e o fino que é formado pela actina, troponina e tropomiosina. Cada miofibrila contém cerca de 1500 filamentos de miosina e 3000 filamentos de actina (GUYTON; HALL, 2006). Estes miofilamentos se interdigitam formando o sistema contrátil e sua unidade básica, o sarcômero (BERNE; LEVY, 2009). O sarcômero representa a unidade funcional da fibra muscular e da miofibrila, pois é a mínima estrutura capaz de gerar tensão e está localizado entre duas linhas Z consecutivas (AIRES, 2012).

As miofibrilas são interconectadas por proteínas especializadas conhecidas como filamentos intermediários e o maior deles é a desmina. A desmina possibilita

um sistema de suporte citoesquelético que permite eficiente carga mecânica de força gerada de uma miofibrila a outra (LIEBER, 2002).

Ao microscópio eletrônico de transmissão, a disposição dos filamentos identifica a visualização de faixas ou bandas. A faixa escura é anisotrópica e recebe o nome de banda A; a faixa clara é isotrópica e recebe o nome de banda I e na região central de cada banda I existe uma linha transversal escura chamada de linha Z. Na região central da banda A existe outra faixa, a faixa H, cuja parte central fica a linha M (AIRES, 2008). A banda A é formada principalmente por filamentos protéicos grossos, a miosina; a banda I é formada pela parte dos filamentos finos que são invadidos pelos filamentos grossos e a banda H é formada somente por miosina. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). A linha M é formada por 2 proteínas: a enzima creatina – fosfoquinase e uma proteína própria da linha M (KIERSZENBAUM; TRES, 2011).

As proteínas mais encontradas no sistema musculoesquelético, responsáveis pela contração muscular são: a miosina, a actina, a tropomiosina e a troponina (AIRES, 2008).

O filamento grosso é formado por aproximadamente 200 moléculas de miosina. Existem pequenas quantidades de outras proteínas, dentre elas encontra-se molécula de titina presente em cada metade do filamento grosso (BERNE; LEVY, 2009). A titina é responsável pela tensão passiva, assim como pelo alinhamento e manutenção da miosina no centro do sarcômero. Está organizada como uma ligação elástica entre a miosina e a linha Z (HOROWITS et al., 1986). É constituída por duas regiões: uma que se encontra na banda A do sarcômero, a qual se comporta de forma rígida quando a fibra muscular é alongada; e outra que liga a miosina à linha Z, na banda I, única região funcionalmente elástica, quando o sarcômero é alongado (WANG et al., 1985, FURST et al., 1988; ITOH et al., 1988; WHITING et al., 1989).

A miosina é a proteína mais abundante da célula muscular, representando aproximadamente 25% do conteúdo total protéico. A miosina presente do subgrupo chamado classe II ou miosina convencional, que é uma miosina sarcomérica, está associada ao processo de contração muscular (CAMMARATO et al., 2008).

A molécula de miosina é formada por uma cauda e uma cabeça. Após ligeira proteólise, a miosina pode ser dividida em meromiosina leve (cauda) e meromiosina pesada (cabeça). A cabeça possui locais específicos para combinação de ATP e é dotada de atividade ATPásica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). A cauda da

molécula se associa para formar o filamento grosso. O restante da molécula, ou seja, a cabeça e a porção em forma de braço entre as dobradiças se projetam lateralmente a partir do filamento grosso. Estas projeções são denominadas pontes cruzadas, as quais projetam-se em número de três a partir do filamento grosso (BERNE; LEVY, 2009).

A actina é uma proteína globular, formada por duas cadeias de monômeros globulares torcidos uma na outra em dupla hélice (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Cada monômero de actina possui uma região que interage com a miosina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Os filamentos de actina ancorados perpendicularmente em cada lado da linha Z exigem polaridade opostas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Existem muitas moléculas de ADP presas na cadeia de actina e estas são os pontos ativos nos filamentos de actina que vão interagir com a miosina durante a contração muscular (GUYTON; HALL, 2006).

A tropomiosina é uma molécula longa e fina, com duas cadeias polipeptídicas enroladas uma na outra formando uma α -hélice (AIRES, 2012). As moléculas unem-se umas as outras pelas extremidades para formar filamentos longos e localizam-se entre sulcos existentes entre 2 filamentos de actina-F (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Esta posição impede a interação da actina com a miosina quando a miofibrila não está contraída (AIRES, 2012).

A troponina é uma proteína globular que fica presa às moléculas de tropomiosina. É um complexo de 3 subunidades: TnT (responsável pela fixação a tropomiosina), TnC (troponina de controle e que tem grande afinidade com os íons cálcio) e TnI (cobre o sítio ativo da actina onde ocorre a interação entre a actina e a miosina) (AIRES, 2012).

O músculo gastrocnêmio é constituído por todas as proteínas citadas acima e é considerado músculo ideal para ser utilizado como modelo na contusão muscular, pois possui fibras musculares mistas, é grande, o que diminui a chance de lesão óssea durante a contusão, e é frequentemente lesionado durante a prática esportiva (SMITH et al., 2008). Suas características serão apresentadas no próximo item.

4.2 MÚSCULO GASTROCNÊMIO

O gastrocnêmio, músculo mais superficial no compartimento posterior da perna, forma parte da proeminência da panturrilha (GRAY et al., 2010). É formado

por dois ventres paralelos e muito parecidos, sendo denominados de gêmeos. Esses ventres recebem o nome de porção lateral (gêmeo externo) e porção medial (gêmeo interno) (GRAY et al., 2010). No músculo do rato, a parte lateral apresenta subunidade lateral, intermediária e medial e a parte medial não apresenta subdivisões (BENNET, 1988). Superiormente, o gastrocnêmio se fixa na epífise distal do fêmur: a porção lateral no epicôndilo lateral, e a porção medial no epicôndilo medial. As cabeças se unem na margem inferior da fossa poplíteia, onde formam os limites ífero-lateral e ífero-medial dessa fossa mais ou menos na metade da perna. Os dois ventres do gastrocnêmio se continuam inferiormente por um tendão potente que é o tendão calcâneo, o qual vai se prender na tuberosidade calcanear. Tanto o gastrocnêmio lateral quanto o medial são inervados por ramos motores separados originados do nervo tibial (GRAY et al., 2010).

A sua ação, por ser músculo biarticular, é a de flexão da perna e flexão plantar do pé. Como suas fibras são principalmente verticais, as contrações do músculo gastrocnêmio produzem movimentos rápidos durante a corrida e o salto. Embora o músculo gastrocnêmio atue em ambas as articulações, a do joelho e a talocrural, não pode exercer seu poder total em ambas as articulações ao mesmo tempo (GRAY et al., 2010).

Quanto a composição dos tipos de fibras, o gastrocnêmio é misto (Smith et al., 2008). Segundo Smith et al. (2008) é o músculo ideal para se estudar experimentalmente a contusão. Em relação aos tipos de fibras, o estudo de Burke et al. (1973) verificou o perfil histoquímico das unidades motoras do gastrocnêmio e encontrou os resultados presentes no QUADRO 1.

No presente trabalho optar-se-á pela contusão mecânica na porção medial do gastrocnêmio, pois esta não apresenta subdivisões e é a mais acometida em traumas humanos (SEGAL; SONG, 2005). As fases do processo de cicatrização e reparo da contusão muscular serão abordadas a seguir.

QUADRO 1- Perfil histoquímico das unidades musculares do gastrocnêmio (adaptado de BURKE et al., 1973).

	Tipos de unidades musculares			
	Tipo FF (rápida)	Não classificada	Tipo FR (rápida)	Tipo S (lenta)
ATPase miofibrilar	Alta	Alta	Alta	Baixa
ATPase- Ac	Intermediária	Intermediária	Baixa	Alta
ATPase- EDTA	Baixa	Baixa	Baixa	Alta
NADH	Baixa	Intermediária	Intermediária-alta	Alta
SDH	Baixa	Intermediária	Intermediária-alta	Alta
Esterase	Alta		Alta	Baixa
Lactato desidrogenase	Alta		Alta	Baixa
Gordura neutra	Baixa		Baixa	Alta
Enzima Glicogênio Sintase	Alta		Alta	Baixa
Fosforilase	Alta		Alta	Baixa

FF- fibras rápidas sensíveis à fadiga; FR- fibras rápidas resistentes a fadiga; S- fibras lentas; ATPase- adenosina trifosfatase. ATPase- Ac: adenosina trifosfatase acetato veronal ; ATPase EDTA: adenosina trifosfatase ácido etilendiamino tetra-acético; NADH- nicotinamida nucleotideo desidrogenase; SDH- desidrogenase succinica;

4.3 LESÃO MUSCULOESQUELETICA

A lesão musculoesquelética pode ser gerada por dano direto como a laceração e contusão ou por dano indireto como isquemia, denervação e estresse (NOOMAN; GARRETT, 1999). Segundo Jarvinen et al. (2007), 90% das lesões musculares são causadas por contusão. Geralmente o processo de lesão e de reparo é similar independente do tipo de lesão (HWANG et al., 2006).

Os sinais e sintomas comuns da contusão são dor localizada durante os movimentos, edema, equimose, hematoma devido ao sangramento e limitação do movimento derivada de um aumento da sensibilidade muscular causada pela lesão, pelo espasmo muscular e pelo hematoma (JARVINEN et al., 2005).

Após uma lesão, o músculo inicia o processo de reparo altamente organizado, de forma a prevenir a perda de massa muscular (GROUNDS et al., 2002).

4.4 REGENERAÇÃO MUSCULOESQUELÉTICA

Segundo Lieber (2002), o sistema musculoesquelético é um dos tecidos mais adaptáveis do corpo humano. O processo de regeneração é semelhante à miogênese, porém, as células que participam inicialmente são as células satélites, ao invés das progenitoras miogênicas. Semelhante a miogênese, as células precursoras mononucleadas musculares, conhecidas como células satélites, são ativadas, os mioblastos migram para o local da lesão, se diferenciam, se proliferam e fundem-se para formar os pequenos miotubos, que unem-se a outros miotubos, para formar maiores e estes diferenciam-se para constituir uma nova fibra ou reparar a lesada (HUARD et al., 2002).

O processo de regeneração da lesão muscular é dividida em 3 fases: a de destruição ou inflamatória, a proliferativa e a de remodelamento. A fase destrutiva é caracterizada pela ruptura da miofibrila e formação de hematoma. A fase reparativa consiste de inúmeros processos, como: fagocitose do tecido muscular lesado, regeneração do músculo estriado, produção de tecido conjuntivo e revascularização. A fase de remodelamento é o período de maturação das miofibrilas regeneradas, da reorganização do tecido e do reestabelecimento da capacidade funcional do músculo (FIGURA 1) (JARVINEN et al., 2005). Interações entre o sistema imunológico e musculoesquelético podem desempenhar um papel significativo na modulação do curso da contusão e seu subsequente reparo (SMITH et al., 2008).

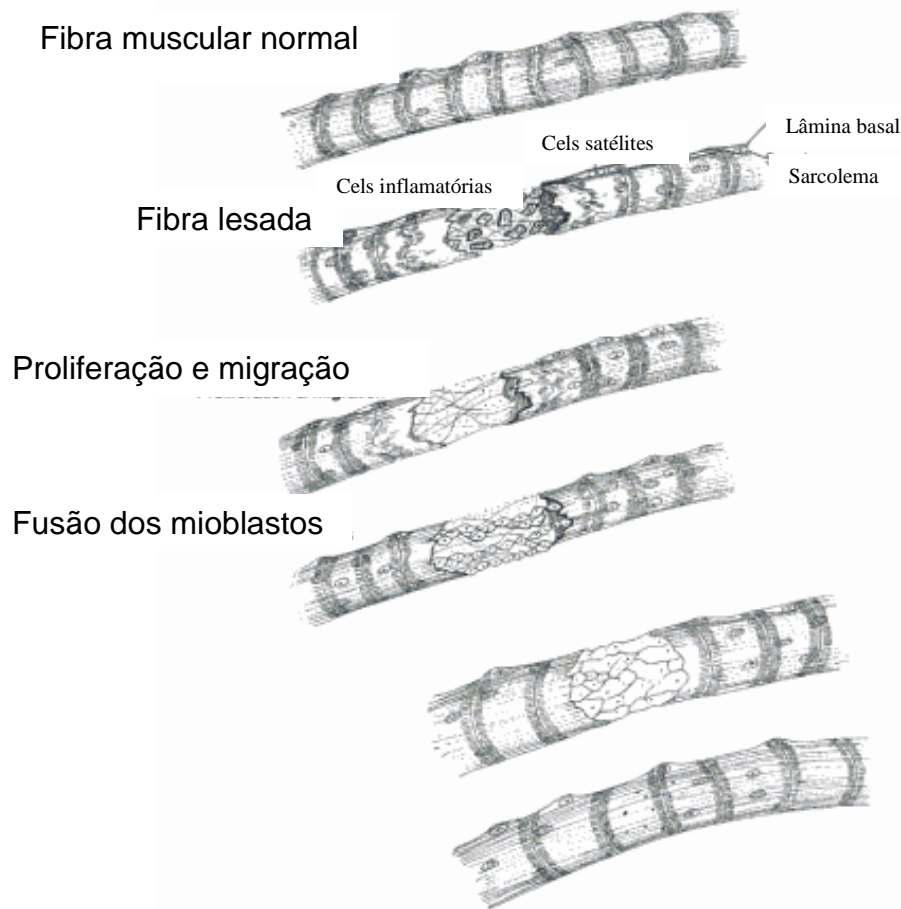


FIGURA 1- Representação esquemática do processo de regeneração muscular esquelética, adaptado de LIEBER (2002). Cels- células.

4.4.1 Fase inflamatória

A fase inflamatória inicia-se com a destruição de parte das células musculares e de pequenos vasos sanguíneos. É caracterizada pela formação de hematoma, necrose tissular, degeneração e resposta inflamatória. As células inflamatórias e citocinas têm acesso direto ao local da lesão. A magnitude do processo inflamatório depende de 2 fatores: da gravidade da lesão e do grau de vascularização do tecido no momento da lesão (SMITH et al., 2008). Esse processo é posteriormente amplificado pela ativação e migração de células satélites e por partes de fibras necrosadas, liberando várias substâncias que servem como agentes quimiotáteis do extravasamento de células inflamatórias (JARVINEN et al., 2005).

Vários modelos de lesão têm estabelecido pelo menos dois mecanismos de morte celular em miócitos danificados, chamados de necrose e apoptose. Apoptose, ou morte celular programada, é processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas

ou defeituosas (GRIVICICH et al., 2007). No 2º dia de lesão, as fibras necróticas são limitadas pela formação de uma "banda de demarcação", uma condensação de material citoesquelético, que delimita a parte necrosada das fibras a partir de partes não-necróticas, sendo os macrófagos responsáveis por este processo (SMITH et al., 2008).

Imediatamente após a lesão, acontece uma vasoconstrição primária. Após, ocorrerá vasodilatação e aumento da permeabilidade a fluido e proteínas, em decorrência da ação da histamina, da prostaglandina E2 (PGE2), da bradicinina e dos peróxidos de hidrogênio. A histamina é liberada a partir de mastócitos presentes na área danificada. Um segundo efeito desta liberação de histamina localizada, é o aumento da permeabilidade capilar no lado da lesão via alargamento dos poros capilares endoteliais. Outro mecanismo para a vasodilatação é guia do "fator de crescimento endotelial vascular- óxido nítrico sintase (VEGF-NO). O VEGF pode ser secretado por fibroblastos, células endoteliais e monócitos/macrófagos em resposta à hipóxia, estresse oxidativo, fatores de crescimento e citocinas, e ativa o óxido nítrico e trajeto do óxido nítrico sintase para facilitar a vasodilatação (SMITH et al., 2008). Este aumento da permeabilidade do sarcolema, leva ao aumento do influxo de cálcio para o meio intracelular e acarreta ativação de proteases dependentes de cálcio (ARMSTRONG, 1990). Também existem proteínas, as de choque térmico (*Heat Shock Proteins*-HSPs), que são chaperonas com a função protetora para poupar a degradação (GETHING, 1996).

As primeiras células a chegarem ao local da lesão são os neutrófilos, fazendo pico em 24 horas podendo durar até 5 dias, e em seguida os macrófagos (tipo ED1+ e ED2+), com a função de remover o tecido necrótico e liberar citocinas para modular a quimiotaxia (TIDBALL, 1995). Neutrófilos são células imunológicas que predominam no local do tecido lesado, possuem a função de fagocitose, limpeza do tecido necrótico, liberação de citocinas inflamatórias como a IL-6 (interleucina 6) e o TNF α (fator α de necrose tumoral) e ainda podem gerar radicais livres (SMITH et al., 2008). A IL-6 é uma citocina ubiquitina intercelular associada com o controle e coordenação da resposta imunológica, podendo estar envolvida na degradação protéica e lesão muscular (TOUMI et al., 2006). O TNF α tem papel na regeneração dos músculos, como a inibição de sua atividade durante o processo de cicatrização, resultando em ligeiro déficit na força do musculoesquelético regenerado (JARVINEN et al., 2005). Outros fatores de crescimento como FGF (fator de crescimento de

fibroblasto), IGF (fator de crescimento similar a insulina), TGF- β (fator de transformação do crescimento), HGF (fator de crescimento hepatócito), IL-1 (interleucina-1) são também expressados no músculo lesado (FIGURA 2) (JARVINEN et al., 2005). Esses fatores são potenciais ativadores das células precursoras miogênicas (células satélites) e importantes na fusão dos miofibrilos dentro das miofibrilas maduras multinucleadas, durante o processo de regeneração (JARVINEN et al., 2005).

Embora seja aceito que citocinas (fator de necrose tumoral, IL-1 e IL-6) sejam essenciais no processo inflamatório, seu exato papel ainda não está claro (SMITH et al., 2008). A diminuição do número de células dos neutrófilos ocorre em função do aumento dos macrófagos, sendo que estes fagocitam o material necrótico da fibra muscular, por meio de enzimas lisossômicas, num período de 48 horas após a lesão (JARVINEN et al., 2005; HWANG et al., 2006).

Além disso, os macrófagos liberam fatores que atraem fibroblastos para a área e que incrementam a deposição de colágeno. No 3º dia, células satélites entre a lâmina basal são ativadas nos miofibrilos. Assim, a depleção dos macrófagos tem consequência negativa no processo de cicatrização, incluindo regeneração reduzida das células musculares, diferenciação das células satélites e crescimento das fibras musculares (TOUMI et al., 2006).

As células satélites, que estão localizadas periféricamente entre o sarcolema e a lâmina basal, estão tipicamente quiescentes, mas na lesão da fibra muscular, elas iniciam rapidamente sua divisão e recolocação no tecido lesado (LIEBER, 2002). Há grande evidência que as células satélites representam a população de células tronco que podem diferenciar-se em células musculares ou outro tipo de células (LIEBER, 2002). A ativação das células satélites musculares durante crescimento e reparo, assemelha-se a fase embrionária de várias maneiras, incluindo a indução de fatores de regulação miogênica como a myoD e myf-5 (TOUMI et al., 2006).

As células satélites migram para a região da lesão e entram em ativação, proliferação e diferenciação em miofibrilos, que ao fundirem-se formam miofibrilos. Esses se fundem com a região terminal da célula muscular lesada que sobreviveu ao trauma inicial. Em miofibrila regenerada, os núcleos das células satélites novamente unidas, inicialmente são centralizados e migrarão posteriormente para

assumir a localização periférica (TOUMI et al., 2006). Nos humanos, a regeneração total requer 6 meses enquanto nos ratos, são 2 meses (LIEBER, 2002).

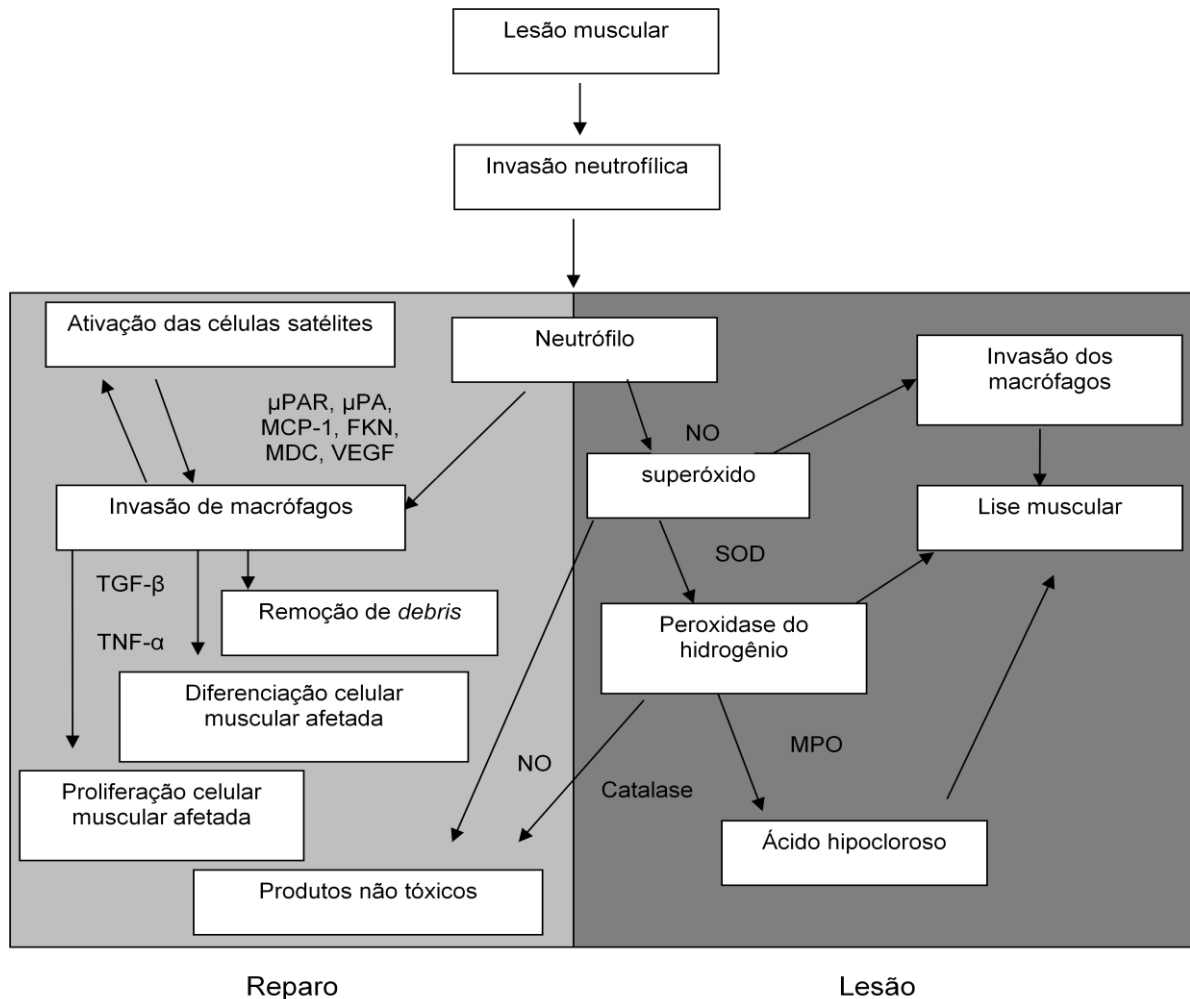


FIGURA 2 – Desenho esquemático da interação das células inflamatórias com o músculo lesado (adaptado de TIDBALL, 2005). NO- óxido nítrico; μ PAR- receptor de ativador de plasminogênio tipo uroquinase; μ PA- uroquinase; MCP-1- proteína 1 quimioatraente de monócito; FKN- fractalquina; MDC- quimiocina derivada de macrófagos; VEGF- fator de crescimento endotelial vascular; SOD- superóxido dismutase; NO- óxido nítrico; MPO- mieloperoxidase; TGF- fator de transformação do crescimento; TNF- fator de necrose tumoral.

Alguns componentes da matriz extracelular, como a laminina, a fibronectina e o colágeno desempenham importante papel na manutenção das células satélites no estado quiescente, na regulação da proliferação e na fusão delas (CHARGÉ; RUDNICK, 2004).

Os monócitos são importantes, pois se diferenciam em macrófagos, que são essenciais para o processo de reparo e podem realizar a função dos neutrófilos. Os

macrófagos contribuem para a regeneração pela inflamação e pelos fatores de crescimento. É sugerido que, além de seu papel na fagocitose, as células imunológicas como macrófagos e neutrófilos desempenham papel fundamental na mediação de reparação muscular, quer diretamente pela secreção de fatores de crescimento, ou indiretamente através do recrutamento de outros tipos de células (SMITH et al., 2008).

Os macrófagos possuem outras funções além da fagocitose. Seus subtipos ocorrem de acordo com a ocorrência nos diferentes tipos de tecidos: ED1+ (maioria dos monócitos e macrófagos), ED2+ (macrófagos residentes principalmente vistos nos tecidos) e ED3+ (macrófagos usualmente presentes no tecido linfóide). Sugere-se que os macrófagos podem alterar de um subtipo a outro dependendo do microambiente. Na lesão muscular, o ED2+ e ED3+ aparecem depois do ED1+ e não são considerados importantes no processo de fagocitose. O ED2+ é o maior contribuinte para formação de mioblastos e miotubos. Este subtipo serve como maior fonte de fatores de crescimento e citocinas que promovem cicatrização (SMITH et al., 2008).

Durante esta fase de fagocitose ou de digestão, muitos componentes celulares são afetados. Miofibrilas perdem sua regularidade e aparecem desorganizadas perto da linha -Z. Os filamentos de actina e miosina iniciam a perda de sua regularidade e podem entrelaçar-se com o processo citoplasmático do macrófago (LIEBER, 2002).

Verifica-se a importância da fase inflamatória para o processo de cicatrização e reparo muscular (SMITH et al., 2008). Os neutrófilos e macrófagos desempenham papel muito importante na fagocitose. As células satélites também são importantes na formação de novos miotubos (LIEBER, 2002). Após essa fase, ou concomitantemente, inicia-se a fase proliferativa (JARVINEN et al., 2007).

4.4.2 Fase proliferativa

A fase proliferativa inicia-se após 72 horas da lesão e é o período em que se forma o tecido de granulação e envolve a atividade de 3 tipos de células: macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Esta fase pode ser dividida em 3 partes: reepitelização, fibroplasia e angiogênese (MANDELBAUM et al., 2003).

A primeira fase do reparo é a proliferação envolvendo o tecido epitelial e conjuntivo. Faz-se a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais e os fatores de crescimento são responsáveis pelo aumento da mitose e hiperplasia do epitélio. No tecido conjuntivo ocorre a fibroplasia (aumento no número de fibroblastos) e formação da matriz que é importante para a formação do tecido de granulação. Essa depende do fibroblasto que além de sintetizar colágeno, produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases (MANDELBAUM et al., 2003). A segunda fase é a proliferação dos fibroblastos, que pode às vezes ser excessiva, resultando na formação de tecido cicatricial denso entre o músculo lesionado. Primeiramente, é produzido o colágeno mais fraco, o tipo III e depois o tipo I (KANNUS et al., 1992). Em alguns casos, usualmente associado com o maior trauma muscular ou particularmente com rupturas, a cicatriz pode criar barreira mecânica que consideravelmente atrasa ou mesmo completamente restringe a regeneração de miofibras através das lesões *gap* (JARVINEN et al., 2005).

A cicatriz de tecido conjuntivo no local da lesão é o ponto mais fraco da lesão precoce após o trauma, mas sua força de tensão aumenta consideravelmente com a produção de colágeno tipo I. A estabilidade mecânica do colágeno é atribuída à formação de ligações cruzadas intermoleculares durante a maturação do tecido. Aproximadamente 10 dias após o trauma, a maturação da cicatriz tem alcançado o ponto no qual é próximo do ponto mais fraco da lesão, e se a carga falha, a ruptura geralmente ocorre entre o tecido muscular adjacente ao novamente formado, as mini junções músculo-esqueléticas entre as miofibras regeneradas e o tecido cicatrizado (JARVINEN et al., 2005).

A última fase da proliferação é a angiogênese, o fluxo sangüíneo é gradualmente estabelecido e esse processo envolve o brotamento inicial de células endoteliais que crescem para dentro da área lesada, ramificando-se, eventualmente unindo-se aos brotos adjacentes, para formar circuitos capilares quando são canalizados (BALBINO et al., 2005). Inicialmente, são formados vasos imaturos e permeáveis que posteriormente amadurecem.

Neste processo, o papel da VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) é bem estabelecido (SMITH et al., 2008). Mioblastos esqueléticos que expressam VEGF estão associados com formação capilar após lesão isquêmica/reperfusão no tecido cardíaco em ratos (SMITH et al., 2008). A vascularização da área lesionada é

o primeiro sinal de regeneração e pré-requisito para subsequente recuperação morfológica e funcional na lesão. Os novos capilares brotam dos troncos sobreviventes dos vasos sanguíneos em direção ao centro da área lesionada, para prover à área um adequado suprimento de oxigênio, subseqüentemente capacitando metabolismo energético aeróbio para miofibras regeneradas. Novos miotubos tem poucas mitocôndrias e somente moderada capacidade de metabolismo aeróbio, mas tem claramente aumento no metabolismo anaeróbio. No entanto, durante os estágios finais de regeneração, metabolismo aeróbio constitui os principais trajetos energéticos para as miofibras multinucleadas (JARVINEN et al., 2005).

A fase de proliferação é caracterizada pela diferenciação e renovação dos tecidos. Os mioblastos se fundem para formar miotubos multinucleados que se fundem a miofibrilas danificadas. A fusão de mioblastos e posterior crescimento para constituir miofibrilas com núcleo centralizado resultam no restabelecimento da arquitetura muscular dentro de um período de duas a três semanas (HAWKE et al., 2001).

Formam-se novos vasos, prolifera-se tecido conjuntivo, epitelial e os fibroblastos (JARVINEN et al., 2005). Após essa fase inicia-se a de remodelação para o amadurecimento desses novos tecidos (JARVINEN et al., 2005).

4.4.3 Fase de remodelação

Na fase de remodelação, ocorrem reformulações dos colágenos (aumento no diâmetro das fibras de colágeno e na força tensora), melhoria nos componentes das fibras colágenas e reabsorção de água, que permite o aumento da força da cicatriz e diminuição da sua espessura (MANDELBAUM et al., 2003). O tecido de granulação torna-se mais fibroso e menos vascular até se tornar tecido fibroso denso (MANDELBAUM et al., 2003). As fibras colágenas reorientam-se ao longo das linhas de tensão aplicadas à lesão, resultando assim em maior resistência tênsil do tecido (BALBINO et al., 2005).

Jarvinen e Sovari (1975) reportaram que excessiva produção de tecido conjuntivo pode inibir a regeneração completa da fibra muscular, geralmente deixando a recuperação funcional incompleta. A redução da fibrose pode ser uma maneira para melhorar a cicatrização após a lesão. O fator β de transformação do crescimento (TGF β -1) está presente quando há o aparecimento de fibrose do lado

lesado, via ativação do miofibroblasto. A decorina, que é uma proteoglicana humana, é conhecida como fator antifibrótico e pode ser utilizada para melhorar a recuperação, porém, este é um método de tratamento não fisiológico, invasivo e caro (HWANG et al., 2006).

A última fase do processo de cicatrização e reparo é caracterizada pelo amadurecimento do tecido muscular, reorganização e reorientação das fibras colágenas e da completa regeneração tecidual (BALBINO et al., 2005).

O conhecimento sobre as fases do processo de cicatrização e reparo é crucial para a determinação do tratamento mais adequado para a lesão muscular.

4.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA CONTUSÃO MÚSCULO ESQUELÉTICA

O diagnóstico da contusão é realizado através de exame físico e clínico bem como por meio de exames complementares como tomografia computadorizada, ressonância magnética e ultrassonografia (LOPES et al., 1994). As imagens são capazes de identificar o músculo acometido, as dimensões da lesão (extensão, secção transversa), a localização (miotendínea, ventre muscular, inserção óssea) e presença ou não de hematoma (FERNANDES et al., 2011).

O diagnóstico clínico da lesão muscular inicia-se com a investigação detalhada sobre a história do trauma. A avaliação física deve ser iniciada entre 12 horas e 2 dias pós lesão e deve incluir a inspeção, a palpação, a amplitude de movimento, a força muscular, a avaliação postural e a análise da marcha (KERKHOFF et al., 2013). Na inspeção deve ser observada a presença de hematomas, edemas, cicatrizes, hiperemia e deformidades visíveis. Na palpação deve ser verificada a presença de dor, deformidade e aumento de temperatura (FERNANDES et al., 2011).

A ressonância magnética apresenta alta sensibilidade e especificidade e permite identificação das características anatômicas (dimensões da lesão, secção transversal/longitudinal, localização do hematoma). A presença do edema pode permanecer visível por seis a dez semanas. A ultrassonografia é o exame essencial para caracterizar as rupturas das fibras musculares e tem sido reconhecida como o melhor método para diagnosticar a contusão, no entanto, é examinador dependente (JARVINEN et al., 2007).

Exames complementares de sangue também podem auxiliar na prevenção e no diagnóstico da lesão muscular. A análise das concentrações dos níveis plasmáticos de CK (creatinofosfoquinase) é amplamente utilizada no meio desportivo para quantificação da reação inflamatória produzida pelo esforço físico (e/ou trauma direto) na musculatura estriada esquelética. Valores 3 vezes acima do basal sugerem alto risco de lesão muscular (MOUGIOS, 2007). A troponina I e o Aspartato Aminotransferase podem também servir como indicadores de lesão, porém são menos utilizados que a CK (NOAKES, 1987). Além disso, a fadiga metabólica decorrente do acúmulo de ácido láctico pode gerar gestos esportivos compensatórios e resultar em lesões musculares. Desta forma, a sua avaliação associada à do cortisol basal podem contribuir para o diagnóstico precoce de excesso de treinamento e definir estratégias de recuperação metabólica (LOMAX; MACCONNEL, 2003).

Em relação ao tratamento, diferentes técnicas de intervenção fisioterapêutica são utilizadas para acelerar o processo de reparo muscular e o restabelecimento da função, tais como: crioterapia (PRICE) (SCHASER et al., 2007); o UST terapêutico (PIEIDADE et al., 2008; SHU et al., 2012); L.A.S.E.R. (FALCAI et al., 2010); plasma rico em plaquetas (RETTIG et al., 2013); a mobilização precoce e exercícios (JARVINEN et al., 2005; 2007).

Imediatamente após a lesão é recomendada a utilização do PRICE (proteção, gelo, elevação e repouso) ou o P.O.L.I.C.E. (proteção, carga ideal, elevação e gelo) (BLEAKLEY et al., 2012) até o 7º dia. O objetivo é minimizar a dor, a inflamação, o edema e oferecer melhores condições para o processo de cicatrização e reparo (KANNUS et al., 2000; SCHASER et al., 2007).

Após 3-5 dias podem ser realizados exercícios isométricos, mobilizações ativas e passivas (JARVINEN et al., 2005; LOPES et al., 1994). A mobilização precoce é a primeira recomendação para o trauma muscular após 3-5 dias da lesão e pode ser realizada primeiramente por exercícios isométricos, seguido de exercícios isotônicos e finalmente treinamento isocinético (JARVINEN et al., 2005). A progressão dos exercícios deve ter como parâmetro o limite da dor, isto é, deve-se progredir desde que o indivíduo consiga realizar a máxima contração sem dor (JARVINEN et al., 2005).

Jarvinen et al. (2005) relataram que a mobilização induz o crescimento mais rápido e intenso dos capilares nas bordas celulares da lesão, particularmente nos

primeiros estágios da cicatrização. Após o período de imobilização ou repouso (24 horas), os exercícios ativos isométricos devem ser realizados gradualmente, tendo como limite o quadro algico. Podem ser realizados exercícios de alongamento de 10 a 15s com intervalo de 1 minuto. Porém, segundo Smith et al. (2008) não está claro qual volume ou intensidade do exercício pode exacerbar a fase destrutiva, atrasar ou promover a fase de reparo ou incrementar a fase de remodelação. Ainda, em revisão sistemática recente também foi concluído que existem poucas evidências para a prescrição de alongamento e exercícios de baixa intensidade para o tratamento da lesão muscular (TORRES et al., 2012).

Quanto a terapêutica com o ultrassom, Jarvinen et al. (2005) concluíram que apesar de recomendado para tratamento, seu nível de evidência quanto a eficácia é baixo. Em trabalho experimental, Wilkin et al (2004) avaliaram os efeitos do UST para o tratamento de lesões agudas de gastrocnêmio de ratos, perante as medidas de desfecho: área de secção transversal do músculo; massa muscular; concentração total de proteínas. Os resultados encontrados, quando comparados ao grupo controle, revelaram que a administração do UST não trouxe maiores benefícios para a regeneração do músculo lesionado.

As revisões sistemáticas também apontam evidências científicas reduzidas sobre os tratamentos recomendados para a lesão muscular esquelética, o que justifica investigações com estudos experimentais com ratos bem como ensaios clínicos randomizados (REURINK et al., 2012; MASON et al., 2007 e TORRES et al., 2012).

4.6 CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO

O UST é a modalidade terapêutica de aquecimento profundo e é definido como formas de onda acústica de frequência superior às que podem ser detectadas pelo ouvido humano, ou seja, aquelas cujas frequências são superiores a 20 kHz. É produzido pela conversão da energia elétrica em energia mecânica pelo cristal piezoelétrico, presente no transdutor (cabeçote), que se expande e contrai quando a corrente elétrica passa sobre ele (HAAR, 2007).

Segundo o estudo de Vieira et al. (2012), o UST é considerado importante recurso para a prática clínica para os Fisioterapeutas, sendo utilizado em 75% dos tratamentos. Porém, nesse mesmo estudo, foi constatado nível muito baixo de

conhecimento dos parâmetros do UST e seus efeitos biológicos pelos profissionais que o utilizam.

Os princípios físicos do UST são baseados na natureza das ondas sonoras, frequência, modo de transmissão e intensidade (MICHLOVITZ, 2012).

As ondas sonoras são de origem mecânica e em virtude disto precisam de um meio para se propagar. Têm a propriedade de reflexão, refração, absorção e penetração. São de natureza longitudinal, ou seja, a direção de propagação é paralela à onda, sendo essa onda transportada em meios líquidos não-viscosos (MARTINEZ et al., 2000).

A frequência é definida como o número de oscilações por segundo, é expressa em Hz e determina a profundidade de penetração em razão inversa, na qual, quanto maior a frequência menor a profundidade de penetração e vice-versa. As frequências utilizadas terapêuticamente são de 1 MHz (atinge tecidos até 5 cm de profundidade) e 3 MHz (até 1 cm de profundidade) (LOW; REED, 2001). Cada frequência determina atenuações diferentes nos tecidos. A atenuação refere-se à propriedade que a onda ultrassônica possui de perder 50% da sua energia quando ultrapassa certa profundidade de tecido. Hoogland (1986) descreveu as espessuras necessária em cada tipo de tecido para a perda de 50% da energia ultra-sônica, nas frequências de 1 e 3 MHz, a qual é utilizada para determinar a intensidade ideal para tratamento (QUADRO 2).

O modo de transmissão pode ser contínuo ou pulsado. No modo contínuo a energia é liberada 100% do tempo, sendo responsável pelos efeitos térmicos. No pulsado, a energia é transmitida em pulsos, sendo responsável pela redução dos efeitos térmicos e pela produção dos efeitos não-térmicos. A frequência de pulsação dos aparelhos situa-se entre 16, 48 e 100 Hz e a porcentagem de pulsação de 5, 10, 20 e 50%. A produção de calor é diretamente proporcional a porcentagem de pulsação (BAKER et al., 2001).

4.6.1 Efeitos biofísicos do ultrassom

Os efeitos biofísicos decorrentes da aplicação do UST podem ser divididos em duas classes: térmicos e não-térmicos (mecânicos). Essas duas classes não ocorrem separadamente, porém, são maximizadas ou minimizadas de acordo com a forma de geração: contínua ou pulsada (STARKEY, 2001).

QUADRO 2- Espessuras necessárias para cada tecido para reduzir 50% da energia ultrassônica (HOOGLAND, 1986)

1 MHz		Tecido	3 MHz
Espessuras	11,1 mm	Pele	4 mm
	50 mm	Gordura	16,5 mm
	9 mm	Músculo	3 mm
	6,2 mm	Tendão	2 mm
	6,0 mm	Cartilagem	2 mm
	2,1 mm	Osso	—

Os efeitos térmicos acontecem principalmente na aplicação do UST contínuo. O UST pode elevar a temperatura tecidual em profundidades de 5 cm ou mais. Para alcançar os efeitos térmicos, a temperatura tecidual deve aumentar de 1 a 4° C, mantendo-a entre 40-45° C por pelo menos 5 min (DYSON, 1987). Draper et al. (1993) demonstraram um aumento de aproximadamente 5° C de temperatura no músculo gastrocnêmio de humano após aplicação do ultrassom contínuo 1,5 W/cm² durante 10 min.

O aquecimento é determinado de acordo com a frequência, intensidade, duração de tratamento e ângulo de aplicação (STARKEY, 2001). Também é determinado pela atenuação nos tecidos, que varia diretamente com a quantidade de proteína, ou seja, tecido com alto conteúdo protéico como ossos, cartilagem, músculos e tendões, descritos em ordem decrescente, absorvem mais o UST e, portanto, atenuam mais a onda ultrassônica (LOW; REED, 2001). O UST é rapidamente absorvido pelo perióstio que se torna significativamente quente. Como resultado, estruturas adjacentes ao osso ganham calor no tratamento ultrassônico por condução e pelo fluxo sanguíneo local (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990).

O meio de contato entre o cabeçote e a pele também influencia na quantidade de aquecimento no tecido (PAULA, 1994). Estudo realizado por Draper et al. (1993) comparando a técnica de contato com gel e a técnica subaquática revelou que a primeira aumentou quase quatro vezes mais a temperatura comparada com a outra técnica e que o gel é o melhor meio de contato para tratar tecidos de 3 cm de profundidade.

Em consequência aos efeitos térmicos, o UST diminui a percepção dolorosa (MUFTIC; MILADINOVIC, 2013), aumenta a taxa metabólica, aumenta o fluxo

sangüíneo (DRAPER et al. 1995), aumenta a extensibilidade dos tecidos ricos em colágeno (REED; ASHIKAGA, 1997), altera a atividade contrátil do musculoesquelético (KARNES; BURTON, 2002) e altera a velocidade de condução nervosa sensorial e motora (HAYLE et al.,1981)

Muftic e Miladinovic (2013) avaliaram os efeitos do UST na dor de pacientes com desordens musculoesqueléticas. Foram incluídos no estudo 68 pacientes com dor crônica localizada na coluna e nas grandes articulações dos membros superiores e inferiores. Os pacientes receberam 10 aplicações de UST no local da dor de 1 MHz, contínuo, sendo que em um grupo foi aplicada a intensidade de 0,4 W/cm² por 8 min e no outro grupo 0,8 W/cm² por 4 min. A dor foi avaliada pela escala visual analógica e foi encontrada diminuição dolorosa em ambos os grupos porém sem diferença significativa entre eles. Esses autores justificam o efeito analgésico pelos efeitos térmicos do ultrassom, ou seja, aumento da atividade metabólica dos tecidos, aumento da circulação e conseqüentemente relaxamento das estruturas rígidas dos tecidos moles.

Em relação ao aumento da taxa metabólica e fluxo sanguíneo, Draper et al (1993) em estudo no músculo de humanos, verificaram que após 10 min de UST contínuo com intensidade de 1,5 W/cm², a temperatura do gastrocnêmio, medida por microagulha hipodérmica conectada a um medidor termopar, aumentou 5° C a 3 cm de profundidade. Fabrizio et al. (1996) constataram que as intensidades de 1 W/cm² e 1,5 W/cm² na frequência de 1 MHz, no modo contínuo aumentaram significativamente o fluxo sanguíneo no músculo tríceps sural de humanos em relação a outras intensidades sob frequência de 3 MHz. Em contrapartida, Robinson e Buono (1995) utilizaram o UST no modo contínuo, 1 MHz e 1,5 W/cm² durante 5 min e não encontraram aumento do fluxo sanguíneo do antebraço em humanos.

Para a verificação do aumento da extensibilidade foi realizado estudo no qual aplicaram o UST de 1 MHz, 1,5 W/cm² durante 8 min, nos ligamentos colaterais mediais e laterais do joelho em humanos (REED; ASHIKAGA, 1997). Foi observada melhor extensibilidade nesses ligamentos quando comparados aos indivíduos não tratados.

Em relação à alteração da atividade contrátil, Karnes e Burton (2002), encontraram melhora significativa da força muscular após lesão muscular (provocada por contrações excêntricas) do músculo extensor longo dos dedos de ratos após a estimulação com UST (1 MHz, contínuo, subaquático, 0,5 W/cm²).

Hayle et al. (1981) verificaram os efeitos do UST na velocidade de condução do nervo braquial em humanos. O UST foi aplicado em 10 sujeitos na frequência de 1 MHz, 1 W/cm² durante 5 a 20 min até atingir um aumento de temperatura de 1,2° C. Foi encontrada diminuição da latência da condução nervosa em decorrência dos efeitos térmicos do ultrassom.

Os efeitos mecânicos causados pelas ondas ultrassônicas produzem alterações mecânicas, químicas e o fenômeno da cavitação (HAAR, 2007). Essas ondas fazem com que as moléculas situadas no caminho do feixe oscilem de maneira cíclica diretamente proporcional a intensidade de saída do transdutor. Essa oscilação molecular vai permitir o movimento das partículas de um lado para outro da membrana, causando aumento da permeabilidade e das taxas de difusão através da membrana celular. Consequentemente haverá facilidade na passagem de cálcio, potássio, sódio e de outros íons e metabólitos para dentro e fora da célula, pelo aumento da permeabilidade da membrana (STARKEY, 2001).

A cavitação é o efeito vibracional nas bolhas de líquidos provocado pelo feixe ultrassônico, que é causada pela compressão e expansão da onda durante os picos de alta e baixa pressão, respectivamente (HAAR, 2007). Durante a aplicação do UST, pode haver ocorrência de cavitação instável ou estável. A cavitação instável pode provocar colapso celular. Se existirem picos de alta pressão quando for aplicada a alta intensidade, pode causar danos aos tecidos e induzir a produção de radicais livres. A cavitação estável é benéfica, produzindo fluxo unidirecional de fluidos tissulares, como nas membranas celulares, causando efeitos fisiológicos importantes: síntese de colágeno, secreção de agente quimiotáxicos (mastócitos), maior síntese de proteínas (fibroblastos), aumento da captação de cálcio nos fibroblastos, mudanças na motilidade celular (células endoteliais) e alívio da dor (STARKEY, 2001).

Segundo Behrens e Michlovitz (2006), as intensidades baixas no modo pulsado favorecem a cicatrização dos tecidos epiteliais, conjuntivo e ósseo. As mesmas autoras relataram que as intensidades de 0,1 a 0,5 W/cm², pulsado 20%, beneficiam a cicatrização e que intensidades maiores que 0,8 W/cm² retardam a cicatrização.

4.6.2 Interação do ultrassom com o tecido

Tem sido descrito que o UST acelera a fase de cicatrização tissular, atuando na fase inflamatória, proliferativa e de remodelagem (MAXWELL, 1992).

Na fase inflamatória, o UST estimula a liberação de substâncias como a histamina pela degranulação dos mastócitos, importantes para o reparo tissular. A degranulação dos mastócitos pode ser iniciada por um aumento no transporte de Ca^{+2} através da membrana, induzida pela perturbação da membrana pelo UST (DYSON, 1987). Segundo Young e Dyson (1990), a frequência de 0,75 MHz é a mais efetiva para a liberação destas substâncias nesta fase. Portanto, uma das ações do UST é a pró-inflamatória.

O estudo de FYFE e CHAHL (1980), no qual foi induzido edema no tecido abdominal de ratos com injeção subcutânea de nitrato de prata e tratado com UST pulsado (0,75 MHz, 0,5 W/cm^2 , 20 ou 50%, 2 a 4 min), verificou menor extravasamento do líquido plasmático, medido pela quantidade de infiltração de corante, expressa em absorbância.

Na fase proliferativa, geralmente três dias após a lesão, o UST estimula a ação dos macrófagos, células que liberam fator que estimula a proliferação dos fibroblastos e o aumento das células endoteliais, em resposta a níveis terapêuticos de UST (0,5 W/cm^2) (YOUNG, 1998). Os fibroblastos são os produtores principais de tecido conjuntivo e são responsáveis pela contração da ferida. Estes, quando expostos à terapia ultrassônica, estimulam a síntese de colágeno, proteína fibrosa que proporciona ao tecido conjuntivo mais força de tensão. No modo contínuo, foi registrado aumento de 20% na secreção do colágeno, enquanto que no modo pulsado houve aumento de 30% (YOUNG, 1998).

Byl et al. (1993) compararam a utilização de alta intensidade de UST (1,5 W/cm^2 , modo pulsado 20%, 1 MHz, 5 min) com baixa intensidade (0,5 W/cm^2 , modo pulsado, 20%, 1 MHz, 5 min na deposição de colágeno em incisões induzidas em porquinhos da índia e revelaram que a baixa intensidade facilita a deposição de colágeno e a força de tração da ferida, quando o tratamento é continuado por duas semanas ou mais. Contudo, tanto a baixa (0,5 W/cm^2) quanto a alta intensidade (1,5 W/cm^2) utilizadas nas primeiras semanas aumentam a contração da ferida.

O estudo de Enwemeka et al. (1990) verificaram que o UST de 1 MHz, 0,5 W/cm^2 , 5 min por 10 dias, aumentou significativamente a força de tensão e a

capacidade de absorção de energia do tendão lesado de Aquiles em coelhos, concluindo que o UST acelera o processo de reparação. No estudo de Da Cunha et al. (2001), após compararem os efeitos do UST contínuo e pulsado após tenotomia do tendão de Aquiles em ratos, verificaram que o modo pulsado resultou em melhor organização e agregação das fibras de colágeno. Em contrapartida, Roberts et al. (1983) concluíram que o modo pulsado impediu a cicatrização da tenotomia de Aquiles em coelhos. No estudo de Larsen et al. (2005) utilizaram várias intensidades do UST pulsado, 3 MHz, no tendão de Aquiles de coelhos e verificaram que não houve nenhuma melhora da cicatrização no local da ruptura, mas por outro lado, observaram diminuição da rigidez articular, melhora da carga de ruptura e extensibilidade mensurada através de um dispositivo mecânico.

Na fase de remodelação que pode durar de meses até anos o arranjo e tipo de colágeno é mudado (KITCHEN; BAZIN, 1998). Algumas fibras são removidas de suas localidades e depositadas em outras e as fibras de colágeno do tipo III são substituídas pelo tipo I em resposta às interpretações dos fibroblastos ao estresse mecânico provocado no tecido (DYSON, 1987). O efeito do UST vai depender da fase em que foi iniciado o tratamento, pois quanto mais precoce a aplicação, melhor os seus efeitos (KITCHEN; BAZIN, 1998). Como visto, o UST estimula a remodelação e reorientação do colágeno ao longo das linhas de tensão (MAXWELL, 1992).

Porém, apesar de todos os efeitos citados acima, Gam e Johannsen (1995) realizaram meta-análise de 293 artigos publicados desde 1950 sobre os efeitos do UST nas desordens musculoesqueléticas e observaram pouca evidência científica na sua utilização. Robertson et al. (2001) avaliaram 35 artigos sobre a aplicação do UST em patologias diversas no período de 1975 a 1999 e verificaram que somente 10 artigos continham as metodologias adequadas para validar a eficiência do ultrassom. No entanto, só foi encontrado benefício do UST em 2 artigos, um para síndrome do túnel do carpo (EBENBICHLER et al., 1998) e outro para tendinite calcificante do ombro (EBENBICHLER et al., 1999). No artigo para síndrome do túnel do carpo foi verificada melhora na condução nervosa, na dor e na funcionalidade física e no artigo para tendinite calcificante do ombro foi verificada melhora do quadro algico.

Em 2007, Wong e colaboradores realizaram pesquisa com 213 Fisioterapeutas da área ortopédica sobre a utilização do UST e sua importância na

prática clínica. Em relação as indicações clínicas, 83,6% utilizam para diminuir as inflamações (tendinite, bursite), 70,9% para aumentar a extensibilidade os tecidos, 52,5 % para incrementar o processo de cicatrização, 49,3% para diminuir a dor, 35,15% para diminuir o edema. Também foi questionado sobre os parâmetros utilizados para tratamento e encontrou-se uma diversidade de informações que estão demonstradas no QUADRO 3. Verifica-se a falta de consenso sobre os parâmetros ideais para tratamento, sendo importante a realização de pesquisas para tal.

4.6.3 Ultrassom e contusão muscular

Diversos estudos já foram realizados com o objetivo de avaliar a eficácia do UST nas contusões musculares, porém, ainda não há consenso (MARKET et al., 2005; WILKIN et al., 2004; BASSOLI et al., 2001; PIEDADE et al., 2008; REURINK et al., 2012; MASON et al.; 2012). A maioria deles utilizou o UST pulsado de baixa intensidade, pois esta é a indicação da literatura para o tratamento imediato neste tipo de lesão. O QUADRO 4 demonstra os níveis de evidência da aplicação do UST nas diferentes fases do processo de cicatrização e reparo (MICHLOVITZ et al., 2012).

Reher et al (1999) afirmaram que o UST pode promover a produção de interleucinas 8, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual promove a angiogênese e contribui para o reparo muscular.

No estudo de Market et al. (2005) utilizaram o UST de 3 MHz no modo contínuo, com intensidade de $0,1 \text{ W/cm}^2$, associado ou não a caminhadas, para avaliar o processo de regeneração do músculo gastrocnêmio em ratos. Foram investigados a massa muscular, a concentração de proteínas contráteis, a área de secção transversa das fibras musculares (ASTFM), o número de núcleo por fibra e a densidade mionuclear e não foram encontrados resultados estatisticamente significativos. Wilkin et al. (2004) utilizaram o UST pulsado 20% de 3 MHz, intensidade de 1 W/cm^2 também no músculo gastrocnêmio lesado de ratos. Foram avaliados os mesmos parâmetros do estudo anterior e também não encontraram diferenças estatisticamente significativas.

QUADRO 3- Resposta dos Fisioterapeutas sobre os parâmetros utilizados para tratamento (Adaptado de WONG et al., 2007)

Parâmetro	Dor	Inflamação	Extensibilidade	Cicatrização	Edema
Frequência: tecidos superficiais					
1 MHz	14.0% (17)	10.1% (15)	15.8% (23)	13.5% (14)	11.1% (9)
3 MHz	86.0% (104)	89.9% (133)	84.2% (123)	86.5% (90)	88.9% (72)
Frequência: tecidos profundos					
1 MHz	95.0% (113)	94.0% (140)	93.9% (139)	95.2% (99)	93.9% (77)
3 MHz	5.0% (6)	6.0% (9)	6.1% (9)	4.8% (5)	6.1% (5)
Intensidade: tecidos superficiais					
<1 W/cm ²	9.8 % (12)	22.3% (23)	26.9% (32)	18.8% (18)	35.8% (24)
1-2 W/cm ²	71.8% (74)	66.4% (79)	83.7% (103)	75.0% (72)	59.7% (40)
>2 W/cm ²	5.8% (6)	6.7% (8)	6.5% (8)	6.3% (6)	4.5% (3)
Intensidade: tecidos profundos					
<1 W/cm ²	4.0% (4)	9.8% (12)	7.2% (9)	6.2%(6)	16.9% (11)
1-2 W/cm ²	88.0% (88)	82.8% (101)	82.4% (103)	87.6% (85)	80.0% (52)
>2 W/cm ²	8.0% (8)	7.4% (9)	10.4% (13)	6.2% (6)	3.1% (2)
Modo de operação					
Pulsado 20%	7.9% (11)	26.5% (44)	1.2% (2)	16.8% (21)	37.5% (36)
Pulsado 50%	17.1% (24)	44.0% (73)	5.3% (9)	30.4% (38)	44.8% (43)
Contínuo	75.0% (105)	29.5% (49)	93.6% (160)	52.8% (66)	17.7% (17)

QUADRO 4- Uso do ultrassom e seu nível de evidência durante as fases do processo de cicatrização e reparo (MICHLOVITZ et al., 2012).

FASE	EFEITO	NÍVEL DE EVIDÊNCIA
Inflamatória	Libera fatores de crescimento in vitro e em modelos animais	5
	Angiogênese promovida pelo UST pulsado- modelo animal	5
Proliferativa	Angiogenêse promovida pelo UST pulsado- modelo animal	5
	Fibroplasia promovida pelo UST pulsado- modelo animal	5
Remodelamento	Elevação de temperatura pelo UST contínuo	Pouca evidência

No entanto, Bassoli et al. (2001), utilizando a frequência de 1,5 MHz, pulsado 100 Hz, intensidade de 0,016 W/cm² encontraram neovascularização da área, aumento de miofibroblasto, mitose das células satélites e aceleração da regeneração no músculo glúteo máximo de rato lesionado por contusão. Corroborando com esse estudo, Piedade e colaboradores (2008) avaliaram a aplicação do UST pulsado no músculo gastrocnêmio lacerado de ratos e observaram aumento significativo na quantidade de miotubos na zona de regeneração, aos 14 dias, no grupo tratado com UST. Nesse mesmo trabalho observaram o aparecimento precoce de fibras de colágeno tipo I aos 4 dias após a lesão, com melhor arranjo estrutural e alinhamento dos miotubos em formação, no grupo tratado com UST.

Em um artigo de revisão publicado em 2011, Fernandes et al. relataram que há poucas evidências na utilização do UST em contusão. Assim, estudos que investiguem os efeitos do UST bem como a associação com o exercício, são importantes para evidenciar a prática clínica.

4.7 ALONGAMENTO

Os exercícios de alongamento muscular estão entre os mais comumente utilizados na reabilitação e na prática esportiva. São técnicas utilizadas para

aumentar a extensibilidade musculotendínea e do tecido conjuntivo muscular e periarticular, contribuindo para aumentar a flexibilidade, amplitude de movimento e comprimento músculo tendíneo (HERBERT; GABRIEL, 2002; GAJDOSIK, 2001; FELAND et al., 2001).

Existem basicamente três técnicas de alongamento: balístico, estático e facilitação neuromuscular proprioceptiva (FNP) (ZAKAS et al., 2005; NELSON; BANDY, 2004). Além dessas, outras podem ser adicionadas como: alongamento passivo (o indivíduo não contribui para gerar a força de alongamento); ativo-passivo (o alongamento é completado por uma força externa); ativo-assistido (é completado pela contração ativa inicial do grupo de músculos agonistas); ativo (realizado pelo próprio indivíduo) (ALTER, 2004).

O alongamento balístico está associado com movimentos de balançar, saltar, ricochetear e movimentos rítmicos (ALTER, 2004). No método estático, o membro é mantido em posição estacionária em seu maior comprimento possível por um período de 15 a 60s (ZAKAS et al., 2005; FELAND, 2001, BANDY; IRON, 1997). A FNP é definida como um “método de promover ou acelerar o mecanismo neuromuscular pela estimulação dos proprioceptores” (KNOTT; VOSS, 1968). Utilizam a resposta fisiológica de inibição recíproca na qual a contração isométrica de um músculo é seguida de relaxamento e inibição de seu antagonista, com o objetivo de estimular os mecanismos neurais de contração e relaxamento (MATTES, 1996). Também pode envolver uma contração isométrica de um músculo alongado, seguido de um alongamento maior, ativa ou passivamente (BANDY; IRON, 1997), com padrões de movimento em espiral e diagonal (SURBURG; SCHRADER, 1997).

Entre as técnicas de alongamento pela FNP, citadas por Surburg e Schrader (1997) estão: Contrair-Relaxar (CR), Manter-Relaxar (MR), Contrair-Relaxar-Contrair (CRC), e Manter-Relaxar- Contrair (MRC). Assim, o alongamento pela FNP tornou-se uma modalidade comumente utilizada para induzir relaxamento muscular e assim superar a resistência ao movimento e posteriormente aumentar a ADM da articulação (FERBER et al., 2002; COELHO, 2007). Porém, segundo Feland et al. (2001), o alongamento estático é o mais utilizado, pois é mais simples e confortável, para idosos.

No estudo de Bandy e Iron (1997), realizado em humanos, verificou-se que o tempo de manutenção de 30s foi eficaz para aumentar a flexibilidade dos músculos isquiotibiais de adultos jovens. Os mesmos autores, posteriormente, analisaram a

quantidade de repetições que deveria ser realizado o exercício por dia e não encontraram diferenças entre os grupos que realizaram 3 vezes ao dia e o que realizou somente uma vez. Zito et al. (1997) verificaram que o alongamento passivo mantido durante 15s não aumentou a ADM do tornozelo. Roberts e Wilson (1999) compararam o alongamento mantido 5s, repetido 9 vezes e mantido 15s, por 3 vezes, ambos realizados 3 vezes por semana durante 5 semanas, em universitários praticantes de atividade física, concluindo que o segundo grupo foi mais eficaz no aumento da ADM passiva e ativa de flexão de quadril e flexão e extensão de joelho.

Sobre o número de repetições para realização do alongamento, Taylor et al. (1990) relataram em estudo experimental com coelhos, que são necessárias no mínimo 4 repetições para alterar a extensibilidade da unidade músculo tendão.

O estímulo de alongamento é transmitido para o meio intracelular por mecanismo denominado mecanotransdução (DEYNE, 2001). Este mecanismo inclui uma cascata de reações que transmite o estímulo desde a matriz extracelular (endomísio), passando pelo sarcolema, atingindo as proteínas do costâmero, sendo transmitido até a linha Z e o núcleo da célula, ativando a expressão gênica e síntese proteica, desencadeando o processo de miofibrilogênese (DEYNE, 2001; PEVIANI et al., 2007; SANGER et al., 2002). Microscopicamente, podem ser observadas mudanças morfofuncionais provocadas pelo alongamento na célula, tais como: adição de sarcômeros em série (WHATMAN et al., 2006; COUTINHO et al., 2004); aumento na ASTFM (COUTINHO et al., 2004); reorganização molecular das fibras colágenas (COUTINHO et al., 2006); redução do processo de fibrose e melhora na regeneração muscular (HWANG et al., 2006).

Dessa forma, músculos encurtados e lesados podem adaptar-se após o treinamento com exercícios de alongamento, associado ou não a recursos térmicos (KNIGHT et al., 2001; HWANG et al., 2006).

A resistência do comprimento passivo do músculo é influenciada pela soma das proteínas contráteis, não contráteis e tecido conjuntivo, que se adaptam às cargas impostas pelas demandas do alongamento (WEPLER; MAGNUSSON, 2010). Várias teorias explicam o aumento da extensibilidade após o alongamento, dentre elas: deformação viscoelástica e plástica, aumento dos sarcômeros em série e relaxamento muscular (WEPLER; MAGNUSSON, 2010). As deformações plásticas e elásticas podem ocorrer no tecido conjuntivo quando submetido ao alongamento (Gajdosik, 2001), sendo que alterações plásticas modificam a estrutura

do músculo e são mais duradouras (WILLY et al., 2001) e as elásticas retornam a forma original após alguns minutos (TAYLOR et al., 1990; RYAN et al., 2008). Em relação aos sarcômeros em série, estudos animais demonstraram aumento no número dos sarcômeros, quando o músculo era imobilizado em posição de alongamento (TABARY et al., 1972, GOLDSPINK et al., 1974, WILLIAMS; GOLDSPINK, 1978). Sobre a teoria do relaxamento neuromuscular, acredita-se que o músculo possui um “reflexo de alongamento” que pode limitar a extensibilidade, sendo indicada a realização do alongamento estático vagarosamente para ocorrer a adaptação do reflexo e causar o relaxamento da musculatura (CHAN et al., 2001, BANDY; IRON, 1997).

Os efeitos do alongamento podem ser divididos em agudo e crônico. Definem-se por efeitos agudos aqueles analisados e avaliados imediatamente após a realização do alongamento (KOKKONEN et al., 1998, NELSON et al., 2005; KOKKONEN et al., 2007, BARANDA; AYALA, 2010), e por efeitos crônicos quando investigados e avaliados após prática regular (semanas ou meses), compondo um treinamento com exercícios de alongamento (KOKKONEN et al., 2007, BARANDA; AYALA, 2010).

Os efeitos a curto prazo são gerados pelo alongamento de segundos e minutos e envolvem alterações no tecido muscular e conjuntivo (BLACK et al., 2006), alterando o comprimento musculotendíneo e dos sarcômeros (TAYLOR et al., 1990; GORDON et al., 1966). Os efeitos imediatos causados pelo alongamento de até 60s alteram as propriedades viscoelásticas do músculo e causam redução da resistência ao alongamento (KUBO et al., 2002). Outros estudos (MAGNUSSON et al., 1995 e 1996; McHUGH; NESSE, 2008) demonstraram que o alongamento com duração de 90s repetidos 4 ou 5 vezes diminui a resistência passiva ao alongamento, sendo esse efeito mais prolongado do que os alongamentos realizados por 30s com 4 repetições ou 45s com 2 repetições (RYAN et al., 2008). Esses autores concluíram que o tempo mínimo de duração total do alongamento para promover efeitos prolongados são 4 min. Os efeitos a longo prazo (várias semanas) são, principalmente, a hipertrofia induzida, a qual parece aumentar a força tecidual (KUBO et al., 2002).

Em estudos animais verificou-se aumento da ASTFM (SECCHI et al., 2008) e do número de sarcômeros em série (SALVINI et al., 2006; SECCHI et al., 2008) e redução da atrofia muscular (GOMES et al., 2004; COUTINHO et al., 2004) após

alongamento passivo estático. Coutinho et al. (2004) aplicaram protocolo de alongamento muscular estático em ratos (40 min, 3 vezes por semana) onde verificaram aumento tanto no número de sarcômeros em série como na ASTFM. Secchi et al. (2008) também encontraram aumento na ASTFM quando foi realizado alongamento em ratos apenas 2 vezes por semana (sessões de 40 min).

O estudo de Bertolini et al. (2009) verificou os efeitos do alongamento passivo de 3 séries de 30s, 3 vezes por semana, durante 3 semanas, no músculo sóleo de ratos, com uso prévio do UST (1 MHz, contínuo, 5 min com intensidade variada de 0,2, 0,5 e 1,0 W/cm²). As variáveis analisadas foram comprimento muscular, número e comprimento de sarcômeros, sendo que foi encontrado aumento significativo somente no comprimento muscular.

Polizello et al. (2009) avaliaram as propriedades de carga e alongamento nos limites máximos e proporcionais, rigidez e resiliência no músculo gastrocnêmio de ratas. Foi realizado alongamento manual passivo, 10 repetições de 30s, por 10 dias consecutivos uma ou duas vezes ao dia, após 14 dias de imobilização em plantiflexão máxima. Verificou-se que o alongamento realizado uma vez ao dia restaurou as propriedades mecânicas do tecido muscular. Menon et al. (2007) imobilizaram (em posição de encurtamento) o músculo sóleo de ratos por 21 dias e realizaram o alongamento por 3 repetições de 30s, a cada 48h durante 3 semanas. As variáveis analisadas foram peso muscular, comprimento muscular e número de sarcômeros e verificou-se que o alongamento após imobilização manteve o comprimento muscular e número de sarcômeros, mas não evitou a perda do peso muscular.

Apesar dos muitos estudos realizados com o alongamento, a maioria avaliou músculos que não foram submetidos à lesão, sendo necessária a realização de pesquisas que avaliem o efeito do alongamento em músculos lesados submetidos à terapêutica isolada ou associada a recursos eletrotermofoterapêuticos.

4.7.1 Alongamento e contusão muscular

A influência do exercício na regeneração muscular vem sendo investigada, porém, ainda sem consenso (JARVINEN et al, 2005;2007; REURINK et al., 2012; MASON et al., 2007;2012). Sabe-se que a mobilização provoca aumento no número de miotubos, rápido e intenso crescimento dos capilares, formação e orientação do

tecido de cicatrização e ganho de força tênsil (LEHTO; JARVINEN, 1991; LEECH, 1997). Entretanto, há poucos estudos que investigaram os mecanismos de regeneração após tratamento da contusão muscular incluindo exercícios de alongamento (HWANG et al., 2006; KANNUS et al., 1992).

Segundo Kannus et al. (1992), após uma lesão, o alongamento muscular controlado e movimentos articulares melhoram, respectivamente, a orientação das fibras de colágenos e a atrofia muscular. Lehto et al. (1985) encontraram que a imobilização, após a lesão muscular, acelera a produção de tecido de granulação e que 5 dias de imobilização em ratos, são benéficos para permitir subsequente mobilização, sem causar trauma no tecido em cicatrização.

O estudo de Hwang e colaboradores (2006) comparou o efeito da decorina, uma proteoglicana humana de ação antifibrótica, com o alongamento muscular do gastrocnêmio, mantido por 5s e intercalado com 5s de repouso, num tempo total de 15 min, realizados após 2,7, e 14 dias da lesão muscular em ratos. Encontrou-se que o grupo que utilizou a decorina demonstrou melhores resultados na regeneração, fibrose e nas propriedades contráteis. Porém, dos grupos que foram submetidos ao alongamento, verificou-se que o grupo que iniciou após 14 dias, obteve melhores resultados no nível de fibrose (50% menor), no número de miofibras regeneradas e maior comprimento muscular.

O estudo de Gregory et al. (1995) analisou os efeitos da natação e corrida imediatamente e 72h após a lesão do bíceps femoral de ratos e foi observada diminuição do número de leucócitos, eritrócitos e fibras colágenas, nos grupos mobilizados imediatamente após a lesão, demonstrando que o exercício imediato melhora a resposta à lesão. Jarvinen (1976) avaliou os efeitos da caminhada na esteira, após lesão do gastrocnêmio e concluiu que a mobilização precoce, imediatamente após a lesão, restaurou força mais rapidamente que no músculo imobilizado. Também encontrou que esse exercício ocasionou diminuição mais rápida dos mediadores químicos da inflamação como leucócitos e eritrócitos.

Em estudo histomorfométrico do músculo sóleo, em ratos, que tiveram a articulação tíbio-társica imobilizada em plantiflexão (encurtamento do músculo sóleo), por 3 semanas, foram encontrados: atrofia muscular e sinais de lesão e degeneração muscular (GOMES et al., 2007). Estes mesmos sinais foram encontrados em músculos que foram alongados 3 ou 1 vez por semana, mostrando que mesmo com o alongamento, não houve diminuição dos sinais histopatológicos.

No entanto, quando se avaliou a ASTFM, o grupo que foi imobilizado e alongado 3 ou 1 vez por semana, por 40 min, apresentou menor atrofia quando comparado ao grupo que foi somente imobilizado em posição de encurtamento (COUTINHO et al., 2004; GOMES et al., 2004). Estes resultados sugerem que mesmo em músculo lesado, submetido a um protocolo de longa duração de alongamento (40 min), pode-se minimizar a atrofia muscular. Desta forma, sugerem-se investigações com protocolos de alongamentos de curta duração, comumente utilizados na clínica, isto é, entre 15s-1min, em músculos lesados por contusão, para melhor elucidação do efeito do alongamento em músculos lesados.

4.8 ARQUITETURA MUSCULAR

Segundo Lieber (2002) para se analisar a arquitetura muscular é importante avaliar a massa muscular, o comprimento muscular, ASTFM e o comprimento do sarcômero. Wepppler e Magnusson (2010) ainda afirmam que a análise da extensibilidade muscular deve ser realizada de maneira multidimensional, isto é, avaliando o comprimento muscular, número de sarcômeros em série, comprimento dos sarcômeros, ASTFM e tensão muscular em relação ao tempo.

Como descrito anteriormente, o alongamento pode influenciar a resistência do comprimento passivo do músculo e conseqüentemente aumentar sua extensibilidade (WEPPLER; MAGNUSSON, 2010).

Em estudo com ratos, Coutinho et al. (2004) encontraram aumento no comprimento muscular após alongamento do músculo sóleo, com duração de 40 min, 3 vezes por semana, durante 3 semanas. Bertolini et al (2009) avaliaram o comprimento muscular após a aplicação do UST antes da realização do alongamento do músculo gastrocnêmio hígido de ratos. Foram realizadas 15 aplicações de UST associadas ao alongamento (3 séries de 30s, diariamente, por 3 semanas) e foi encontrado aumento significativo no comprimento muscular, nos grupos tratados com UST de 0,5 e 1 W/cm² no modo contínuo. Entretanto, o grupo que realizou somente alongamento não apresentou aumento no comprimento muscular, mostrando o efeito no UST no aumento da sua extensibilidade. Esse efeito também foi encontrado em estudos com humanos que verificaram aumento da dorsiflexão do tornozelo nos indivíduos em que foi aplicado o UST (1,5 W/cm², contínuo por 7 min) anterior ao alongamento (KNIGHT et al., 2001).

Uma das teorias que explicam o aumento da extensibilidade é o aumento do número dos sarcômeros (WEPLER; MAGNUSSON, 2010). Estudos com animais experimentais demonstraram aumento no número dos sarcômeros, quando o músculo era imobilizado em posição de alongamento (TABARY et al., 1972, GOLDSPINK et al., 1974, WILLIAMS; GOLDSPINK, 1978, WILLIAM, 1990; COUTINHO et al., 2004; SALVINI et al., 2006; MENON et al.; 2007). Secchi et al. (2008) observaram aumento no número de sarcômeros no músculo sóleo hígido de ratos submetidos ao alongamento, mantido por 40 min, 2 vezes por semana, durante oito semanas consecutivas.

Em relação ao comprimento dos sarcômeros, sabe-se que a tensão isométrica máxima é produzida quando o sarcômero atinge um comprimento próximo ao comprimento da sua posição em repouso (2.0-2.25mm). Essa tensão diminui quando os sarcômeros são alongados ou encurtados (GORDON et al. 1966). Williams & Goldspink (1971) identificaram que o músculo aumentava seu comprimento através da adição de sarcômeros ao longo das fibras musculares e verificaram que as fibras musculares esqueléticas adaptam-se a diferentes graus de alongamento, com provável remoção ou adição do número de sarcômeros em série, conforme a demanda funcional e o grau de tensão a que o músculo era submetido. Coutinho et al. (2004) demonstraram que sessões de alongamento sustentado durante 40 min, a cada 3 dias durante 3 semanas, no músculo sóleo imobilizado em posição de encurtamento, aumentam o comprimento do sarcômero e diminuem o número de sarcômeros quando comparado ao membro contralateral. Em contrapartida, o grupo que só alongou, sem ficar imobilizado, não obteve mudança nessa variável.

A ASTFM é diretamente proporcional à tensão tetânica máxima na fibra isolada que pode ser gerada pelo músculo (LIEBER, 2002). O aumento da ASTFM (crescimento radial) e o aumento do número de sarcômeros em série (crescimento longitudinal) são causados pelo incremento da síntese proteica (KOH, 1995). Esse incremento pode ser gerado pela aplicação do UST (STARKEY, 2001) e pelo alongamento (GOLDBERG et al., 1975; GOLDSPINK, 1977; GOLDSPINK et al., 1995) e conseqüentemente causar o aumento da ASTFM. Porém, tanto o estudo de Lopes et al. (2005) que realizou a aplicação do UST em músculos saudáveis de coelhos, quanto o de Wilkin et al. (2004) e Market et al. (2005) que aplicaram o UST após contusão muscular, não encontraram mudanças na ASTFM. Os estudos

existentes de alongamento e ASTFM em animais avaliaram músculos hígidos (Secchi et al., 2008) ou imobilizados (Coutinho et al., 2004). Secchi et al. (2008) verificaram que o alongamento sustentado durante 40 min, 2 vezes por semana, aumentou a ASTFM do grupo alongado em relação ao controle. Coutinho et al. (2004) verificaram que o alongamento de 40 min pode evitar a atrofia muscular em músculos imobilizados e pode aumentar a ASTFM em músculos hígidos. Porém, ainda não há indicativos de que o UST e o alongamento possam auxiliar no incremento da ASTFM em músculos lesionados.

Além de todos esses mecanismos que avaliam a plasticidade músculo esquelética, ainda pode ser realizado o estudo de proteínas envolvidas no processo de reparo muscular, tais como a desmina e laminina, importantes para esclarecer os processos celulares envolvidos na adaptação muscular após a lesão muscular.

4.9 DESMINA

A desmina é proteína de filamento intermediário muscular específico, expressa desde o início da formação de células esqueléticas, cardíacas e lisas (CAPETANAKI et al., 1997).

A desmina está concentrada na linha Z no espaço extramiofibrilar, na junção neuromuscular e miotendinosa, próximas aos costâmeros, ao redor das mitocôndrias e na periferia dos núcleos celulares (SHAH et al., 2004). Na FIGURA 3 está demonstrada, no desenho esquemático, a estrutura do sarcômero com as proteínas que contribuem para a sua manutenção e função, das quais se destaca a desmina.

A função da desmina é manter a integridade funcional e estrutural da miofibrila, trabalhando como uma proteína citoesquelética unindo a linha Z ao sarcolema no musculoesquelético (FUCHS; CLEVELAN, 1998). Também conecta a linha-Z aos costâmeros e desmossomas na periferia da célula muscular, contribuindo para a integridade mecânica da célula muscular (LAZARIDES; HUBBARD, 1976). A perda de desmina gera desalinhamento da miofibrila e ruptura dos costâmeros (SHAH et al, 2012).

Além do seu papel na estrutura mecânica, um citoesqueleto bem conectado também fornece meios para estabilizar a membrana da célula e para transmitir sinais extracelulares mecânicos para a estrutura do sarcômero (MANIOTIS et al., 1997; MILNER et al., 2000). Demonstra-se que a desmina é importante para a manutenção

do posicionamento e transmissão de cargas mecânicas nucleares através do citoesqueleto. A propagação eficaz do sinal mecânico através da célula tem implicações significativas para a transmissão da força e a iniciação da transdução do sinal em cascata dentro da fibra e do núcleo (ZEHLIN et al., 1997).

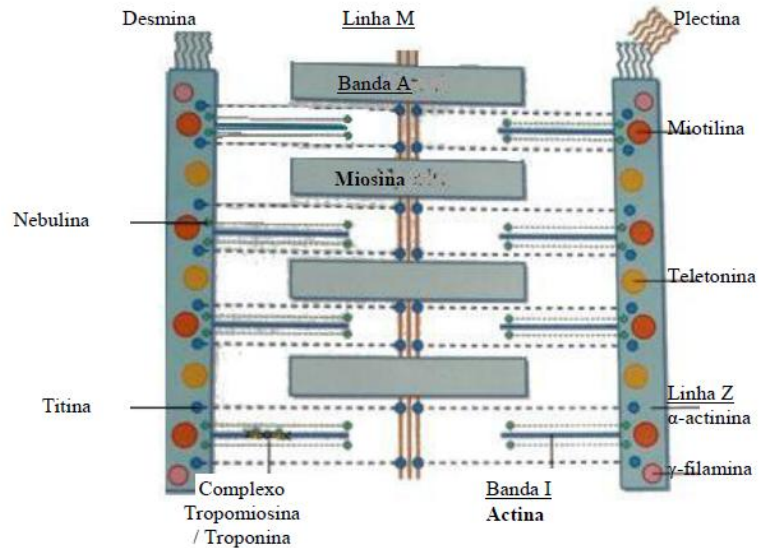


FIGURA 3- Proteínas auxiliares na manutenção do sarcômero (adaptado de DUBOWITZ; SEWRY, 2007).

Sabe-se que atividades físicas intensas, como contrações excêntricas repetidas, estão associadas com lesão na ultraestrutura muscular, como hiperalongamento dos sarcômeros, desorganização dos miofilamentos, lesão nos túbulos-T tanto em animais como em humanos (KJAER, 2004). A FIGURA 4 demonstra os mecanismos envolvidos quando o músculo é submetido à carga mecânica.

Dados morfológicos sugerem que os filamentos de desmina implicam na resistência muscular e são essenciais para manter a integridade da miofibrila em estresse (LI et al., 1997). Ao alongar-se localmente, os sarcômeros perdem a capacidade de gerar e transmitir força ativa e a desmina é responsável por retransmitir a tensão e evitar a interrupção da transmissão de força entre sarcômeros adjacentes (WANG et al., 1993). Mecanicamente, a falta de desmina resulta em diminuição da força isométrica máxima, aumento da fadigabilidade, pobre ligação transversal e longitudinal e leve aumento na rigidez passiva da fibra muscular (SHAH et al., 2012).

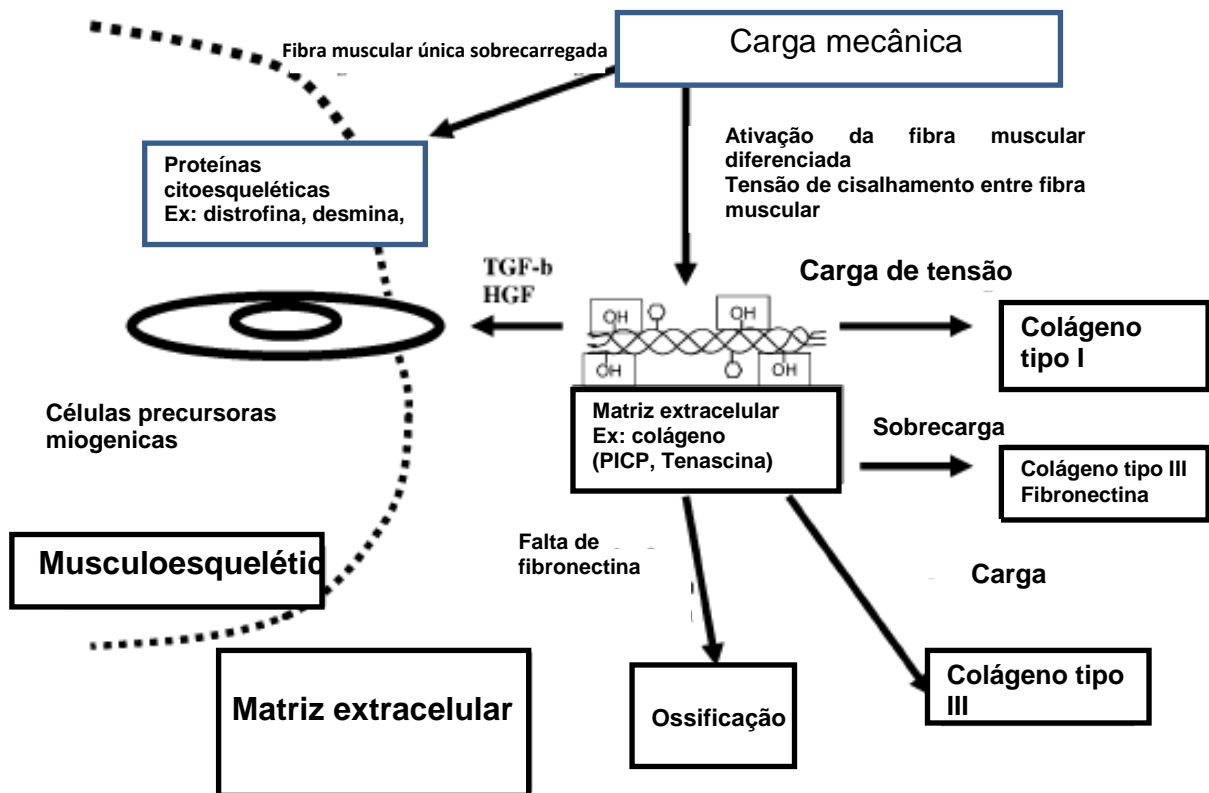


FIGURA 4- Mecanismos envolvidos no músculo submetido a carga mecânica intensa e resposta adaptativa da matrix extracelular (adaptado de KJAER, 2004). TGF-B: fator de transformação do crescimento; HGF: fator de crescimento hepatócito; PICP (terminal COOH propeptideo do colágeno tipo 1); NCAM- molécula de adesão celular neural; FA-1- antígeno fetal 1; OH- hidroxila.

A desmina é excelente marcador para identificar mioblastos e miotubos ativos in vivo e também importante indicador de lesão muscular (LIEBER et al., 1996). Ela também é expressa em baixas concentrações nas células satélites e na replicação de mioblastos (CAPETANAKI et al., 1997). Na miogênese, a desmina é expressa antes da titina, actina de musculoesquelético, cadeias pesadas de miosina e nebulina. A medida que os mioblastos vão se fundindo, a desmina se acumula e tornar-se mais organizada (CAPETANAKI et al., 1997). Smythe et al (2001) verificaram que a ausência de desmina prolonga a formação de mioblastos e retarda a fusão dos miotubos na regeneração de enxerto de músculos.

O UST, amplamente utilizado para tratamento das lesões musculares, age como estimulador de células precursoras miogênicas e proliferação de fibroblastos após a contusão muscular (RANTANEN et al., 1999). Essa ação é identificada pela imunohistoquímica da desmina, por ter sido verificado aumento da expressão

desta proteína, em músculos de ratos submetidos a contusão muscular e tratados com o UST (PIEIDADE et al, 2008). Desta forma, Piedade et al. (2008) e Shu et al. (2012) concluíram que esse recurso pode favorecer a regeneração tecidual, porém, não foi investigado os seus efeitos associados ao alongamento no musculoesquelético lesionado.

4.10 LAMININA

A lâmina ou membrana basal é uma cobertura fina, porém, resistente, que possui importante papel no controle do comportamento celular (ENGBRING et al., 2003). Na sua composição estão presentes proteínas como o colágeno do tipo IV, sulfato heparam, fibronectina, entactina, laminina e proteoglicanas como perclaranas, agrinas e barnacanas (ENGBRING et al., 2003; HIROTA, 1990). A rede polimérica de laminina e colágeno IV torna-se conectada com a entactina e essas múltiplas interações tornam-se cruciais para a formação e estabilidade da membrana (AUMAILLEY et al., 2000).

A integridade da lâmina basal é importante para o sucesso da regeneração, para a formação e orientação espacial dos novos miotubos e desenvolvimento mínimo de fibrose (ENGEL; ARMSTRONG, 1994). Quando a membrana está intacta, o tempo de regeneração pode ocorrer em 7 dias e quando ela é destruída extensamente pode levar até 21 dias (SVERZUT; CHIMELLI, 1999).

As lamininas são uma família de glicoproteínas de fundamental importância no desenvolvimento embrionário, além de terem papel importante em processos de diferenciação, migração e adesão celular e no tecido muscular na adesão mioblástica e formação dos miotubos (FOSTER et al., 1987).

Os efeitos biológicos das lamininas são em grande parte mediados por receptores de superfície que ligam as matrizes de lamininas às vias de sinalização intracelular (DURBEEJ, 2010). A laminina é o maior componente da membrana basal, formando uma rede proteica que organiza a própria formação dessa matriz extracelular especializada (DURBEEJ, 2010). Também pode ser encontrada revestindo epitélios, vasos sanguíneos, nervos e subjacente as meninges.

As lamininas são compostas por três subunidades: uma subunidade α , uma β e uma γ , produzindo uma molécula com um braço longo e três curtos em formato de cruz ou T. Lamininas que possuem três braços curtos contribuem para montagem da

membrana basal por ancoragem às superfícies celulares, polimerização e vinculada a entactina e colágeno IV (GAWLIK; DURBEEJ, 2011) (FIGURA 5).

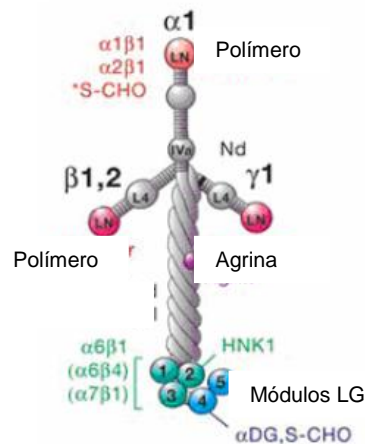


FIGURA 5- Desenho esquemático da laminina demonstrando a organização dos seus domínios 111 e 121. LG: domínio globular G, LN: domínio globular N; S-CHO: carboidratos sulfatados; DG: α distroglicanas; HNK-1: heparinas; $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$: integrinas. Pequena afinidade está representada pelo asterisco (adaptado de TIMPL et al., 2000).

Existem cerca de 6 diferentes isoformas de subunidades α , 3 isoformas β e 3 isoformas γ , que podem originar 16 diferentes lamininas, resultado das possíveis combinações entre as diferentes subunidades (DURBEEJ, 2010). Em cada cadeia estão incluídos os domínios globulares N- terminal (LN), domínios globulares internos (L4 e IV) e no C- terminal do braço longo, o domínio globular G (Miner et al, 2004).

As lamininas são classificadas de acordo com a interação com a matriz (polimerização, adesão a nidógenos entre outras glicoproteínas) e interações com a superfície celular (com glicolipídios, proteoglicanas e glicoproteínas). Muitas ligações não estão relacionadas a adesão celular e são encontradas nos braços curtos. Já as interações mediadas por receptores (como as integrinas) localizam-se nas porções C e N- terminal da subunidade α (MINER et al., 2004).

A laminina 1 é o primeiro componente da rede de formação expressa durante o desenvolvimento e tem importante papel inicial para o suporte da membrana (AUMAILLEY et al., 2000). As concentrações de laminina $\alpha 4$ e $\alpha 5$ diminui com o tempo e não são detectáveis no sarcolema no final da primeira semana pós natal (SOROKIN et al., 2000). A subunidade $\alpha 2$ é a única laminina expressa na membrana basal extrasináptica (GAWLIK; DURBEEJ, 2011). A membrana basal de células

maduras musculoesqueléticas contém laminina 211 e 221. Estas provêm suporte estrutural forte nas células musculares e se unem a outras proteínas de matriz como nidogenes (que conectam a rede de laminina com a rede de colágeno), fibulinas e agrinas (GAWLIK; DURBEEJ, 2011). A laminina-211 no sarcolema é extremamente importante para manutenção e estabilização da diferenciação muscular (PATTON et al., 1999). Lamininas são componentes chaves na arquitetura da membrana basal, e quando ocorrem mutações em suas estruturas podem levar a doenças genéticas humanas, como por exemplo a distrofia muscular (MINER et al., 2004).

As lamininas são essenciais para o desenvolvimento e organogênese embrionária e tem função crucial em vários tecidos incluindo músculos, nervo, pele, rim, pulmão e vasculatura (DURBEEJ, 2010). As mudanças no arranjo da laminina na membrana basal nos miotubos maduros para miofibras ocorrem no período perinatal em humanos e ratos (PATTON et al., 1997). Em ratos a laminina aparece na membrana basal no 11^o dia da embriogênese e em humanos a partir da 17^a semana de gestação, alcançando seu pico na 21^a semana (GAWLIK; DURBEEJ, 2011).

A variante da laminina predominante na membrana basal do músculo estriado do adulto é a laminina 211 ou também chamada de merosina. A deficiência em merosina condiciona interrupção da ligação entre a matriz extracelular e o subsarcolema do citoesqueleto, causando degradação muscular (ERVASTI, 1993). Outra variante também presente no musculoesquelético é a laminina 221 (GAWLIK; DURBEEJ, 2010). A laminina é expressa quando há integridade da lâmina basal (HAAS et al., 2001).

As lamininas ligam-se aos componentes da superfície celular, em especial com as integrinas e as distroglicanas (DURBEEJ, 2010). As distroglicanas são altamente glicosiladas, são proteínas expressadas ubiquitivamente que consiste de duas subunidades α e β (DURBEEJ, 2010). No musculoesquelético o complexo distrofina-glicoproteína une a laminina 211 aos componentes intracelulares distrofina e actina (SOROKIN et al., 2000). A integrina $\alpha7\beta1$ é a segunda unidade transmembrânica que une a laminina ao citoesqueleto (SOROKIN et al., 2000). Tanto a distroglicana quando a integrina $\alpha7\beta1$ contribuem para a produção de força, mas somente a distroglicana está envolvida na ancoragem da membrana basal ao sarcolema (SOROKIN et al., 2000) (FIGURA 6).

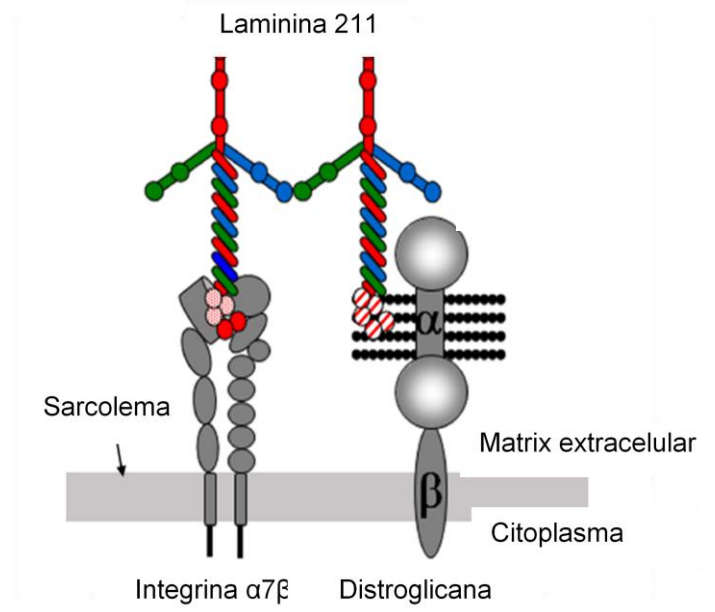


FIGURA 6- Receptores de laminina 211 e sua ligação com as integrinas e distroglicanas. Adaptado de DURBEEJ, 2010.

A membrana está constantemente sendo remodelada por processos de rupturas e sínteses de glicoproteínas como a laminina (ENGBRING et al., 2003). Este processo é extremamente importante na inflamação e reparo, pois a membrana necessita ser fragmentada para que haja a entrada e saída de células que participam do processo inflamatório (ENGBRING et al., 2003). A perda da membrana basal, evidenciada pela diminuição da expressão da laminina e do colágeno IV, tem sido observada em áreas com perda de diferenciação (HAAS et al, 2001; GARCIA et al, 2006). Verifica-se, portanto, que a laminina é importante em processos de diferenciação, migração e adesão celular (DURBEEJ, 2010). O mecanismo de lesão/regeneração depende da integridade da lâmina basal e de glicoproteínas de adesão, como a laminina (DURBEEJ, 2010). A lâmina basal íntegra favorece a formação e orientação espacial dos novos miotubos e desenvolvimento mínimo de fibrose (ENGEL; ARMSTRONG, 1994).

PARTE I

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após aprovação do projeto pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEA) da Universidade Federal do Paraná (Certificado nº 491/2010), foram selecionados 33 ratos albinos jovens (8-9 semanas, 219 ± 35 g). Os animais foram agrupados (4 ratos por gaiola) e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 h de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e ração peletizada, no biotério das Faculdades Integradas do Brasil (Unibrasil). O projeto foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (*National Research Council*, 1996).

Os animais foram divididos em quatro grupos e todos foram ortotansados no 8º dia após o início do experimento (FIGURA 7):

- Grupo Controle (GC, n=3): os ratos deste grupo não tiveram o músculo gastrocnêmio direito (MGD) submetido à contusão e não receberam nenhum tratamento. Permaneceram no biotério durante 8 dias.
- Grupo Lesão (GL, n=10): os ratos deste grupo tiveram o MGD submetido à contusão, como descrito por Minamoto et al. (2001). Permaneceram no biotério durante 8 dias.
- Grupo Alongamento (GA, n=10): o MGD do rato não foi submetido à contusão, porém, foi realizada 1 sessão diária de alongamento, iniciada 72h após a chegada do animal ao biotério, durante 5 dias consecutivos. O protocolo de alongamento manual passivo do MGD consistiu de 4 repetições (TAYLOR et al., 1990), com duração de 30s, com intervalo de 30s entre cada repetição (POLIZELLO et al., 2009).
- Grupo Lesão e Alongamento (GLA, n=10): o MGD foi submetido à contusão, e, após 72h, foi iniciado o alongamento manual passivo do MGD, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Todos os ratos de todos os grupos foram submetidos à ortotanásia no 8º dia. Neste estudo não houve perda amostral em nenhum grupo experimental.

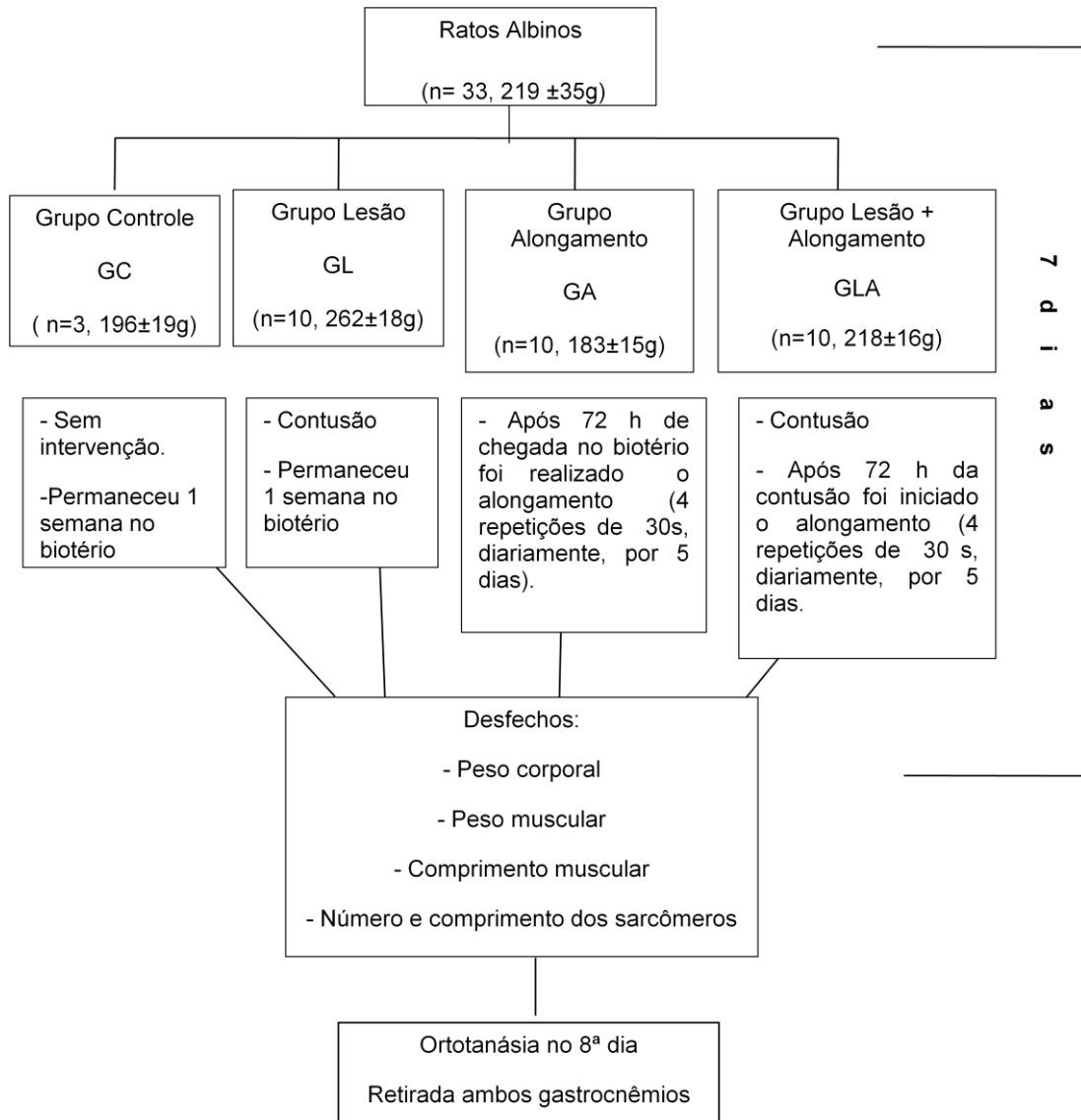


FIGURA 7- Fluxograma do estudo- Parte I

5.2 PROTOCOLO PARA PROMOVER A CONTUSÃO MUSCULAR

Os animais foram anestesiados com Ketamina (95 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg) intra peritoneal e mantidos em decúbito ventral, com a pata direita traseira imobilizada manualmente em extensão de joelho. Com os animais sob efeito anestésico, a contusão foi produzida por um equipamento que consiste em uma plataforma de madeira (100 cm²) com um tubo oco de alumínio, graduado em 5 cm, fixado perpendicularmente a plataforma, previamente descrito por Minamoto et al. (2001). Por este tubo de alumínio correu livremente a uma altura de 37 cm, uma carga de 200 g de aço inoxidável, em forma de projétil, que atingiu o ventre muscular do gastrocnêmio direito na sua porção medial (FIGURA 8). O local no músculo, para

determinar a queda do projétil, foi previamente demarcado com pincel atômico e remarcado todos os dias, para garantir que todas as aplicações do UST fossem realizadas no mesmo local. O músculo gastrocnêmio esquerdo não foi submetido à contusão, sendo este também utilizado como controle. Esse protocolo foi realizado no laboratório de Fisiologia das Faculdades Integradas do Brasil (Unibrasil).

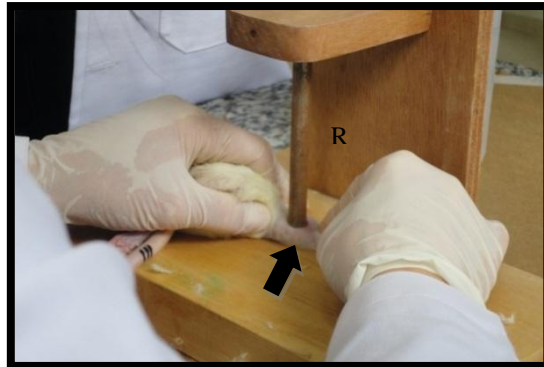


FIGURA 8- Contusão do músculo gastrocnêmio. Seta- músculo gastrocnêmio; Asterisco- projétil de 200g.

5.3 PROTOCOLO PARA O ALONGAMENTO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO

Para alongamento do MGD, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e as patas dianteiras foram imobilizadas por uma pessoa, para que outra pessoa realizasse o alongamento manual passivo. Para tal procedimento o animal não estava sob efeito anestésico. Para o alongamento foi realizada a flexão dorsal máxima da articulação tíbio-társica, manualmente, com o joelho estendido, como descrita por Mattiello-Sverzut et al. (2006) (FIGURA 9). O protocolo de alongamento manual passivo do MGD foi realizado da seguinte maneira: cada alongamento foi mantido por 30 s cada repetição, com 30 s de repouso entre cada repetição (POLIZELLO et al., 2009), 4 repetições (TAYLOR et al., 1990), 1 vez por dia, diariamente, 5 vezes por semana, de segunda à sexta-feira, por 2 semanas, isto é, até o 21º dia do experimento, totalizando 10 aplicações. O procedimento para alongamento foi realizado no laboratório de Fisiologia das Faculdades Integradas do Brasil (Unibrasil).



FIGURA 9- Alongamento manual passivo do músculo gastrocnêmio direito

5.4 ORTOTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS MÚSCULOS

Após 24h do término do experimento, os animais foram anestesiados intraperitoneal (Ketamina, 95 mg/kg e Xylazina, 12 mg/kg), para a retirada dos músculos gastrocnêmios bilateralmente. Em seguida, os animais foram submetidos à ortotanásia com overdose anestésica.

Durante a dissecação, os músculos foram periodicamente gotejados com solução salina (NaCl 0,9%). Posteriormente, o músculo foi pesado em balança eletrônica de precisão e após foi mensurado o comprimento muscular por meio de um paquímetro digital. Em seguida, o músculo gastrocnêmio foi mergulhado em solução de glutaraldeído (2,5%) por 3h, em seguida foi transferido para solução de ácido nítrico (30%), por 48h e posteriormente armazenados em glicerol (50%).

5.5 ESTIMATIVA DE SARCÔMEROS EM SÉRIE E COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS

Para obtenção de fibras musculares isoladas dos gastrocnêmios de ambas as patas e avaliação do número e comprimento dos sarcômeros em série, a porção lateral do músculo gastrocnêmio, isto é, pré-seccionada da porção medial, foi fixada durante 3 h em glutaraldeído (2,5%, *vetec*) e em seguida mantida, durante 2 dias, em ácido nítrico (30%, *alfa*). Posteriormente foi armazenada em solução de glicerol (*vetec*) diluída em água destilada (50%).

Para confecção das lâminas histológicas, cinco fibras musculares foram isoladas, do ventre de cada músculo gastrocnêmio, direito e esquerdo. O isolamento

das fibras foi realizado com o auxílio de lupa (*Toyo/vision equipamentos*) e pinças ultrafinas (*Prolab*). Em seguida, as fibras isoladas foram montadas em lâmina histológica (*Perfecta*, 26 x 76 mm), em meio contendo gelatina-glicerina (*Sigma*) e protegidas por uma lamínula (*Solidor*, 24 X 60 mm), para posterior observação em microscópio de luz (*Leica*), em objetiva de 100X com óleo de imersão (*Merck*). Esse procedimento foi realizado no laboratório de Fisiologia das Faculdades Integradas do Brasil, em Curitiba-PR (FIGURA 10).

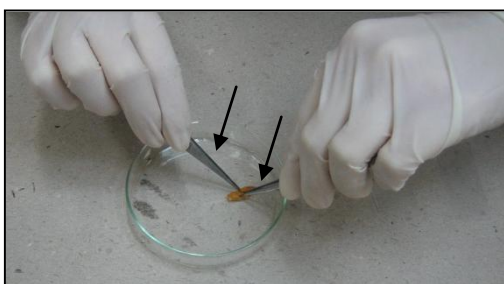


FIGURA 10- Músculo gastrocnêmio sendo manipulado com pinças ultrafinas para o isolamento das fibras musculares. Setas: pinças ultrafinas; asterisco: músculo gastrocnêmio sendo manipulado para o isolamento das fibras musculares.

Em cada fibra muscular, o número de sarcômeros em série foi identificado ao longo de 300 μm , em microscópio de Luz (objetiva 100X, em imersão; microscópio *Leica DFC 300 Fx*). Como a régua de calibração para o microscópio era de 100 μm , foram realizadas 3 fotos de cada fibra para totalizar 300 μm (FIGURA 11). Além disso, este procedimento foi realizado em 5 fibras de cada músculo, de cada pata, em todos os ratos, de todos os grupos. Ao final foi realizada a soma do número de sarcômeros em cada fibra muscular, isto é, ao longo de 300 μm e a média aritmética da quantidade de sarcômeros em série das 5 fibras musculares isoladas de cada músculo, de cada rato. A quantificação do número de sarcômeros em série foi realizada em monitor de vídeo, com sistema de vídeo-imagem (*Leica*), acoplado ao microscópio pertencente ao Laboratório de Genética, no Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná-UFPR, em Curitiba-PR.

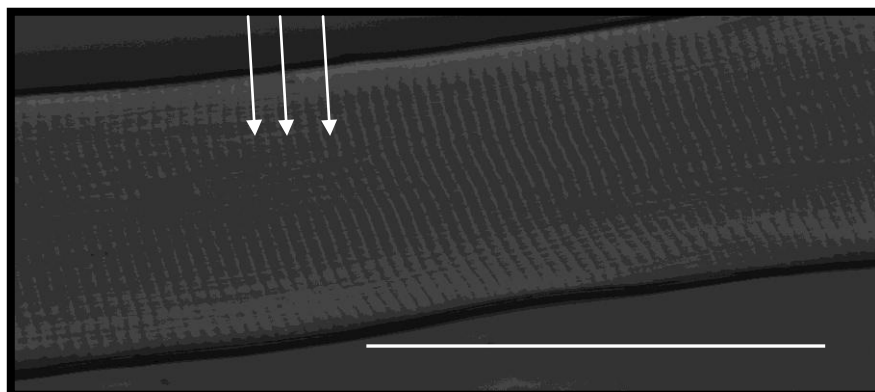


FIGURA 11- Fotomicrografia de uma fibra muscular isolada. Faixa na cabeça da seta representa um sarcômero que foi contado ao longo dos 100 μm .

O número total de sarcômeros e o comprimento dos sarcômeros, em cada fibra muscular isolada, foram estimados pela correlação entre o número de sarcômeros identificados ao longo de 300 μm da fibra e o comprimento total do músculo (mensurado pelo paquímetro), como descrito por Williams; Goldspink (1971). Apesar de haver controvérsias na literatura, nesse estudo, o comprimento dos sarcômeros ao longo das fibras musculares foi considerado homogêneo (TARDIEU et al., 1977; MATANO et al., 1994; TAMAI et al., 1989).

5.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para avaliar a normalidade e a homoscedasticidade foram realizados os testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As estatísticas descritivas para os resultados paramétricos e não paramétricos estão expressas como a média \pm desvio padrão. As variáveis: peso corporal, peso muscular, comprimento muscular, número e comprimento dos sarcômeros, foram avaliados pela comparação entre os resultados obtidos no músculo gastrocnêmio da pata direita (lesada e/ou tratada com alongamento) e esquerda (intacta), e entre o peso corporal inicial e final, em cada grupo experimental (intragrupo). Assim, tanto as comparações intra como intergrupos foram realizadas por meio da ANOVA *post hoc Tukey unequal HSD*, para valores paramétricos e quando não paramétricos foi usado o *Kruskal Wallis*. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

As variáveis que apresentaram homoscedasticidade foram o peso corporal, o comprimento muscular, o número e comprimento dos sarcômeros sendo utilizado a

ANOVA *post hoc Tukey unequal HSD* e a variável que não apresentou homoscedasticidade foi o peso muscular sendo utilizado o *Kruskall Wallis*.

6 RESULTADOS

6.1 PESO CORPORAL

. Foi encontrado aumento significativo entre o peso corporal inicial e o final em todos os grupos (intragrupo, $p < 0,05$). Em relação ao peso absoluto, o peso corporal final do GL foi maior que o GA ($337 \pm 28g$ vs $275 \pm 25g$, $p=0,008$) e GLA ($337 \pm 28g$ vs $281 \pm 28g$, $p=0,002$). Já em relação a diferença relativa no ganho de peso, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os resultados estão descritos na TABELA 1.

TABELA 1- Efeito do alongamento no peso corporal dos ratos

Grupos	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Diferença Relativa (%)	p ANOVA
GC	196±19	286±19*	46,3	0,0006
GL	264±18	337±28*#	28,6	0,0001
GA	190±12	275±25*	45,1	0,0001
GLA	197±21	281±28*	43,7	0,0001

Os resultados são média \pm desvio padrão. GC= grupo controle; GL= grupo lesão; GA= grupo submetido ao alongamento; GLA= grupo lesão + alongamento.*comparado com o peso corporal inicial; # comparado com GA ($p=0,008$) e com GLA ($p=0,002$).

6.2 PESO MUSCULAR

Não foi encontrada nenhuma diferença significativa comparando-se o peso muscular do gastrocnêmio direito e esquerdo (intragrupo, $p > 0,05$). Na comparação intergrupos o peso muscular do MGD do GL foi maior que o GA ($1,89 \pm 0,17g$ vs $1,33 \pm 0,13g$, $p = 0,001$, *Kruskall Wallis*). Os resultados estão demonstrados na FIGURA 12.

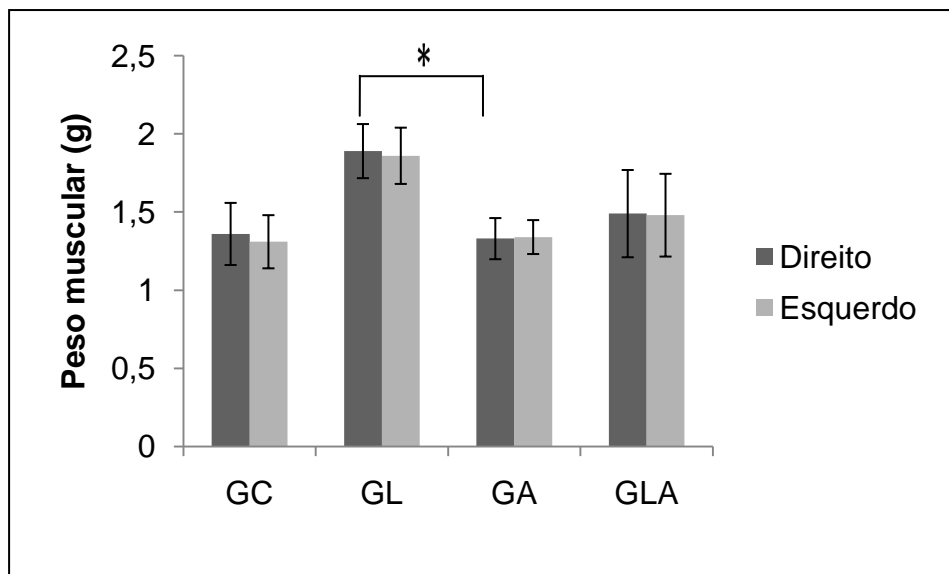


FIGURA 12- Efeito do alongamento no peso muscular do gastrocnêmio. Os resultados são média \pm desvio padrão. GC- grupo controle; GL- grupo lesão; GA- grupo alongamento; GLA- grupo lesão e alongamento. * $p = 0,001$ quando comparado ao GA. Direito: músculo gastrocnêmio direito; Esquerdo: músculo gastrocnêmio esquerdo.

6.3 COMPRIMENTO MUSCULAR DO GASTROCNÊMIO

Analisando o comprimento muscular do gastrocnêmio direito e esquerdo não foi observada diferença estatisticamente significativa intragrupo. Nas comparações intergrupos o comprimento do MGD do GL foi maior em relação ao GA ($28,53 \pm 3,63$ mm vs $22,37 \pm 1,82$ mm, $p = 0,01$, *ANOVA*). Os dados estão apresentados na FIGURA 13.

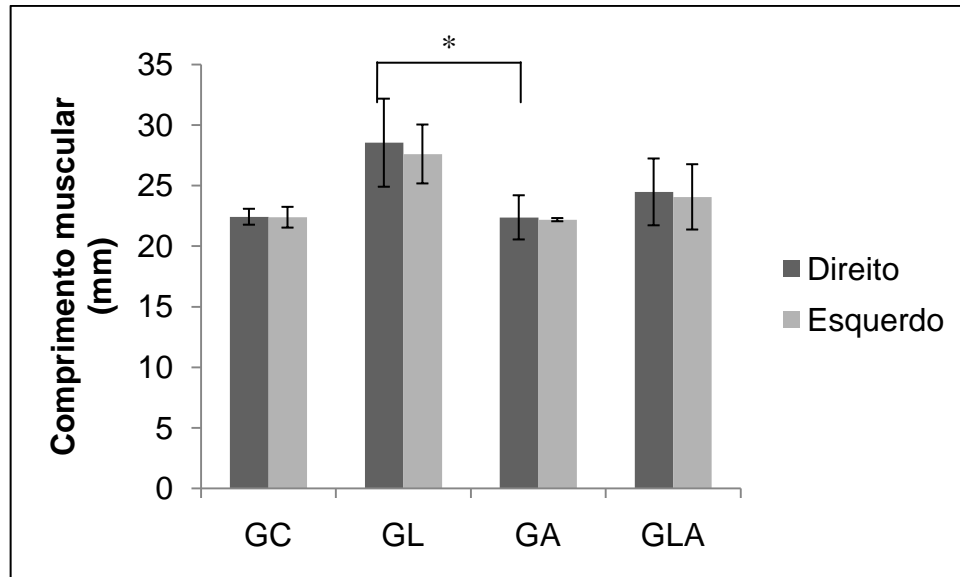


FIGURA 13- Comprimento muscular dos gastrocnêmios dos ratos. Os resultados são média±desvio padrão. GC- grupo controle; GL- grupo lesão; GA- grupo alongamento; GLA- grupo lesão e alongamento. ENSS: estimativa do número de sarcômeros em série. Direito: músculo gastrocnêmio direito; Esquerdo: músculo gastrocnêmio esquerdo.*comparado ao GA (p=0,01).

6.4 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE (ENSS)

Na comparação intergrupos do MGD a ENSS do GL foi maior que o GA (9455 ±1540 vs 5023±1188; p= 0,000, ANOVA) e o GLA foi maior que o GA (9123±720 vs 5023±1188; p=0,000, ANOVA). Os dados estão demonstrados na FIGURA 14.

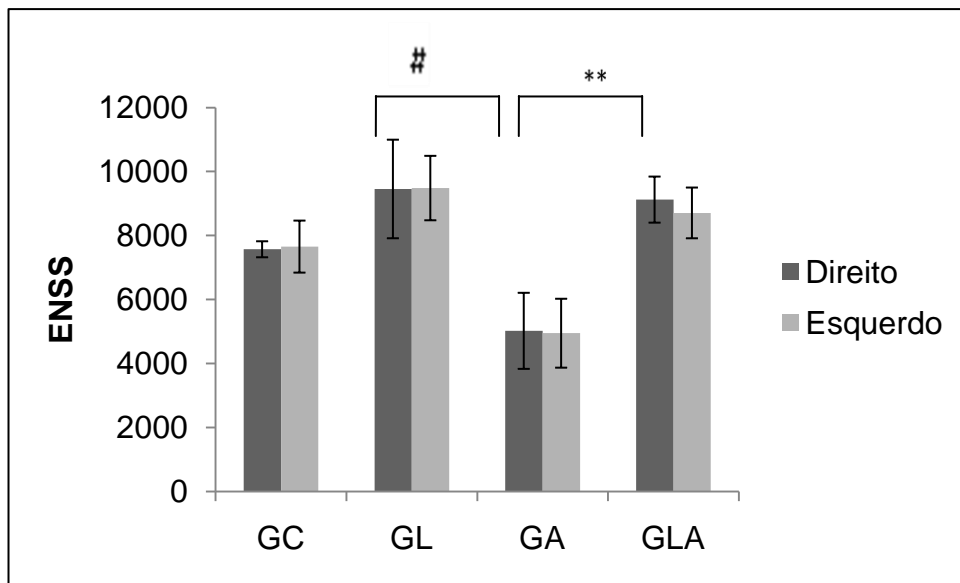


FIGURA 14- Estimativa do número dos sarcômeros dos gastrocnêmios dos ratos. Os resultados são média \pm desvio padrão. GC- grupo controle; GL- grupo lesão; GA- grupo alongamento; GLA- grupo lesão e alongamento. ENSS: estimativa do número de sarcômeros em série. Direito: músculo gastrocnêmio direito; Esquerdo: músculo gastrocnêmio esquerdo. # comparado ao GA ($p=0,000$) e ** quando comparado ao GA ($p=0,000$).

6.5 COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS

Em relação a comparação intragrupo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em nenhum grupo.

No comprimento dos sarcômeros do MGD foi encontrado aumento significativo do GA em relação ao GL ($4,60 \pm 0,77 \mu\text{m}$ vs $3,03 \pm 0,18 \mu\text{m}$, $p=0,0008$); em relação ao GLA ($4,60 \pm 0,77 \mu\text{m}$ vs $2,96 \pm 0,17$, $p=0,001$) e em relação ao GC ($4,60 \pm 0,77 \mu\text{m}$ vs $2,95 \pm 0,03 \mu\text{m}$, $p=0,001$). Os dados estão apresentados na FIGURA 15.

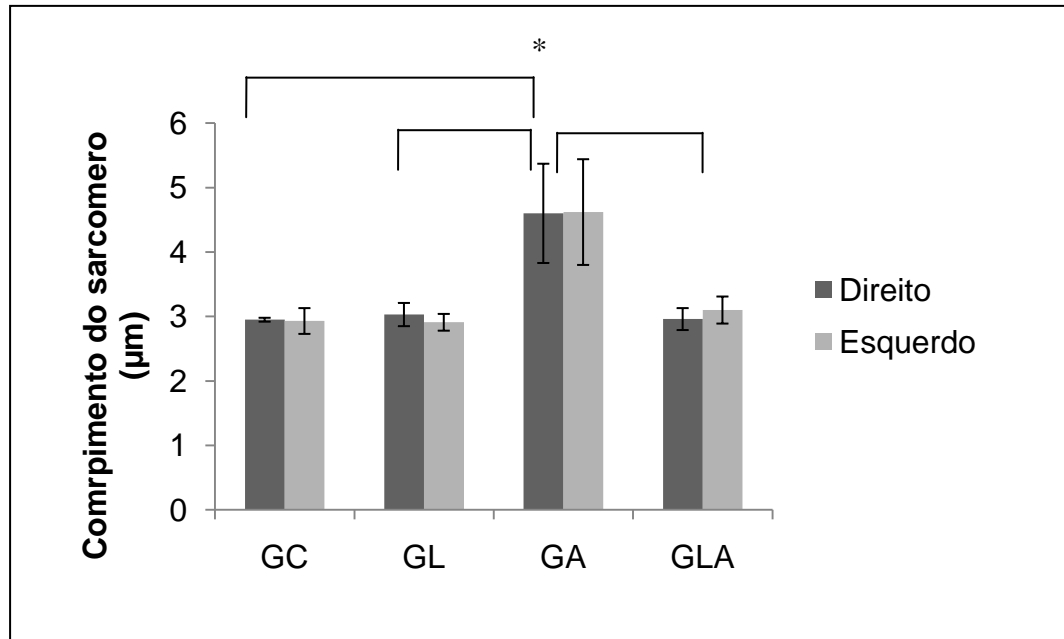


FIGURA 15- Comprimento do sarcômero dos gastrocnêmios dos ratos. Os resultados são média \pm desvio padrão. GC- grupo controle; GL- grupo lesão; GA- grupo alongamento; GLA- grupo lesão e alongamento. ENSS: estimativa do número de sarcômeros em série. Direito: músculo gastrocnêmio direito; Esquerdo: músculo gastrocnêmio esquerdo. *comparado ao GL ($p=0,001$), GLA ($p=0,001$) e GC($p=0,04$).

7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram aumento do peso muscular, comprimento muscular e estimativa do número de sarcômeros em série do grupo lesado em relação ao alongado. O protocolo de alongamento no músculo lesado proporcionou incremento no número de sarcômeros em relação ao grupo não lesionado.

A fibra muscular tem grande propriedade de adaptação a novos estímulos, podendo alterar seu volume, comprimento muscular, número e comprimento dos sarcômeros (BURKHOLDER; LIEBER, 1998).

Em relação ao peso corporal final foi observado aumento em todos os grupos, compatível com o ganho de peso corporal normal do animal (MINAMOTO et al, 2001). No entanto, o GL apresentou peso corporal maior quando comparado ao GA e GLA, sugerindo que o protocolo de alongamento realizado diariamente poderia ter interferido no ganho de peso corporal. Porém, o ganho relativo de peso corporal não foi significativo entre os grupos, demonstrando que o alongamento não interferiu nessa variável.

Apesar do peso relativo não demonstrar significância, o peso muscular do GL foi maior quando comparado ao GA, isso pode ter ocorrido devido a fase aguda após a contusão, caracterizada por período inflamatório, na qual é comum a presença de edema, que pode ter acarretado o aumento do peso muscular (CRISCO et al., 1994).

O aumento de peso muscular após a lesão é divergente na literatura, enquanto alguns autores encontraram resultados semelhantes ao presente estudo, ou seja, aumento do peso muscular no músculo lesado (CRISCO et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2006; JARVINEN, 1976), outros não encontraram qualquer aumento do peso do músculo gastrocnêmio, 48 h após a lesão, justificando essa inalteração pela depleção proteica causada pela lesão (MINAMOTO et al., 1999).

Por outro lado, não se pode deixar de considerar que o ganho de peso corporal, aumentou em todos os grupos e, tanto o peso muscular quanto o comprimento muscular, aumenta com o incremento do peso corporal. Além disso, o comprimento muscular não é a melhor medida para estabelecer o comprimento longitudinal do músculo, sendo mais recomendada a contagem do número de sarcômeros em série.

No presente estudo foi observado maior número de sarcômeros em série no MGD do GL quando comparados ao GA. Deste modo, supõe-se que o maior peso corporal final absoluto do GL, pode ter causado aumento no peso e comprimento musculares, resultando em mais sarcômeros em série (MENON et al., 2007). Contudo, o ganho de peso relativo entre os grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa. De qualquer forma, não se pode sugerir que a maior quantidade de sarcômeros em série do GL foi decorrente da contusão muscular. Assim, sugerem-se investigações da ultraestrutura muscular, por exemplo, por meio de microscopia eletrônica de transmissão bem como análises moleculares, para melhor entendimento do mecanismo de sarcomerogênese nos músculos apenas submetidos à contusão.

Na análise do comprimento dos sarcômeros do GL foi observado menor comprimento quando comparado ao GA. Este achado corrobora com o estudo de Williams e Goldspink (1978) que reportaram que modificações no número de sarcômeros em série implicam em ajustes no comprimento dos sarcômeros. Desta forma, o menor comprimento dos sarcômeros encontrado no GL pode ter sido decorrente do maior número de sarcômeros em série, para que ocorresse a

sobreposição ótima dos filamentos contráteis (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1978; GORDON et al., 1966).

Por outro lado, o GLA apresentou maior número de sarcômeros em série quando comparado ao GA, porém, estes grupos não apresentaram diferença estatística com o grupo controle. Este desfecho sugere que o músculo lesado pode responder diferentemente ao alongamento quando comparado ao músculo hígido. Outros pesquisadores avaliaram o efeito do alongamento, realizado 2 vezes por semana, no músculo sóleo hígido de ratos jovens e, após 3 semanas, observaram aumento do número de sarcômeros em série (SECCHI et al., 2008).

Pode-se supor que no presente estudo, não houve tempo e estímulo suficientes para incrementar o número de sarcômeros em série nos músculos não lesados mas submetidos ao alongamento (GA). Estudos anteriores mostraram que o estímulo do tipo imobilização dos músculos em posição alongada, por tempo de 3-4 semanas, acarretava aumento no comprimento muscular pela adição no número de sarcômeros em série (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1994; WILLIAMS et al., 1988). No entanto, no presente estudo, os músculos não foram imobilizados em posição alongada e também não permaneceram o período de 3-4 semanas, suficientes para adição importante no número de sarcômeros em série, mesmo quando o alongamento é realizado de forma intermitente, isto é, não mantidos imobilizados em posição de alongamento (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1994; WILLIAMS et al., 1988; COUTINHO et al., 2004).

Foi uma surpresa encontrar maior número de sarcômeros no GLA quando comparado ao GA. Até o presente momento, não foi encontrado nenhum artigo que avaliasse o número e comprimento dos sarcômeros, após lesão muscular. Além disso, não existem muitos artigos sobre os efeitos do alongamento após a lesão muscular (HWANG et al., 2006; JARVINEN, 1976; FARIA et al., 2008).

Hwang e colaboradores (2006) verificaram, em músculo de ratos, os efeitos do alongamento passivo (5 s de manutenção com 5 s de intervalo durante 15 min) nas fases inflamatória, regenerativa e proliferativa. Estes autores concluíram que todos os grupos submetidos ao alongamento (iniciados no 2º, 7º e 14º dia) apresentaram diminuição da fibrose, melhora significativa na regeneração e aumento da força muscular, sendo mais expressivas quando o alongamento foi iniciado no 14º dia.

Alguns estudos avaliaram os efeitos da mobilização no processo de regeneração muscular (JARVINEN, 1976; FARIA et al., 2008). Jarvinen (1976) reportaram que a mobilização induz a uma reepitelização mais rápida e mais intensa nas bordas da lesão principalmente nos estágios iniciais. Faria et al. (2008) investigaram diferentes protocolos de mobilização após lesão muscular em ratos. Os protocolos propostos foram para mobilizar durante 5 a 8 dias, com sessões de 15 ou 45 min, iniciando 1 e 3 horas após a lesão. Concluíram neste estudo que o processo de regeneração muscular está relacionado com o início e o tempo da mobilização, sendo maior nos grupos que iniciaram mais precocemente e que tiveram maior tempo de mobilização.

Assim, a sarcomerogênese observada do GLA comparada ao GA pode ter respondido ao início precoce da mobilização, já que no presente estudo foi iniciado o alongamento 72h após a contusão. Já no GA, como o músculo apresentava-se em estado normal, não encurtado, não imobilizado, não lesado, supõe-se que o estímulo necessário para induzir a adição de sarcômeros em série, deveria ser maior e por período mais prolongado, como realizado por outros estudos (COUTINHO et al., 2004; SECCHI et al., 2008).

Foi encontrado no presente estudo, maior comprimento dos sarcômeros no GA comparado ao GLA, concordando com a hipótese de que o ajuste do comprimento dos sarcômeros ocorre de acordo com o número de sarcômeros, para que o músculo desenvolva a máxima tensão (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1978).

Podem ser indicadas algumas limitações do presente estudo, como a ausência da análise da área de secção transversa, do tecido conjuntivo, da expressão gênica e de proteínas, para investigar os mecanismos da plasticidade de músculos lesados em resposta ao estímulo de alongamento.

Por outro lado, o presente estudo permitiu observar que os protocolos de contusão e alongamento não interferiram no ganho de peso corporal final dos animais. Além disso, o protocolo de alongamento foi suficiente para induzir a sarcomerogênese em músculos lesados (GLA), sem interferir nos músculos hígidos (GA). No entanto, os músculos apenas alongados (GA), isto é, não lesados, apresentaram comprimento dos sarcômeros maior quando comparado aos demais grupos, demonstrando que como este grupo apresentou o menor número de sarcômeros em série, seria esperado que tivesse o maior comprimento dos sarcômeros, já que para desenvolver a máxima tensão, há necessidade de

sobreposição ótima dos filamentos de actina e miosina (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1978).

8 CONCLUSÃO

Os desfechos do presente estudo indicam a importância do alongamento, mesmo na fase aguda após a contusão muscular, para ganho de sarcômeros em série. Com as devidas restrições de extrapolação, o protocolo de alongamento poderia ser indicado para prevenção de perda de amplitude de movimento, comumente observada após lesão muscular.

PARTE II

9 MATERIAL E MÉTODO

Após aprovação do projeto pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEAA) da Universidade Federal do Paraná (Certificado nº 491/2010), foram selecionados 35 ratos albinos jovens (8-9 semanas, $271,51 \pm 14,39$ g). Os animais foram agrupados (4 por gaiola) e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12h de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e ração peletizada, no biotério das Faculdades Integradas do Brasil (Unibrasil). O projeto foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (*National Research Council*, 1996).

Os animais (n=35) foram divididos em quatro grupos e todos foram ortotansados no 22º dia após o início do experimento. A FIGURA 16 representa o fluxograma experimental e os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira:

Grupo Controle (GC) (n=03): os ratos não foram submetidos a nenhum procedimento experimental, foram mantidos no biotério *ad libitum*, por 22 dias.

Grupo Lesão (GL) (n=8): o músculo gastrocnêmio direito (MGD) foi submetido à contusão no 1º dia, como descrito por Minamoto et al. (2001) e os ratos mantidos no biotério *ad libitum*, não sendo submetidos a nenhum outro procedimento, por 22 dias.

Grupo Lesão + UST (GLUS, n=8): o MGD foi submetido à contusão no 1º dia (MINAMOTO et al., 2001) e 72h após foi iniciada a aplicação do UST pulsado 50%, com intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$ (PIEDADE et al., 2008) durante 5 min, na área de lesão pré-determinada e limitada com pincel atômico, para que todas as aplicações fossem realizadas no mesmo local. Este grupo recebeu 5 aplicações, isto é, uma aplicação por dia, durante 5 dias consecutivos, sempre no mesmo horário do dia (pela manhã).

Grupo Lesão + Alongamento (GLA, n=8): foi realizada a contusão do MGD. No 10º dia foi iniciado o alongamento manual passivo do MGD, de acordo com o seguinte protocolo: cada alongamento manual passivo foi mantido por 30s cada repetição, com 30s de repouso entre cada repetição (POLIZELLO et al., 2009), 4 repetições

(TAYLOR et al., 1990), 1 vez por dia, diariamente, 5 vezes por semana, de segunda à sexta-feira, por 2 semanas, isto é, até o 21º dia do experimento, totalizando 10 aplicações.

Grupo Lesão + UST + Alongamento (GLUSA, n=8): foi realizada a contusão do MGD e 72h após foi iniciada a aplicação do UST durante 5 dias consecutivos e no 11º dia iniciou-se o alongamento como para o GLA.

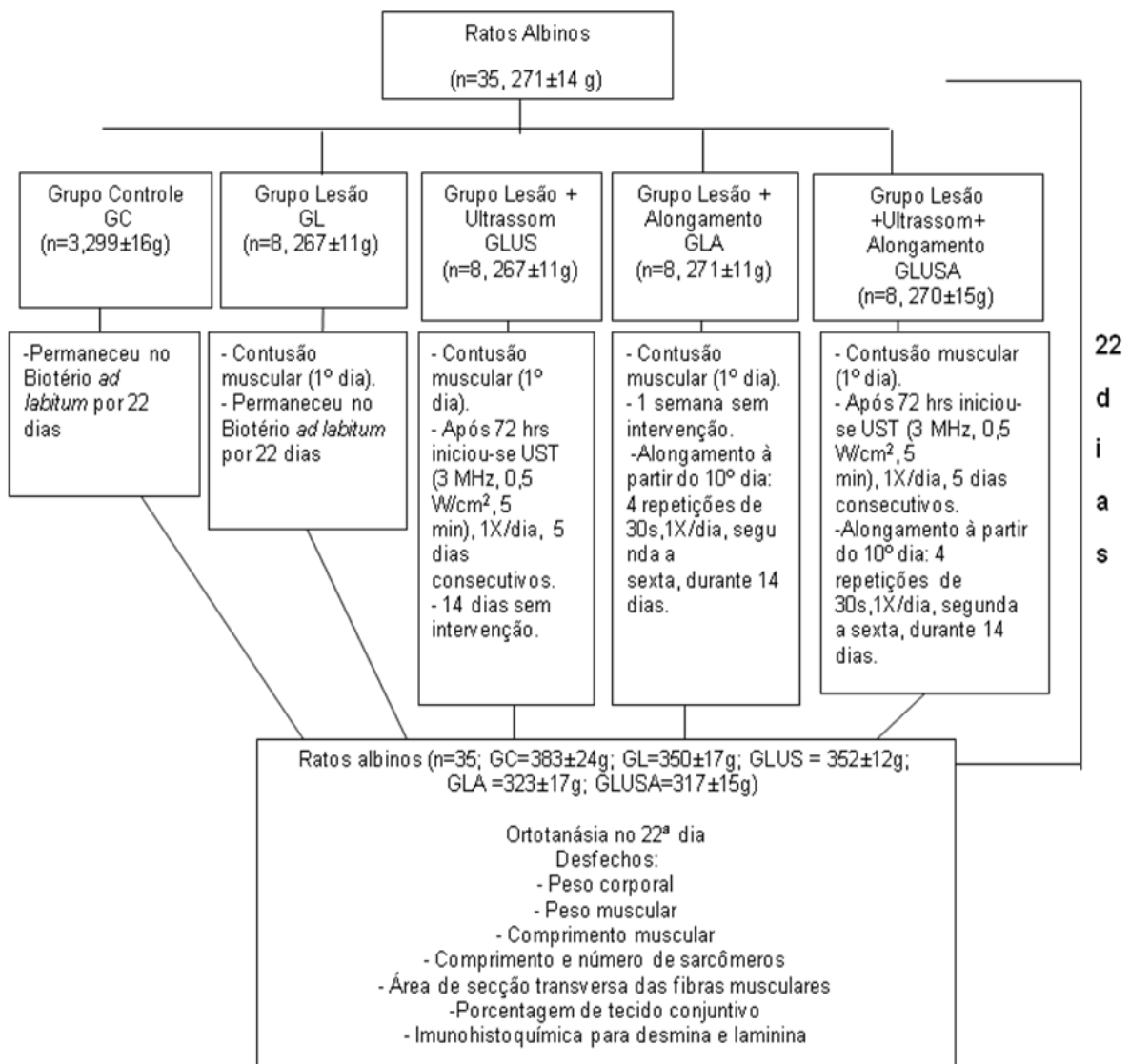


FIGURA 16- Fluxograma do experimento- Parte II

Neste estudo não houve perda amostral em nenhum grupo experimental.

Após os protocolos experimentais descritos acima, no 22º dia, os animais de todos os grupos foram anestesiados e os músculos gastrocnêmios, de ambas as patas, retirados e processados para avaliação do peso e comprimento muscular, da

área de secção transversa muscular (ASTFM), contagem do número de sarcômeros em série, estimativa do comprimento dos sarcômeros, análise da porcentagem de colágeno e da quantidade de desmina e laminina.

9.1 PROTOCOLO PARA PROMOVER A CONTUSÃO MUSCULAR

O protocolo para contusão muscular foi o mesmo descrito na parte I.

9.2 PROTOCOLO PARA A TERAPIA POR UST

A aplicação do UST foi realizada por duas pessoas (sempre as mesmas): uma para aplicar o aparelho e outra para imobilizar o animal, já que o mesmo não estava sob efeito anestésico durante o procedimento. O animal foi posicionado em decúbito dorsal, com suas patas dianteiras imobilizadas. Para aplicar o ultrassom, a pata traseira direita foi posicionada em extensão de joelho e dorsiflexão da articulação tíbio-társica à 90°. As aplicações do UST nos grupos GLUS e GLUSA foram iniciadas 72h após a contusão do MGD, com a área a ser tratada previamente tricotomizada e demarcada com pincel atômico. A aplicação do UST foi paralela ao ventre da porção medial do MGD e o meio de contato entre o cabeçote e a pele do animal foi o gel (*ISP*). Movimentos circulares do cabeçote foram realizados para prevenir a formação de ondas estacionárias. A área efetiva de radiação (ERA) do cabeçote foi de 1 cm² (FIGURA 17).



FIGURA 17- Aplicação do ultrassom no músculo gastrocnêmio direito. Seta : UST- aplicação do ultrassom terapêutico. Asterisco- músculo gastrocnêmio

O aparelho utilizado foi o Sonopulse especial (*Ibramed*) (FIGURA 18), com frequência de 1 MHz, com pulsos de 5 ms de duração repetidos na frequência de 100 Hz na proporção 1:1 (ciclo de 50%), intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$ e tempo de aplicação de 5 min. A relação não uniforme do feixe (BNR) era menor que 6. A determinação da intensidade $0,5 \text{ W/cm}^2$ está baseada no estudo de Piedade et al. (2008) o qual observaram melhora no processo de regeneração do tecido muscular de ratos após contusão muscular. O equipamento foi adquirido no mês da realização da pesquisa e a calibração, por se tratar de um equipamento novo, vem garantida pela fábrica por 1 ano. A aplicação do UST foi realizada no laboratório de Fisiologia das Faculdades Integradas do Brasil (Unibrasil).



FIGURA 18- Aparelho de ultrassom e o cabeçote utilizados

9.3 PROTOCOLO PARA O ALONGAMENTO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO

O protocolo é o mesmo descrito na parte I.

9.4 ORTOTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS MÚSCULOS

Os animais de todos os grupos foram anestesiados, com Ketamina (95 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg) intraperitoneal, para a retirada de ambos os músculos gastrocnêmios. Durante a dissecação, os músculos foram periodicamente gotejados com solução salina (NaCl 0,9%), para evitar ressecamento tecidual. Em seguida e

ainda sob efeito anestésico, os animais foram submetidos a ortotanásia com overdose anestésica de Ketamina e Xylazina.

Cada músculo foi pesado isoladamente em uma balança analítica (*Bioprecisa*) (FIGURA 19) e após foi estendido em uma superfície plana, fixo em posição de repouso, sendo esse comprimento considerado L_0 , como descrito por Ansved (1995) e mensurado seu comprimento por meio de um paquímetro (*Tecnolub*) (FIGURA 20).



FIGURA 19- Pesagem do músculo na balança. Asterisco- músculo gastrocnêmio



FIGURA 20- Mensuração do comprimento muscular com o paquímetro. Seta- músculo gastrocnêmio; Asterisco- medida realizada pelo paquímetro digital.

Após, os músculos gastrocnêmios foram divididos longitudinalmente ao meio por meio de uma lâmina de bisturi (*Solidor*). A porção lateral foi descartada e a porção medial foi dividida novamente ao meio, longitudinalmente (FIGURA 21). Uma metade (a lateral) da porção medial foi fixada em glutaraldeído (2,5%) e em seguida submetida aos procedimentos de rotina para avaliação do número de sarcômeros em série, como descrito por Williams e Goldspink (1971). A outra metade (a medial) foi fixada em solução de formalina 10% para posterior análise morfológica, da área

de secção transversa das fibras musculares, análise do colágeno e imunohistoquímica. Todos esses procedimentos estão descritos na sequência.

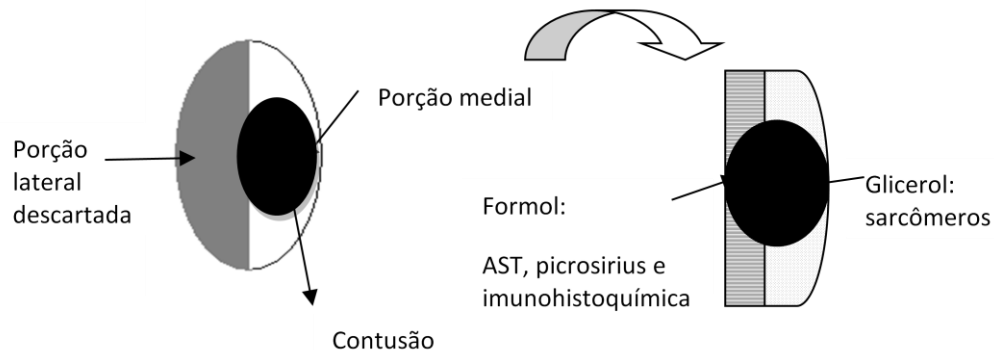


FIGURA 21- Desenho esquemático da divisão do músculo gastrocnêmio (MG) para posterior análise histomorfológica. ● área de contusão; área cinza- porção lateral do MG; área branca- porção medial do MG. ▨ porção medial do gastrocnêmio medial; porção lateral □ gastrocnêmio medial

A escolha da porção medial foi devido à contusão ter sido realizada nessa área. Além disso, segundo Bennett et al. (1988), o músculo gastrocnêmio medial não apresenta subdivisões, sendo formado por uma cabeça única, justificando a escolha para este estudo.

A retirada e pré-processamento dos músculos foram realizados no laboratório de Fisiologia das Faculdades Integradas do Brasil.

9.5 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

9.5.1 Parafinização do Material (MICHALANY, 1998)

A metade medial do ventre do músculo gastrocnêmio (porção medial) foi fixada em formalina 10% durante 72h. Após, a peça foi fragmentada com navalha em 3 partes iguais no sentido transversal e colocadas em um cassete. Posteriormente os fragmentos foram desidratados e diafanizados, seguindo o protocolo: álcool 70%, 80%, 90%, 100%, 100% e 100% por 1h cada álcool; e xilol (I e II) por 1h cada um e por fim parafina líquida I, II e II por 1h cada. Esses procedimentos foram realizados automaticamente pelo aparelho *Leica* TP 120. Posteriormente, o material foi incluído em parafina utilizando o inclusor *Leica* EG 1160.

Finalizada a inclusão, o material foi seccionado transversalmente em micrótomo (*Leica*), em 4 μm , e os cortes foram posteriormente transferidos para lâminas histológicas (*Starfrost®Sakura 76 X26 mm*). Esse processo foi realizado no laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em Curitiba-PR.

9.5.2 Coloração dos Cortes Transversais com Hematoxilina e Eosina-HE (MICHALANY, 1998).

As lâminas, contendo os cortes transversais do músculo gastrocnêmio, foram desparafinizadas por 3 vezes, em solução de xilol 100 % por 5 min cada vez. Em seguida foram mergulhadas em álcool absoluto, 3 vezes por 1 min cada. Após foram mergulhadas em água de torneira por 5 min.

As lâminas foram deixadas por 8 min na Hematoxilina de Harris (Biotec) e em seguida lavadas em água de torneira. Após, foram deixadas imersas em água por 5 min e em seguida deixadas por 5 min na eosina (0,25 g de eosina amarela em pó diluída em 100 ml de água destilada).

Na sequência, as lâminas foram lavadas em água de torneira e deixadas por 1 min em álcool 95%. Posteriormente, as lâminas passaram por 3 ciclos de álcool absoluto com duração de 1 min cada ciclo. Em seguida as lâminas passaram por 3 ciclos de xilol com duração de 1 min cada ciclo. Ao término das etapas descritas acima, foram adicionadas lamínulas (*Solidor*, 24 X 60 mm) às lâminas, fixadas com *Entellan* (*Merck*). Esse processo foi realizado no laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em Curitiba-PR.

9.5.3 Análise da área de secção transversa das fibras musculares- ASTFM (Histomorfometria) (GOMES et al., 2004; TORRES et al., 2009)

As fotomicrografias foram realizadas em fotomicroscópio de luz (Olympus BX 50), na objetiva de 20X, de lâminas histológicas com cortes transversais (8 μm) corados com HE. Em cada lâmina continham 4 cortes e destes foram fotografados 3 fotos do 1º corte, 3 do 2º, 2 do 3º e 2 do 4º corte, da direita para a esquerda e de cima para baixo do corte, totalizando 10 fotos. As fotos foram realizadas no

laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em Curitiba-PR.

Foram considerados os seguintes critérios para eleição da região fotografada:

- áreas contendo apenas fibras musculares;
- áreas sem artefatos de navalha ou depósitos de reagentes ou poeiras;
- áreas com predominância de núcleos centralizados.

Para mensuração da área de secção transversa das fibras musculares (ASTFM), 100 fibras musculares foram selecionadas aleatoriamente na região central da secção histológica de acordo com os critérios acima descritos (COUTINHO et al., 2004). A ASTFM foi mensurada através do programa de imagem *Pro Plus 4.0*, com a ferramenta (*create tracing*), sendo a unidade de medida micrômetro quadrado (μm^2) (FIGURA 22). Foi realizada a média aritmética final (μm^2) referente às 100 fibras mensuradas, de cada músculo gastrocnêmio da pata direita e da pata esquerda, de cada rato.

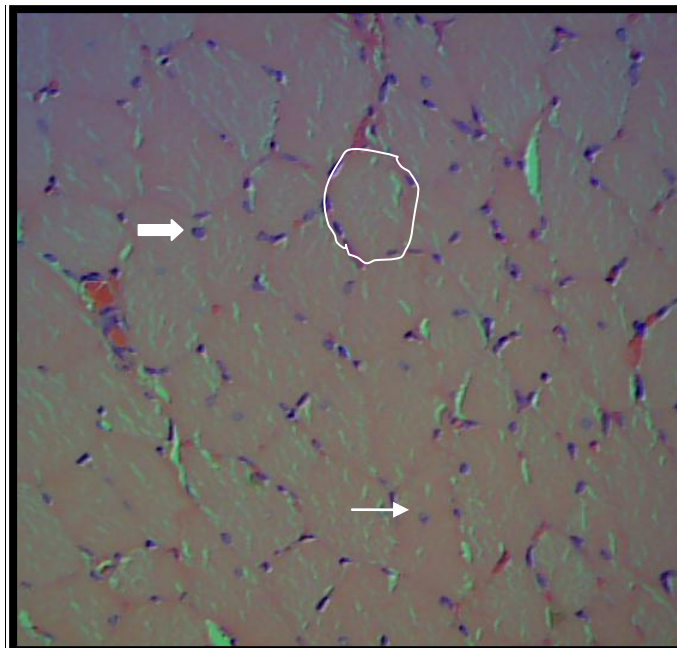


FIGURA 22– Corte histológico transversal do músculo gastrocnêmio para mensuração da ASTFM por meio do programa *IMAGE PRO PLUS 4.0*. Seta larga (\Rightarrow): núcleo periférico da fibra muscular; seta fina (\rightarrow): núcleo centralizado da fibra muscular; asterisco (*):fibra muscular; contorno na cor branca: representa delineamento para mensuração da área de secção transversa da fibra muscular (ASTFM).

9.5.4 Coloração com *Sirius Red* (MICHALANY, 1998)

As lâminas histológicas contendo os cortes transversais do músculo gastrocnêmio foram desparafinizadas por 3 vezes no xilol por 5 min cada. Após, foram imersas em álcool absoluto 3 vezes por 1 min cada. Em seguida mergulhadas em água de torneira por 5 min. Depois foram coradas pela solução de Picrosirius (0,3% diluídos em águas destilada) por 60 min e em seguida lavadas em água destilada por 30s.

Após foram coradas com Hematoxilina de Harris por 10 min. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água de torneira e deixadas por 1 min em álcool 95%. Posteriormente, as lâminas passaram por 3 ciclos de álcool absoluto com duração de 1 min cada ciclo. Em seguida as lâminas passaram por 3 ciclos de xilol (100%) com duração de 1 min cada ciclo. Ao término das etapas descritas acima, as lamínulas foram adicionadas às lâminas por meio de fixação com *entellan* (Merck). Esse processo foi realizado no laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em Curitiba-PR.

9.5.5 Análise do tecido conjuntivo (BIONDO-SIMÕES et al., 2005)

As fotomicrografias foram realizadas em fotomicroscópio de luz (*Olympus BX 50*), na objetiva de 20X, em lâminas histológicas contendo cortes transversais de 8 µm, corados com *Sirius Red*. Foram realizadas 10 fotos seguindo os mesmos critérios utilizados na fotomicrografia da ASTFM. Para a polarização foi colocada uma lente de polarização (*Olympus U-Pol*). Primeiramente a imagem era focalizada, em seguida era encontrada a polarização através do manuseio da lente para identificação das cores vermelha e verde, as quais representavam os colágenos maduro (Tipo I) e imaturo (Tipo III) do endomísio e perimísio, respectivamente. As análises foram realizadas em microscópio de luz polarizada (*BX50 da Olympus®*), acoplado a um computador (*Dell*), com o programa *Image-Plus 4.0*, no laboratório de Patologia da PUC-PR, em Curitiba-PR.

Para a quantificação da porcentagem de colágeno, inicialmente foi realizada a calibração do programa *Image Pro-Plus 4.0* na objetiva de 20X. Anteriormente a quantificação, foi escolhida uma imagem já polarizada para estabelecer o padrão das cores vermelha e verde pelo programa, as quais foram quantificadas em todas

as imagens. Esta imagem foi considerada uma “máscara” a qual foi sobreposta a todas as outras imagens para identificação das cores determinadas. Após a sobreposição da “máscara” em cada imagem, o programa calculava a porcentagem das cores vermelhas e verde, as quais correspondiam aos colágenos maduro (Tipo I) e imaturo (Tipo III) do endomísio e perimísio, respectivamente (BIONDO-SIMÕES et al., 2005) (FIGURA 23).

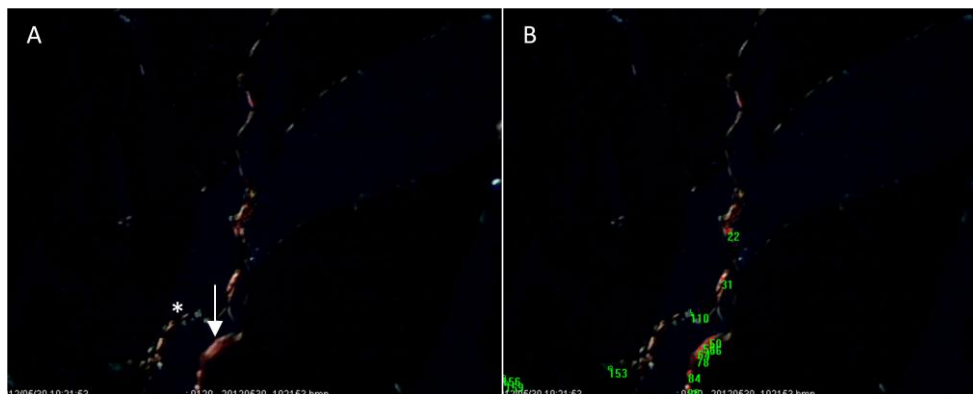


FIGURA 23- Lâminas com cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio coradas com *SIRIUS RED*. A- imagem demonstra o corte transversal do músculo gastrocnêmio, corado com *SIRIUS RED*. Seta branca mostra a área corada em vermelho, identificando o colágeno tipo I-maduro e o asterisco a área em verde, correspondendo ao colágeno tipo III- imaturo. A- imagem demonstra a fotomicrografiado corte transversal do músculo gastrocnêmio sobreposto pela “máscara”. Os números representam os valores das áreas demarcadas nas cores vermelha e verde, identificadas pelo programa.

9.6 IDENTIFICAÇÃO DO NÚMERO E COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS EM SÉRIE (GOMES et al., 2004)

O protocolo para identificação do número e comprimento dos sarcômeros em série foi o mesmo descrito na parte I.

9.7 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA (WAKAMATSU et al., 1995)

A análise imunohistoquímica foi realizada no laboratório de Patologia da PUC-PR. Primeiramente foram identificados no microscópio de luz e delimitados com caneta os cortes histológicos transversais com núcleos centralizados para identificar as áreas de lesão.

Esses cortes foram retirados do bloco para confecção de um novo bloco multiamostrado ou também chamado de *Tissue Microarray Artesanal* (TMA). Esta técnica consiste na montagem de blocos de parafina com múltiplas amostras, para confecção de lâminas histológicas multiamostradas a fim de realizar técnicas imunohistoquímicas em vários tecidos de uma só vez, barateando o custo do material utilizado. Cada bloco amostral continha um grupo experimental, contendo 16 amostras (cortes), previamente selecionados. Para que as amostras de TMA fossem posteriormente localizadas no bloco-receptor (FIGURA 24), conforme sua identificação inicial foi confeccionado um mapa que serviu de apoio, do tipo plano cartesiano, onde as colunas foram identificadas com as letras A, B, C e D, e as linhas com números de 1 a 4 (FIGURA 25). Todos os grupos foram organizados da mesma forma.

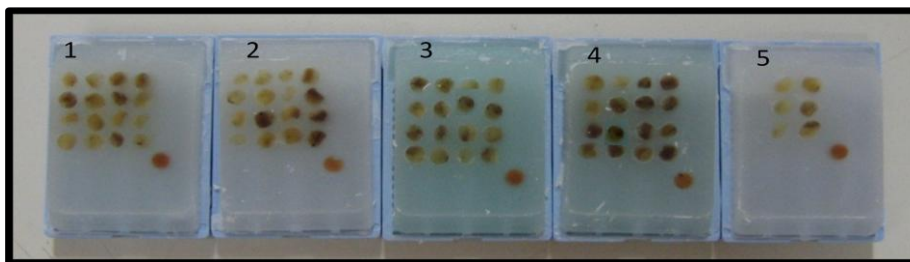


FIGURA 24- Blocos receptores amostrais. 1-Grupo Lesão; 2- Grupos Lesão + Alongamento; 3- Grupo Lesão + Ultrassom; 4- Grupo Lesão + UST + Alongamento; 5- Grupo Controle. Círculo Vermelho: corte retirado do material emblocado inicialmente.

	A	B	C	D
1	1D	1E	2D	2E
2	3D	3E	4D	4E
3	5D	5E	6D	6E
4	7D	7E	8D	8E

FIGURA 25- Mapeamento do bloco amostral. Os números 1,2,3,4, 5, 6, 7, 8 seguidos das letras D e E correspondem ao número dos ratos. D: pata direita; E: pata esquerda.

Essas amostras emblocadas foram cortadas no micrótomo (*Leica RM 2145*) a 4 μ m e em seguida foram aderidos nas lâminas (*AutoWrite Green Adesin Sakura 76 X 26 mm*). Após foi feita a secagem das lâminas *overnight* a 60° C em estufa (*Orion-modelo 502*). Posteriormente foi realizada a desparafinização, usando xilol 100% em

temperatura ambiente (2 vezes de 10 min); álcool etílico absoluto (3 vezes de 1 min); álcool etílico 80% (1 vez de 1 min).

Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (peróxido diluído em metanol). Logo após foi lavado em água destilada.

Em seguida foi efetuada a recuperação antigênica: sendo as lâminas mergulhadas em recuperador *ImunoRetriver* (Dako®), em cuba de banho-maria (*Ancap*), à 98° C, por 40 min.

Após, foram deixadas esfriar à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, e, lâmina por lâmina foi riscada com caneta hidrofóbica *Dako pen* (Dako®), delimitando a área do corte.

Ainda, as lâminas permaneceram em tampão PBS (tampão fosfato-salino) tris pH 7.3, até que as alíquotas de anticorpo fossem gotejadas, evitando a secagem do corte.

As alíquotas (100 µl) das soluções dos anticorpos desmina (*Dako*) e laminina (*Dako*) foram gotejadas sobre os cortes e levadas em câmara úmida (*Easy path*) à geladeira (*Consul*) *overnight* (FIGURA 26).



FIGURA 26- Câmara úmida contendo os cortes histológicos com o anticorpo. Seta-câmara úmida na geladeira.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em tampão PBS tris pH 7.3 e deixadas no tampão por 15 min. Novamente foram lavadas em tampão, secadas levemente com uma toalha e foi gotejado *Advance link* (Dako®) e deixado por 30 min. Em seguida, foram lavadas em tampão e foi gotejado *Advance enzyme* (Dako®) e deixado por 30 min. Essas soluções destinam-se ao uso com os

anticorpos primários fornecidos pelo utilizador para potencializar a identificação qualitativa de antígenos por microscopia de luz normal e patológica em tecidos emblocados em parafina (Dako, 2011).

Após, foi lavado em tampão PBS tris pH 7.3, secado e gotejado na lâmina o cromógeno DAB (Diaminobenzidina) (1:1) até a visualização da cor castanha e foi lavada rapidamente em água destilada.

Na sequência, foi contracorado com Hematoxilina de Harris (*AlphaTec*) por 5 min, lavado em água da torneira e deixado por 5 min e posteriormente desidratado com álcool etílico absoluto (3 vezes de 1 min.) e diafanizado com xilol (3 vezes de 5 min). Após foi montada a lamínula (Solidor, 24 X 60 mm). Os anticorpos primários utilizados foram a desmina e a laminina e o secundário a *Streptavidin-Peroxidase* (utilizado durante a peroxidase endógena).

As lâminas dos anticorpos desmina e laminina foram analisadas por meio do método quantitativo morfométrico (KONDO et al., 2011).

Para a leitura do anticorpo laminina e desmina foram utilizados o programa *Image Pro Plus*® com o auxílio de uma câmera *Dino-eye*® e de um microscópio óptico BX50 (Olympus®) (objetiva de 40x). Os anticorpos desmina e laminina coram o filamento intermediário e a lamina basal, respectivamente, em castanho, quando positivo. Uma fotomicrografia em campo de grande aumento (400X) foi realizada de uma lâmina controle positiva. O observador forneceu ao programa uma amostra da coloração castanha considerada positiva nesta fotomicrografia da lâmina controle para permitir a quantificação da desmina e laminina pelo método da colorimetria. Esta fotomicrografia passou a ser a “máscara”, com a cor marrom para ser utilizada na leitura de todos os casos do estudo. Na sequência, o programa automaticamente identificou as áreas imuno-positivas, isto é, a tonalidade marrom padronizada, no campo selecionado, permitindo quantificar a área de desmina e laminina. Para cada caso foram fotografados 10 campos da esquerda para a direita e de cima para baixo, de cada lâmina histológica, de cada gastrocnêmio, de cada rato, de todos os grupos experimentais.

Para quantificação da área da proteína desmina e laminina foi selecionado um campo (200 x 200 μm^2) no programa *image pro plus* da lâmina histológica, contendo somente fibras musculares e, sobre esse foi sobreposto a “máscara” inicialmente construída (FIGURAS 27 e 28). A partir desta sobreposição o programa fez automaticamente a leitura da totalidade da área imunopositiva em μm^2 . Inicialmente

foram feitas 10 fotomicrografias, de cada amostra de cada bloco, ou seja, de cada rato, de cada grupo, do gastrocnêmio direito e esquerdo. Sendo ao final selecionadas 5 imagens que continham menos artefatos e maior quantidade de fibras. Consideraram-se artefatos depósitos de reagentes ou poeiras, fibras dobradas, rasgadas ou mal focalizadas.

Após a leitura das 5 imagens selecionadas, foi realizada uma média aritmética das áreas mensuradas em cada uma das lâminas.

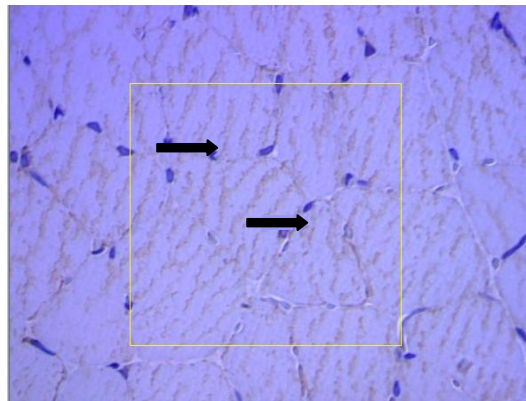


FIGURA 27- Fotomicrografia de cortes histológicos transversais do gastrocnêmio com reação imunohistoquímica para desmina. Quadrado na cor amarela - demarcação da área ($200 \times 200 \mu\text{m}^2$) para ser mensurada pelo programa. Seta - região na cor castanha imunopositiva para desmina.

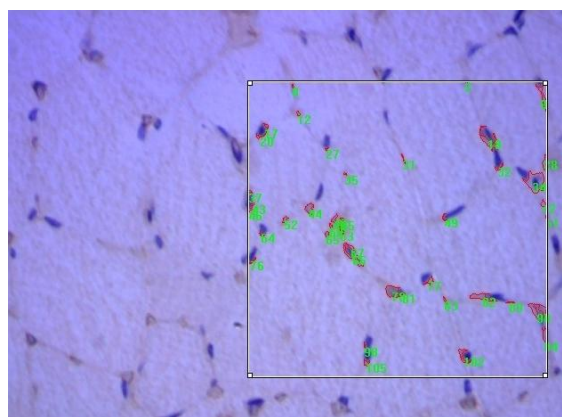


FIGURA 28- Imunohistoquímica para laminina. quadrado preto - delimitação do campo $200 \times 200 \mu\text{m}^2$. Números - região imunopositiva para laminina detectados pelo programa após a aplicação da máscara.

9.8 ANÁLISES DOS RESULTADOS

Para avaliar a normalidade e a homoscedasticidade foram realizados os testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As estatísticas descritivas para os resultados paramétricos e não paramétricos estão expressas como a média±desvio padrão. As variáveis: peso corporal; peso muscular; comprimento muscular; número e comprimento dos sarcômeros; área da secção transversa das fibras musculares (ASTFM); porcentagem de colágeno maduro (Tipo I) e imaturo (Tipo III) e a área imunopositiva para desmina e laminina, foram avaliadas pela comparação entre os resultados obtidos no músculo gastrocnêmio da pata direita (lesada e/ou tratada com alongamento) e esquerda (intacta), e entre o peso corporal inicial e final, em cada grupo experimental (intragrupo). As comparações intergrupos e intragrupos foram realizadas por meio da ANOVA *one way post hoc Tukey unequal HSD* para valores paramétricos e quando não paramétricos foi usado o *Kruskall Wallis*. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

10 RESULTADOS

10.1 PESO CORPORAL

Os testes Levene e Shapiro-Wilk para essa variável determinaram homoscedasticidade ($p=0,04$) e normalidade ($p= 0,04$) dos resultados. Portanto, os dados foram considerados paramétricos, sendo utilizado a ANOVA *post hoc Tukey unequal HSD*. Foi encontrado aumento significativo entre o peso corporal inicial e o final em todos os grupos ($p < 0,001$). Em relação ao peso absoluto, o peso corporal final do GL foi maior que o GLUSA ($350 \pm 18g$ vs $318 \pm 16g$, $p=0,000$), o GLUS foi maior que o GLUSA ($352 \pm 19g$ vs $318 \pm 16g$, $p=0,000$) e o GC foi maior que o GLA e o GLUSA ($383 \pm 24g$ vs $323 \pm 18g$ e $318 \pm 16g$, $p=0,000$). Na diferença relativa, entre os pesos iniciais e finais, foi verificado ganho significativo entre GL e GLA (31 vs 19%, $p=0,000$); GL e GLUSA (31% vs 17%, $p=0,000$); GLUS e GLA (32% vs 19%, $p=0,00$) e GLUS e GLUSA (32% vs 17%, $p=0,000$) (TABELA 2).

TABELA 2– Efeitos do UST e/ou alongamento no peso corporal dos ratos.

Grupos	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Diferença Relativa (%)	P ANOVA
GL	267±11	350±18* [#]	31±7†	0,000
GLUS	267±11	352±19* ⁺	32±10 [†]	0,000
GLA	271±11	323±18*	19±8	0,000
GLUSA	270±14	318±16*	17±3	0,000
GC	299±16	383±24* [§]	28±6	0,000

GL= grupo lesão; GLUS= grupo lesão + ultrassom; GLA= grupo lesão + alongamento; GLUSA= grupo lesão + UST + alongamento; GC= grupo controle. . Os resultados estão descritos como a média±desvio padrão. * comparado com o peso corporal inicial [#] comparado com GLUSA (p=0,000), ⁺comparado com GLUSA (0,000, ANOVA), [§]comparado com GLA (p=0,001, ANOVA) e com GLUSA (0,001, ANOVA). [†]comparado com GLA (p=0,000) e GLUSA; [†] (p=0,000) comparado com GLA e GLUSA. Média±desvio padrão.

10.2 PESO MUSCULAR

Os testes de Levene e Shapiro-Wilk revelaram que os resultados do peso muscular apresentaram homoscedasticidade (p=0,00) e normalidade (p=0,05). Assim, os dados foram considerados paramétricos e as comparações entre os grupos foram feitas por meio do teste ANOVA *post hoc Tukey unequal HSD*. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa comparando-se o peso muscular do gastrocnêmio direito e esquerdo e também na comparação intergrupos (p>0,05) (FIGURA 29).

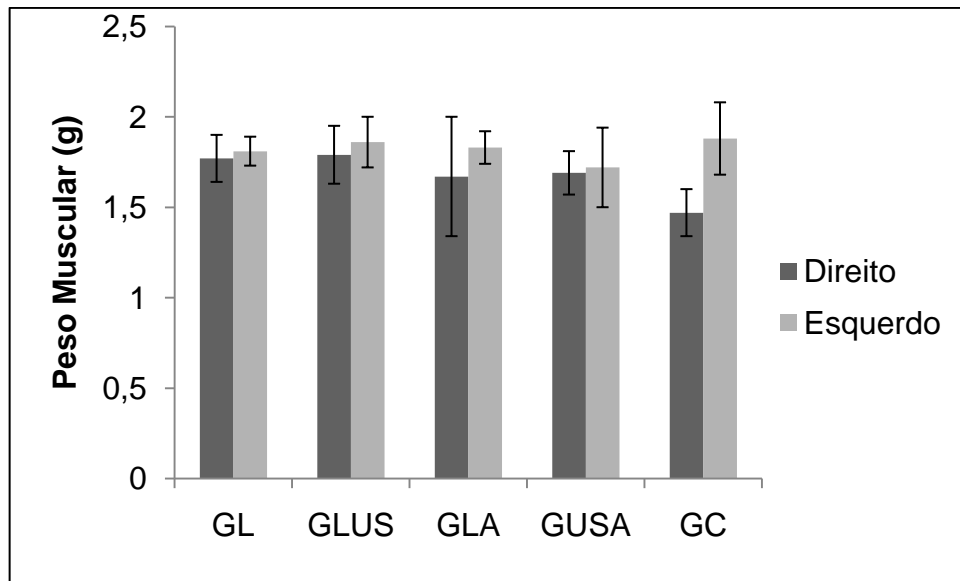


FIGURA 29- Efeitos do alongamento e/ou UST no peso muscular do gastrocnêmio dos ratos. GL= Grupo Lesão; GLUS= Grupo Lesão + Ultrassom; GLA= Grupo Lesão + Alongamento; GLUSA= Grupo Lesão + UST + Alongamento; GC= Grupo Controle. Os resultados estão representados como a média±desvio padrão.

10.3 COMPRIMENTO MUSCULAR DO GASTROCNÊMIO

O comprimento muscular não apresentou homoscedasticidade segundo o teste Levene ($p < 0,05$). Portanto os dados foram considerados não paramétricos e a comparação entre grupos foram feitas por meio do teste *Kruskal-Wallis*. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa comparando-se o comprimento muscular do gastrocnêmio direito e esquerdo e também na comparação intergrupos ($p > 0,05$) (FIGURA 30).

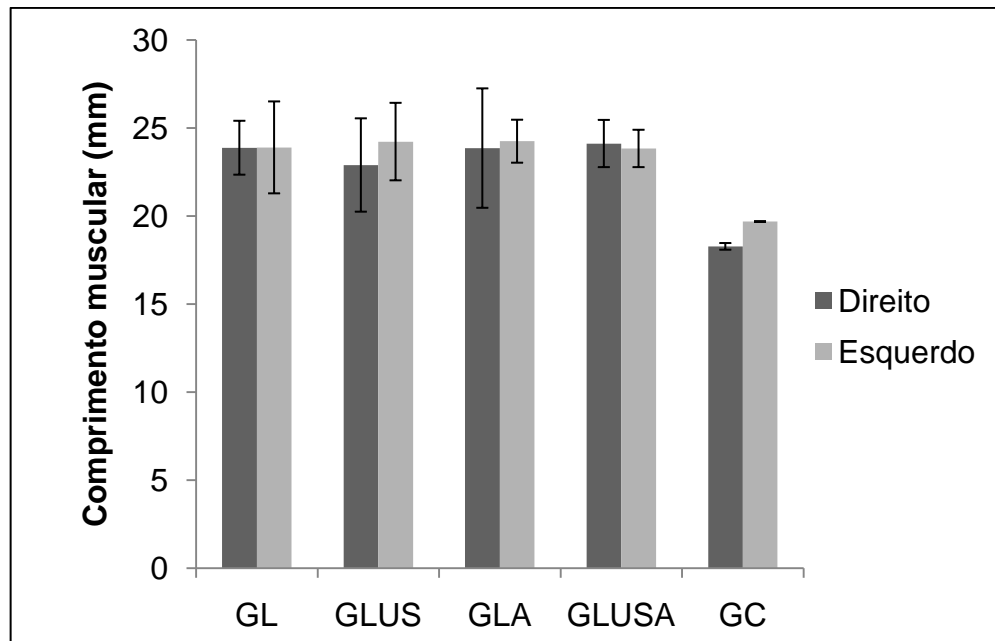


FIGURA 30- Efeitos do alongamento e/ou UST no comprimento muscular do gastrocnêmio dos ratos. GL= Grupo Lesão; GLUS= Grupo Lesão + Ultrassom; GLA= Grupo Lesão + Alongamento; GLUSA= Grupo Lesão + UST + Alongamento; GC= Grupo Controle. Os resultados estão expressos como a média±desvio padrão.

10.4 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE (ENSS)

A ENSS do músculo gastrocnêmio direito e esquerdo apresentou normalidade ($p=0,02$) e homoscedasticidade ($p=0,03$), logo, foi realizado o teste ANOVA *post hoc* *Tukey unequal HSD*. Na comparação entre grupos foi encontrado aumento significativo entre GLUSA do lado direito em relação ao lado esquerdo (8811 ± 648 vs 7396 ± 394 , $p=0,001$, ANOVA).

a comparação intergrupos foi detectado aumento significativo da ENSS do gastrocnêmio direito entre os grupos: GLA e GLUS (8479 ± 276 vs 6856 ± 1133 , $p=0,001$); GLUSA e GLUS (8811 ± 648 vs 6856 ± 1133 , $p=0,001$) e GLUSA e GC (8811 ± 648 vs 6615 ± 233 , $p=0,000$) (FIGURA 31).

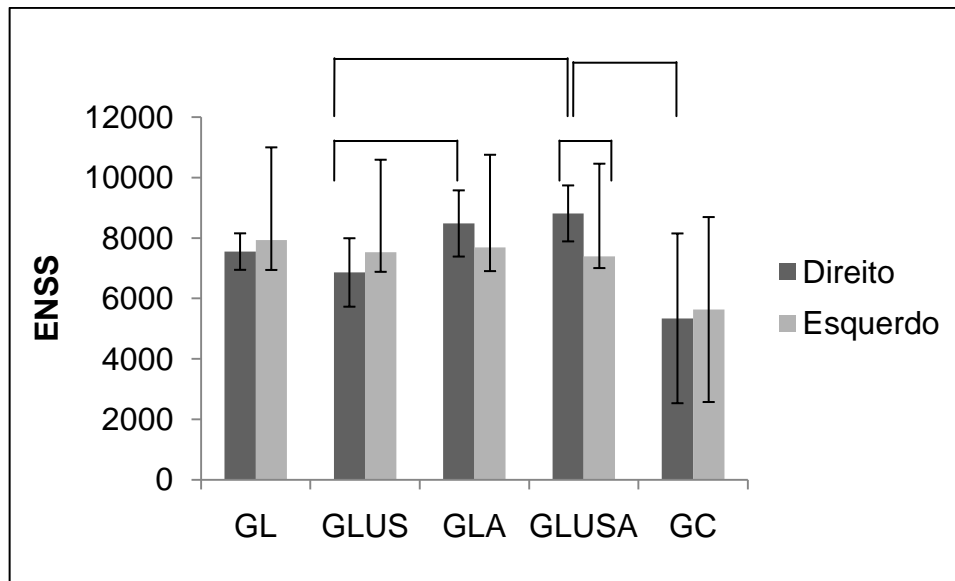


FIGURA 31- Efeitos do alongamento e/ou UST na estimativa do número de sarcômero em série (ENSS) do músculo gastrocnêmio dos ratos. GL= Grupo Lesão; GLUS= Grupo Lesão + Ultrassom; GLA= Grupo Lesão + Alongamento; GLUSA= Grupo Lesão + UST + Alongamento; GC= Grupo Controle. Os resultados estão representados como a média±desvio padrão.*comparado com o lado esquerdo ($p=0,001$). + comparado com o lado direito do GLUS ($p= 0,001$). # comparado com o lado direito do GLUS ($p=0,001$).## comparado com o lado direito do GC ($p=0,000$).

10.5 COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS

Nesta variável foi encontrada homoscedasticidade ($p=0,21$) e normalidade ($p=0,23$), sendo realizado a ANOVA *post hoc Tukey unequal HSD*. Comparando-se o lado direito e esquerdo no GLA, foi detectado que o lado esquerdo apresentou comprimento dos sarcômeros maior que o direito ($3,2\pm 0,1$ vs $2,7\pm 0,4$ μm $p= 0,001$, ANOVA). Na comparação intergrupos foi encontrada diferença no gastrocnêmio direito entre o GLUS e GLA ($3,2\pm 0,4$ vs $2,7\pm 0,4$ μm , $p=0,001$, ANOVA) (FIGURA 32).

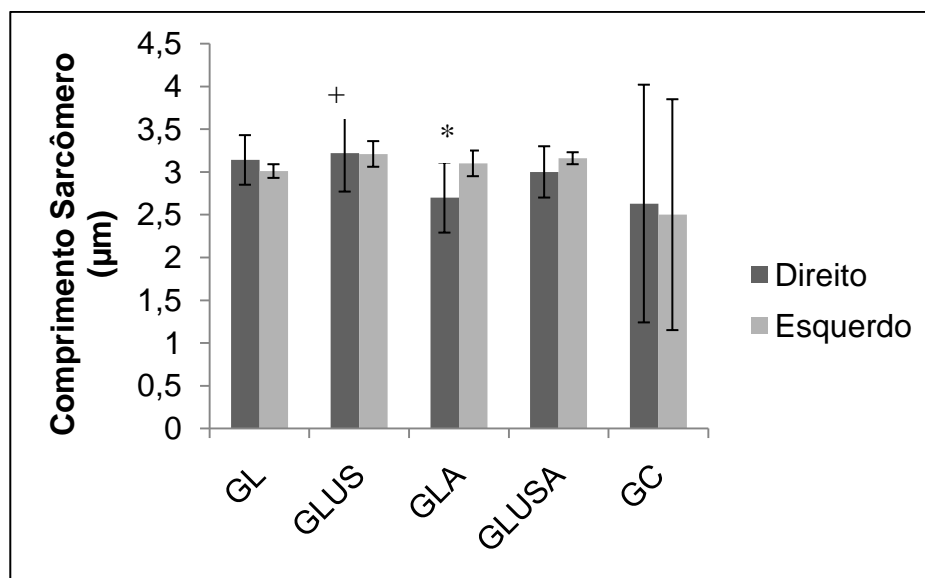


FIGURA 32- Efeitos do alongamento e/ou UST no comprimento do sarcômero do músculo gastrocnêmio dos ratos. GL= Grupo Lesão; GLUS= Grupo Lesão + Ultrassom; GLA= Grupo Lesão + Alongamento; GLUSA= Grupo Lesão + UST + Alongamento; GC= Grupo Controle. Os resultados estão apresentados como a média±desvio padrão. * comparado com o gastrocnêmio esquerdo ($p=0,001$). + comparado com o gastrocnêmio direito do GLA ($p= 0,001$). Média±desvio padrão.

10.6 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES (ASTFM)

Nessa variável os dados foram considerados homogêneos e normais através do teste de Levene ($p=0,06$) e Shapiro ($p=0,09$), portanto foi aplicado o teste ANOVA *post hoc Tukey unequal HSD*. Foi encontrada maior área de secção transversa das fibras musculares do gastrocnêmio direito do GL quando comparada com o GLA (12787 ± 995 vs $8721 \pm 2341 \mu\text{m}^2$, $p= 0,000$, ANOVA) (FIGURA 33).

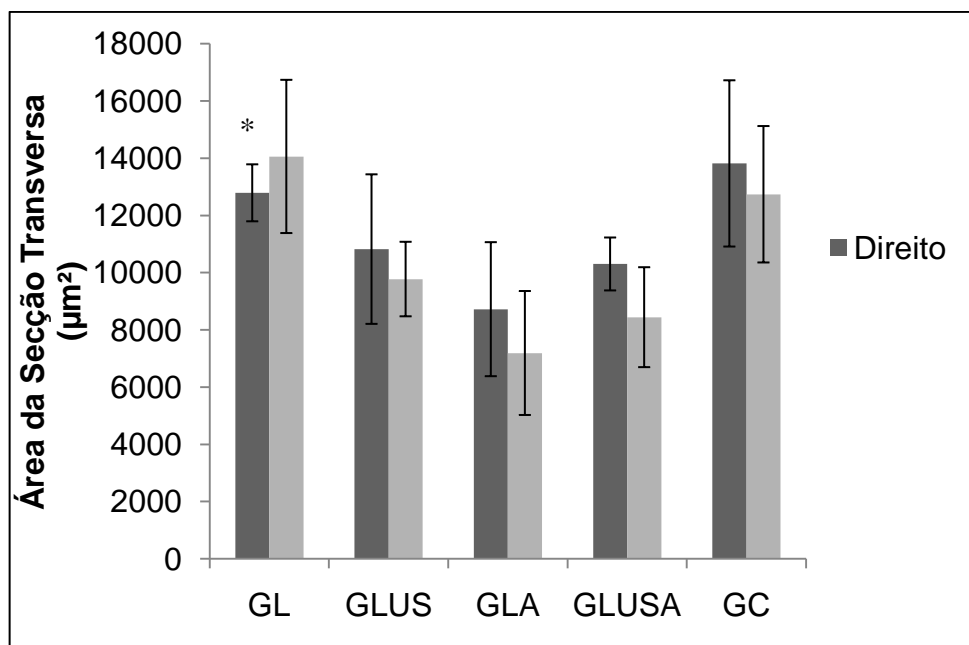


FIGURA 33- Efeitos do alongamento e/ou UST na área de seção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio dos ratos. GL= Grupo Lesão; GLUS= Grupo Lesão + Ultrassom; GLA= Grupo Lesão + Alongamento; GLUSA= Grupo Lesão + UST + Alongamento; GC= Grupo Controle. Os resultados estão demonstrados como a média±desvio padrão.*Comparado com o lado direito de GLA ($p=0,000$).

A FIGURA 34 mostra os cortes transversais das fibras em todos os grupos avaliados. Verifica-se a presença de núcleos centralizados nos grupos lesionados.

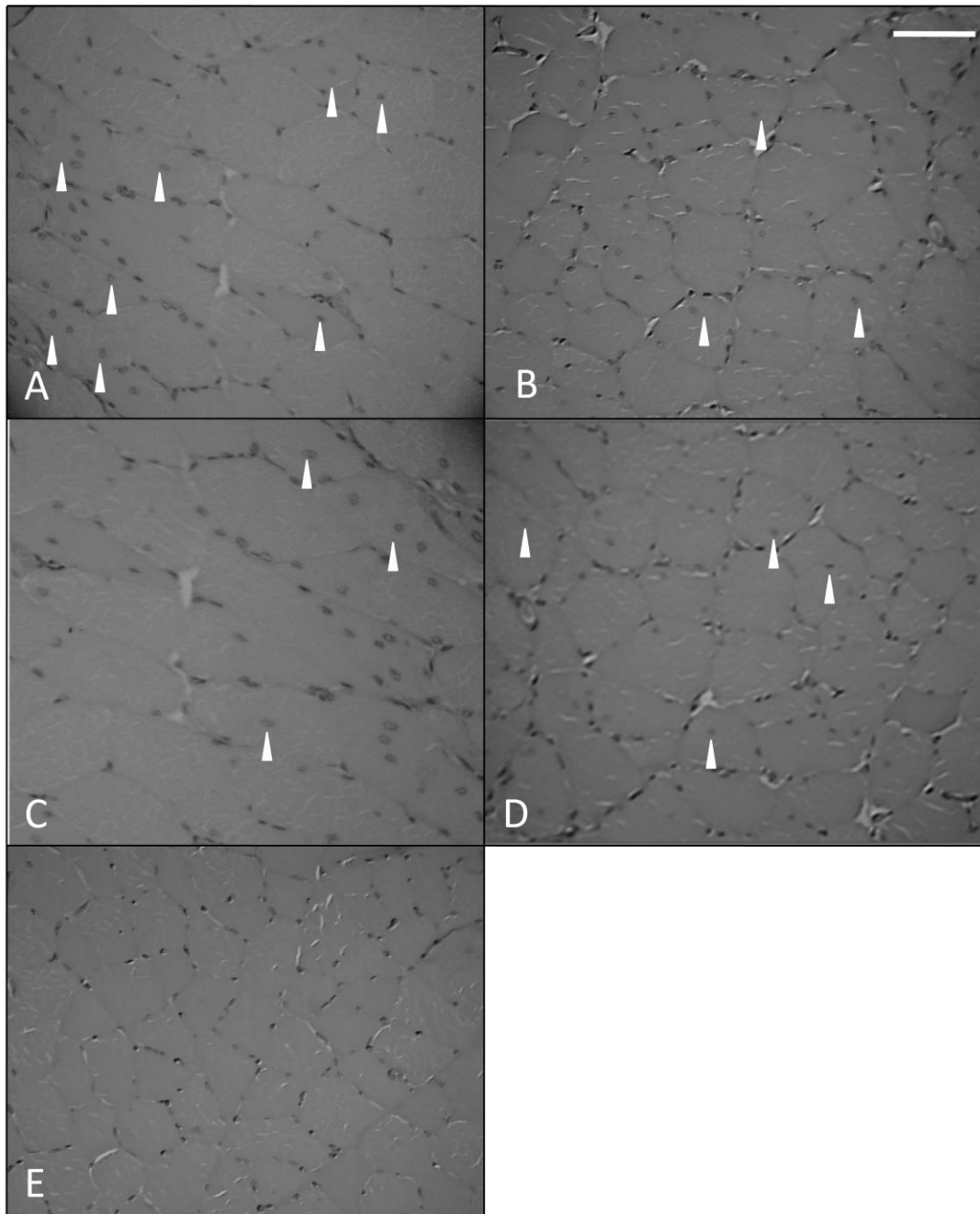


FIGURA 34- Cortes histológicos da ASTFM do músculo gastrocnêmio dos ratos. A- Grupo Lesão; B- Grupo Lesão + Ultrassom; C- Grupo Lesão + Alongamento; D- Grupo Lesão + UST + Alongamento; E- Grupo Controle. Cabeça da seta núcleo centralizado. Barra: 84 μ m para todos os painéis.

10.7 ANÁLISE DOS COLÁGENOS I (MADURO) E III (IMATURO) (*PICROSIRIUS*)

A área de ocupação do colágeno foi expressa em porcentagem, sendo dividida em porcentagem de área de colágeno maduro (vermelho) e imaturo (verde). Os dados foram considerados homogêneos ($p=0,11$) e normais ($p=0,06$) e foi aplicado o teste estatístico ANOVA *post hoc Tukey unequal HSD* para análise intergrupo e intragrupo.

Para análise intragrupo foi considerado o valor da porcentagem referente ao colágeno maduro (vermelho) e conseqüentemente a mesma análise referiu-se ao colágeno imaturo (verde), pois a soma das porcentagens é 100%. Comparando-se o lado direito e esquerdo, em cada grupo experimental, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Na análise intergrupos do MGD foi encontrado aumento significativo ($p < 0,001$, ANOVA) nas porcentagens dos colágenos maduro (I) e imaturo (III) entre os seguintes grupos: GL e GLA (40 ± 12 vs $24 \pm 14\%$, $p=0,000$); GL e GC (40 ± 12 vs $21 \pm 9\%$, $p=0,000$); GLUS e GLA (37 ± 10 vs $24 \pm 14\%$, $p=0,000$); GLUS e GC (38 ± 10 vs $21 \pm 9\%$, $p=0,000$) e GLUSA e GC ($36 \pm 12\%$ vs $21 \pm 9\%$, $p=0,000$) (FIGURA 35).

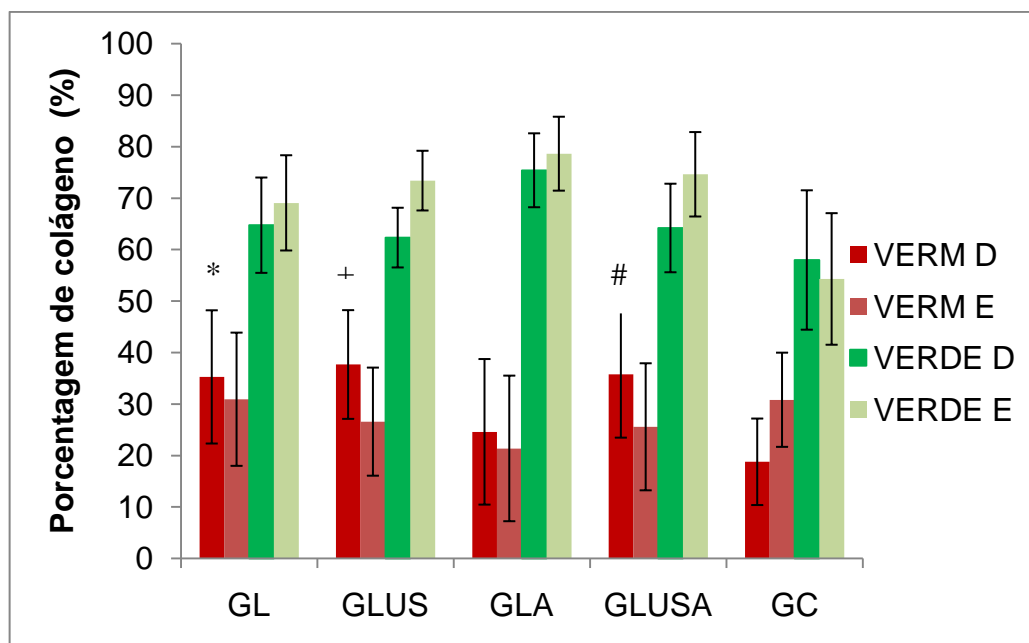


FIGURA 35- Efeitos do UST e/ou alongamento nas porcentagens da área dos Colágenos I (maduro, Verm) e III (imaturo, Verde).D- direito; E- esquerdo; Verm-vermelho. Verm D (coluna vermelho escura)- refere-se ao colágeno tipo I do gastrocnêmio D; Verm E (coluna vermelho clara); colágeno tipo I do gastrocnêmio E; Verde D (coluna verde escura)- colágeno III do gastrocnêmio D; Verde E (coluna verde clara)- colágeno III do gastrocnêmio E. GL= grupo lesão; GLUS= grupo lesão + ultrassom; GLA= grupo lesão + alongamento; GLUSA= grupo lesão + UST + alongamento; GC= grupo controle. * em relação a GLA ($p=0,000$) e GC ($p=0,000$); + em relação a GLA($p=0,000$) e GC ($p=0,000$); # em relação ao GC ($p=0,000$). Média \pm desvio padrão.

Na FIGURA 36 observa-se nas lâminas de todos os grupos avaliados a presença de colágeno maduro (representada pela cor vermelha) e colágeno imaturo (representado pela cor verde).

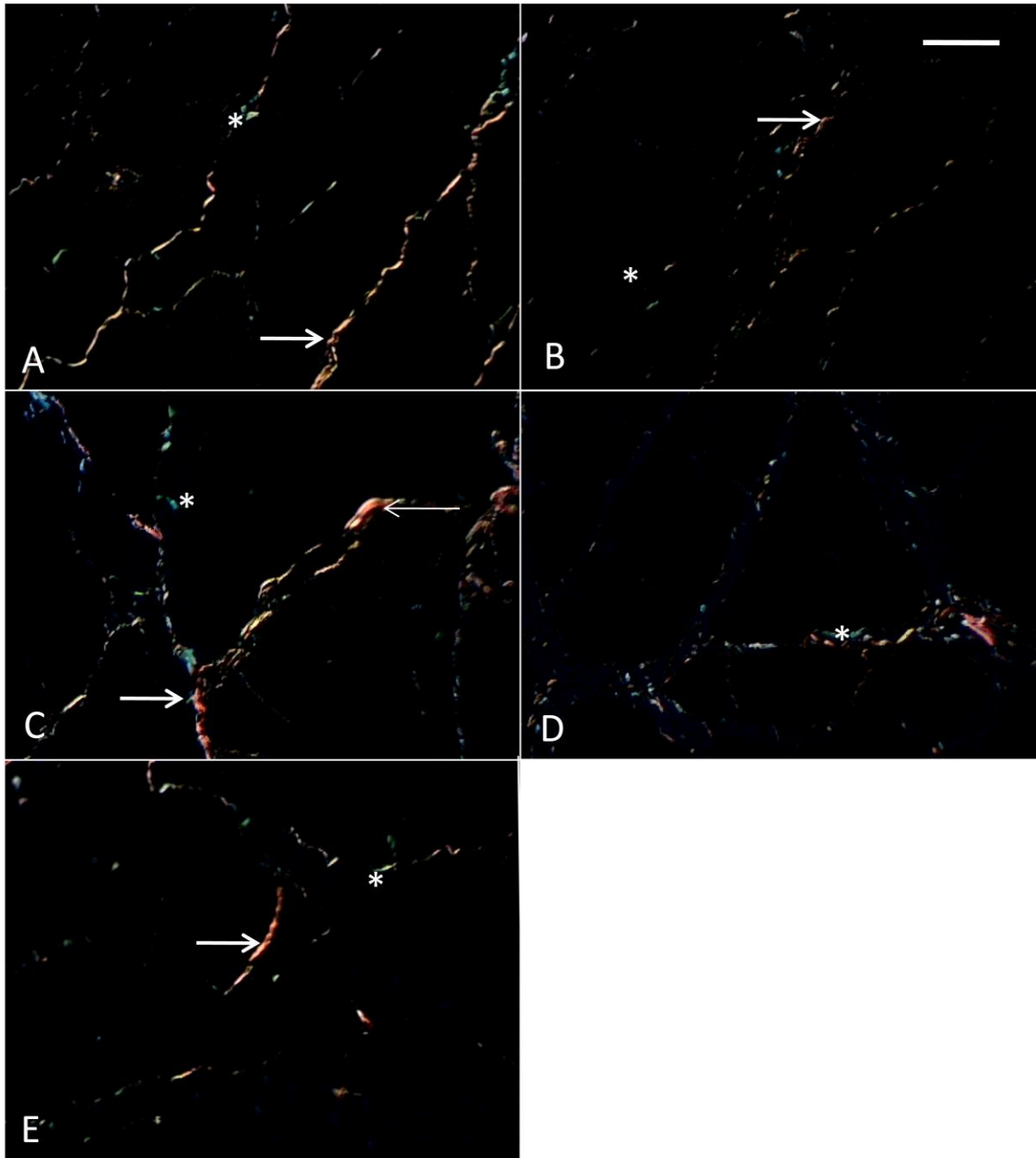


FIGURA 36- Cortes histológicos da porcentagem de colágeno. A- Grupo Lesão; B- Grupo Lesão + Alongamento; C- Grupo Lesão + UST; D- Grupo Lesão + UST + Alongamento; E- Grupo Controle. Seta indica coloração vermelha demonstrando o colágeno maduro- Tipo I.; Asterisco indica coloração verde demonstrando o colágeno imaturo- Tipo III.

10.8 DESMINA

A área de desmina muscular não apresentou normalidade segundo o teste Shapiro Wilk ($p < 0,05$). Portanto os dados foram considerados não paramétricos e a comparação entre grupos foram feitas por meio do teste *Kruskall-Wallis*. A área de desmina encontrada no GLUSA foi maior que aquela encontrada no GLA ($3069 \pm 98 \mu\text{m}^2$ vs $1549 \pm 51 \mu\text{m}^2$, $p = 0,02$) (TABELA 3).

TABELA 3- Efeitos do alongamento e/ou UST na área de desmina do músculo gastrocnêmio dos ratos.

GRUPOS	ÁREA (μm^2)
	Gastrocnêmio Direito
GL	1746 \pm 767
GLUS	1859 \pm 781
GLA	1549 \pm 513
GLUSA	3069 \pm 989*
GC	3453 \pm 1920

GL= Grupo Lesão; GLUS= Grupo Lesão + Ultrassom; GLA= Grupo Lesão + Alongamento; GLUSA= Grupo Lesão + UST + Alongamento; GC= Grupo Controle.* Comparado com o lado direito de GLA ($p = 0,02$).

A FIGURA 37 demonstra as lâminas da imunohistoquímica da desmina. Nota-se as áreas imunopositivas da desmina em todos os grupos (representado pelas setas).

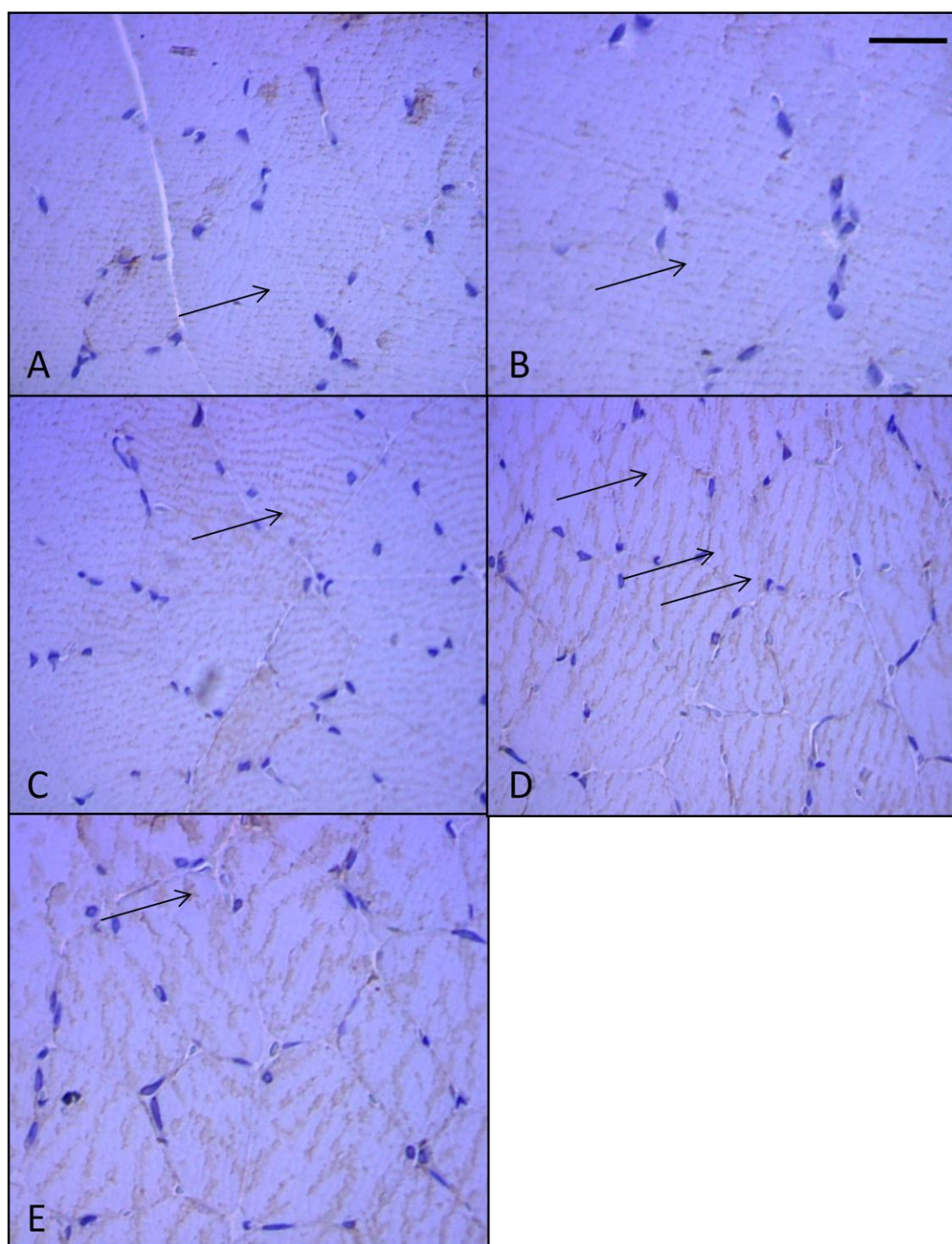


FIGURA 37- Lâminas da porcentagem de desmina do músculo gastrocnêmio de ratos. A- Grupo Lesão; B- Grupo Lesão + Alongamento; C- Grupo Lesão + UST; D- Grupo Lesão + UST + Alongamento; E- Grupo Controle. Seta indica área de desmina. Barra: 30 μ m para todos os painéis.

10.9 LAMININA

Os resultados da área da desmina muscular não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$, Shapiro Wilk), sendo os grupos comparados por meio do *Kruskal-Wallis*. Não foi encontrada diferença significativa na área de laminina entre os grupos (TABELA 4).

TABELA 4- Efeitos do alongamento e/ou UST na área de laminina do músculo gastrocnêmio dos ratos.

GRUPO	ÁREA (μm^2)
Gastrocnêmio Direito	
GL	3096 \pm 891
GLUS	2072 \pm 349
GLA	3321 \pm 1178
GLUSA	2351 \pm 1094
GC	2330 \pm 769

GL= Grupo Lesão; GLUS= Grupo Lesão + Ultrassom; GLA= Grupo Lesão + Alongamento; GLUSA= Grupo Lesão + UST + Alongamento; GC= Grupo Controle. Os resultados estão mostrados como a média \pm desvio padrão.

A FIGURA 38 mostra as lâminas da imunohistoquímica para laminina. Nota-se as áreas imunopositivas para laminina circundando as células musculares. A área de laminina está representada pelo retângulo.

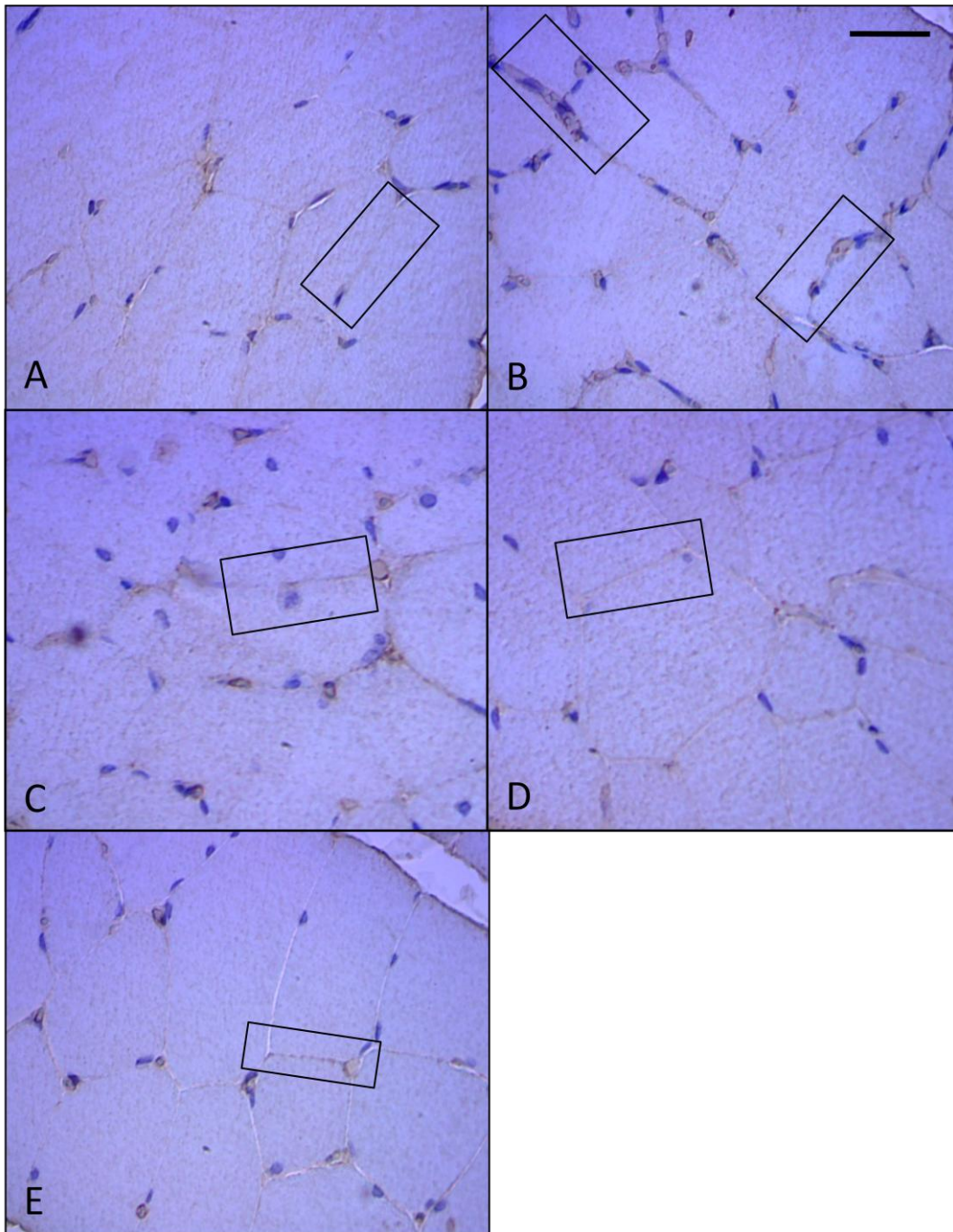


FIGURA 38- Lâminas da porcentagem de laminina do músculo gastrocnemio de ratos. A- Grupo Lesão (GL); B- Grupo Lesão + Alongamento. (GLA); C- Grupo Lesão + UST (GLUS); D- Grupo Lesão + UST + Alongamento (GLUSA); E- Grupo Controle (GC). Retângulo indica laminina (presente em toda circunferência da célula). Barra: 30 μ m para todos os painéis.

11 DISCUSSÃO

As fibras do musculoesquelético apresentam plasticidade, ou seja, capacidade de adaptação a determinados estímulos, como exercício físico, imobilização, alterações das condições hormonais, nutrição, inervação, eletroestimulação, entre outros (BURKHOLDER; LIEBER, 1998; AOKI, 2006). Estudos em animais demonstram a capacidade de adaptação muscular para diferentes estímulos, ocorrendo alterações no peso muscular, na quantidade de tecido conjuntivo, no comprimento e tamanho muscular, na quantidade protéica... (TABARY et al, 1972; GAJDOSKI, 2004; COUTINHO et al., 2004; GOMES et al., 2004 e 2007; SECCHI et al., 2008; BERTOLINI et al., 2009).

No presente estudo foram observados os seguintes desfechos: 1)- O ganho de peso corporal foi compatível com o crescimento normal dos animais; 2)- Não houve diferença no peso nem no comprimento muscular, porém, a associação do UST com o alongamento foi determinante para a adição de sarcômeros em série; 3)- O protocolo de alongamento realizado isoladamente foi suficiente para impedir a proliferação de colágeno nos músculos lesados; 4) O alongamento associado ao UST favoreceu a regeneração muscular.

11.1 PESO CORPORAL

Em relação ao peso corporal, todos os grupos apresentaram aumento quando se comparou o peso inicial com o final, demonstrando que nem a lesão e nem os protocolos de UST e/ou alongamento interferiram no ganho de peso corporal. No entanto, o peso corporal final absoluto do GC foi maior que o GLA e o GLUSA bem como o GL e GLUS tiveram seus pesos maiores que o GLUSA. Portanto, os grupos submetidos a maior quantidade de estímulos (contusão; UST e alongamento, GLUSA), podem ter apresentado interferência negativa no ganho absoluto de peso corporal, já que o GC (controle-intacto) apresentou o maior peso corporal final.

As diferenças detectadas no peso corporal podem indicar que o alongamento (procedimento com maior número de intervenções deste experimento), realizado durante 2 semanas, diariamente, isto é, 10 sessões, pode ter gerado estresse nos animais, devido a manipulação diária, influenciando negativamente o ganho de peso absoluto dos animais. Esses resultados foram confirmados quando se comparou as

diferenças relativas de peso corporal, nas quais se verificou que os grupos submetidos ao menor número de intervenções (GL; GLUS) apresentaram maior ganho de peso relativo.

11.2 PESO MUSCULAR

Em relação ao peso muscular não foram encontradas diferenças significativas. Sabe-se que o peso muscular não é o melhor método para avaliação do trofismo muscular e que o curto período de tempo de intervenção, apenas 3 semanas, pode não ter sido suficiente para induzir hipertrofia.

No estudo de Menon et al. (2007), no qual realizaram o alongamento passivo no sóleo de ratos, 3 séries de 30s, a cada 48h, por 3 semanas em músculo intacto, foi verificado aumento do peso muscular. Porém, quando o mesmo protocolo de alongamento foi aplicado no músculo imobilizado em flexão plantar por 3 semanas, não foi suficiente para impedir a diminuição do peso muscular de forma significativa.

Corroborando com nosso estudo, Wilkin et al. (2004) não encontrou aumento da massa muscular nos grupos tratados com UST (3 MHz, pulsado 20%, 1W/cm²) após contusão em ratos. Segundo esses autores, o aumento da massa era esperado pois como o UST permite a entrada de macrófagos e células sanguíneas branca, esses sinalizariam os fatores de crescimento e conseqüentemente, aumentariam a massa. Essa mesma justificativa para o aumento esperado da massa muscular foi sugerida no estudo de Market et al. (2005) que além do UST, associou em alguns grupos o exercício (esteira por 20 min) em ratos após contusão no gastrocnêmio. Os autores complementaram a justificativa explicando que o exercício aumenta a ativação das células satélites, o recrutamento neural e a carga mecânica, o qual teria um importante papel no crescimento e regeneração muscular. Porém essa resposta não foi encontrada por esses autores e nem em nosso estudo nos grupos submetidos ao alongamento.

No estudo de Sestare e Minamoto (2006) foi reportada diminuição do peso muscular do tibial anterior após 28 dias de contusão. Esses autores justificam a diminuição da massa muscular em decorrência da alteração no metabolismo protéico muscular, isto é, diminuição da síntese e aumento da degradação. Como não foi encontrada nenhuma diferença no peso muscular no presente estudo, não se pode afirmar que a contusão, o UST e/ou o alongamento interferiram no

metabolismo proteico muscular. Sugerem-se para futuros estudos, análises moleculares de fatores regulatórios miogênicos, que poderiam detectar os mecanismos envolvidos nas alterações de trofismo de menor magnitude.

11.3 COMPRIMENTO MUSCULAR, NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE, COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS

Durante o crescimento pós-natal, as fibras do musculoesquelético alongam-se por adição de novos sarcômeros em série, e músculos adultos são capazes de adaptar-se a um novo comprimento por adição ou remoção de sarcômeros em série. Para que isso ocorra, o comprimento do sarcômero é ajustado para manter uma relação de comprimento tensão ideal, e assim promover uma contração muscular eficaz (STAUBER et al., 1994). O efeito do alongamento e a adaptação a um aumento do comprimento funcional estão associados com o aumento da síntese protéica (GORDON et al., 1966).

O comprimento muscular em nosso estudo, mensurado por meio do paquímetro, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Este tipo de mensuração não é o melhor método para se avaliar o comprimento longitudinal do músculo, sendo o ideal, estimar o número de sarcômeros em série (NSS). Em nosso estudo foi estimado o NSS o qual foi encontrado maior número no GLA e GLUSA do que no GLUS, demonstrando o efeito do alongamento na sarcomerogênese em músculos lesados. A confirmação deste desfecho foi evidenciada quando se verificou que o número de sarcômeros em série do GLUSA foi maior que o GC.

O alongamento passivo estimula a síntese de proteínas e adição de sarcômeros ao longo da fibra muscular através da liberação de fatores de crescimento. Fato demonstrado por Yang et al. (1997) que após alongar em músculos mantidos em posição de encurtamento demonstraram aumento da liberação IGF-I e expressão de RNAm para proteínas musculares. O crescimento longitudinal também ocorre pelo aumento da síntese protéica principalmente nas extremidades distais da fibra muscular (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1973).

O estudo de Coutinho et al. (2004), avaliou os efeitos do alongamento de 40 min realizados a cada 3 dias, durante 3 semanas, no músculo sóleo de ratos imobilizados em posição de encurtamento. Foi avaliado o comprimento muscular, NSS e comprimento do sarcômero. Como resultado foi encontrado aumento do

comprimento muscular e no NSS no grupo alongado sem imobilização, enquanto que o comprimento dos sarcômeros nesse grupo não apresentou diferença significativa. Os autores concluíram que o alongamento não aumentou o número de sarcômeros nos músculos imobilizados. Gomes et al. (2004) aplicaram protocolo semelhante a Coutinho et al (2004) porém o alongamento foi realizado somente uma vez por semana e observaram que não foi o bastante para prevenir a perda de sarcômeros em série nos grupos imobilizados, mas promoveu proteção significativa contra a atrofia da fibra muscular. Salvini et al. (2006) avaliaram os efeitos do alongamento (10 vezes de 1 min) em músculos imobilizados aplicado diariamente ou 3 vezes por semana (durante 3 semanas) e concluíram que ambos os protocolos induziram a sarcomerogênese sendo mais efetivo o protocolo realizado 3 vezes por semana. Secchi et al. (2008) observaram aumento no número de sarcômeros no músculo sóleo hígido de ratos submetidos ao alongamento de 40 min, 2 vezes por semanas durante oito semanas consecutivas. Williams (1990) mostrou que 30 min diários de alongamento passivo foram suficientes para prevenir a perda de número de sarcômero em série e atrofia muscular, em músculos sóleos de ratos encurtados por imobilização. No entanto, quando aplicado o alongamento durante 15 min, estes não foram suficientes para prevenir a perda de sarcômeros e a amplitude de movimento. Desta forma, de acordo com os resultados descritos acima, pode-se sugerir que a duração do alongamento e o período de realização podem ser determinantes para o incremento no comprimento muscular, NSS e no comprimento dos sarcômeros.

Em nosso estudo, a duração total de alongamento por sessão foi de 2 min, realizados diariamente, por apenas 2 semanas, o que pode ter sido tempo insuficiente para mudança no comprimento muscular. Corroborando com nosso estudo, Menon et al. (2007), realizaram o alongamento passivo por 30s repetido 3 vezes, durante 3 semanas, no músculo sóleo hígido e imobilizado e não encontrou mudança nessa variável. No entanto, quando avaliaram o NSS concluíram que o alongamento preveniu a perda de sarcômero no músculo imobilizado mas não alterou no músculo hígido. Konno et al. (2008) realizaram o protocolo de alongamento semelhante ao nosso estudo (3 séries diárias de 30s durante 2 semanas), porém em músculo imobilizado e não encontraram aumento do número de sarcômeros significativo no grupo alongado após imobilização em relação ao membro contralateral.

Bertolini et al. (2009) também avaliaram essas 3 variáveis (comprimento muscular, número de sarcômeros em série e comprimento dos sarcômeros) após a aplicação do UST antes da realização do alongamento do músculo gastrocnêmio hígido de ratos. Foram realizadas 15 aplicações de UST associadas ou não ao alongamento (3 séries de 30s, diariamente por 3 semanas) e foi encontrado aumento significativo no comprimento muscular, nos grupos tratados com UST (0,5 e 1 W/cm², modo contínuo) e alongamento. Entretanto, o grupo que realizou somente a aplicação do UST não apresentou aumento no comprimento muscular. Em relação ao NSS e comprimento muscular não foi encontrada diferença significativa em nenhum grupo. Assim, pode ser hipotetizado que os músculos hígidos e os lesados respondem diferentemente a associação do UST com o alongamento, já que em nosso estudo não foi verificada modificação no comprimento muscular e foi encontrado aumento do NSS no GLA e GLUSA e do comprimento do sarcômero no GLUS.

Wessling et al. (1987) demonstraram, em humanos, que a combinação do alongamento estático e UST térmico aumentou a extensibilidade (mensurada através do goniômetro) do músculo tríceps sural, além do alcançado pelo alongamento realizado isoladamente. Knight et al. (2001) de forma concordante, observaram que o UST foi mais efetivo no aumento da amplitude ativa e passiva de movimento, ao comparar com outras formas de aquecimento (bolsa de gel).

Em contrapartida ao aumento do NSS do GLA em relação ao GLUS, o comprimento do sarcômero do GLUS foi maior que GLA. Segundo Koh (1995), um músculo pode adicionar ou remover sarcômeros em série, para ajustar o comprimento em direção ao ângulo articular ótimo, no qual a força muscular máxima é produzida durante o treinamento. Desta maneira, pode ter ocorrido este mecanismo no GLA intragrupo e quando comparado com o GLUS. No entanto, era esperado que este mecanismo também ocorresse com o GLUSA, já que a associação do UST com o alongamento potencializou a sarcomerogênese. Desta forma, sugere-se a realização de mais estudos, com análise ultra estrutural, por exemplo, com microscopia eletrônica de transmissão, para investigar o comprimento dos sarcômeros.

Portanto, o presente estudo evidenciou que a associação do UST com o alongamento induziu sarcomerogênese em músculos lesados. Assim, é a primeira vez que se verificou aumento no número de sarcômeros em série de músculos

previamente submetidos a contusão, sugerindo que a adaptação decorrente da associação do UST com o alongamento, não apenas pode modificar a tensão passiva do comprimento da unidade músculo-tendínea e sim pode induzir a adaptação morfológica muscular longitudinal (HOANG et al., 2007).

11.4 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES (ASTFM)

Em relação a ASTFM verificou-se que a do GL foi maior que a do GLA porém não houve diferença com o controle. Analisando o peso corporal desses grupos, O GL teve aumento de 31% enquanto o GLA de 19%, o que pode ter influenciado a ASTFM apesar de não ser encontrado aumento no peso muscular. Nesse estudo não se encontrou nenhuma influência do UST e do alongamento na ASTFM. Era de se esperar alguma interferência nessa variável, pois segundo Rantanen et al. (1999), a ASTFM poderia diminuir se houvesse danos internos da célula muscular sem danos sarcolema e se os tratamentos acelerassem a resolução de edema celular, ou poderia aumentar se houvesse danos internos e os tratamentos acelerassem a regeneração. O estudo de Lopes et al (2005) realizou análise morfométrica do tecido muscular (vasto lateral) de coelhos saudáveis após aplicação de UST contínuo e pulsado de 1 MHz, com intensidade de 3 W/cm². Foram realizadas 10 sessões consecutivas de 12 min e não foi encontrada nenhuma diferença significativa na ASTFM entre os grupos e nem com o grupo controle. No estudo de Wilkin et al (2004) que aplicou o UST pulsado (3MHz, 1 W/cm²), no músculo gastrocnêmio após contusão também não foi encontrado o aumento na AST. Esses autores avaliaram a ASTFM no 1º, 3º, 5º, 7º, 14º, 21º, 28º e 40º dia pós lesão. O UST foi iniciado 6 h pós lesão e aplicado por 7 dias. Corroborando com esse estudo, o nosso trabalho também não encontrou aumento da AST no grupo tratado com UST, que foi iniciado 72 h pós lesão e aplicado durante 5 dias consecutivos.

O estudo de Market et al (2005), avaliou os efeitos do UST (3MHz, contínuo, 0,1 W/cm²) e exercício (esteira por 20 min), durante 4 dias, iniciado 24h pós lesão, na ASTFM após 96h da lesão e não observaram nenhuma diferença estatística entre os grupos tratados e nem comparado com o grupo controle. Justificam o não aumento da ASTFM devido ao curto período de realização do exercício. Coutinho et al. (2004) e Gomes et al. (2007) demonstraram que o alongamento de 40 min pode diminuir a hipotrofia muscular em músculos imobilizados. Secchi et al. (2008)

verificaram que o alongamento, em músculos hígidos, sustentado durante 40 min, 2 vezes por semana, aumentou a ASTFM do grupo alongado em relação ao controle. O estudo de Rocha et al. (2010) avaliaram os efeitos do alongamento de 8 min diários por três semanas após três semanas de imobilização e encontraram aumento da área da fibra em relação aos outros grupos (imobilizado, mobilização livre e controle). Como em nosso estudo o GL apresentou ASTFM maior que GLA, o alongamento pode ter interferido na resolução do edema e na regeneração do sarcolema, mas não foi suficiente para estimular o crescimento muscular e a síntese protéica que são efeitos descritos na literatura (Goldspink, 1999; Goldspink et al, 1995). Porém para elucidar melhor esses resultados seria necessário um estudo mais aprofundado de biologia molecular.

11.5 ANÁLISE DO COLÁGENO (*PICROSIRIUS*)

O GLUS apresentou maior porcentagem de colágeno maduro em relação GLA e ao GC. O aumento da densidade de tecido conjuntivo associado a diminuição do número de sarcômeros, o qual foi encontrado no GLUS em relação ao GLA, são características básicas de músculo retraído. Isso permitiria concluir que o UST não foi bom recurso para o tratamento da contusão. Porém, analisando-se o comprimento do sarcômero, verificou-se que esse grupo apresentou aumento quando comparado ao GLA. Estudos mostram que a diminuição do espaço entre as fibras colágenas, aliada à produção e deposição aleatória de colágeno imaturo, favorece a formação de ligações intermoleculares em locais indesejáveis e limita a amplitude de movimento articular (AKESEON et al., 1987). O aumento do comprimento do sarcômero nos músculos imobilizados em posição de encurtamento tem sido associado à redução do número de sarcômeros em série, o qual envolve adaptação no comprimento do sarcômero, para o músculo desenvolver máxima tensão (WILLIAMS; GOLSDSPINK, 1978). Isso pode ter ocorrido com o estímulo do UST pois um dos seus efeitos terapêuticos é a síntese do colágeno, formação de tecido conjuntivo mais forte e deformável, aumento da deposição e extensibilidade do colágeno (YOUNG et al., 1990). Rantanen et al (1999) verificaram aumento da produção de fibroblastos após contusão muscular de ratos tratados com UST pulsado (3MHz, 20% e 1,5 W/cm²). Esses autores verificaram aumento das células precursoras miogênica (até 4 dias pós trauma) e proliferação de fibroblastos (pelo

menos 10 dias após o trauma) e sugeriram que a fase prolongada de proliferação de fibroblastos pode aumentar a quantidade de produção de tecido fibrótico. Fu et al. (2010) avaliaram a aplicação do UST pulsado (1,5 MHz, 20%, 0,15 W/cm²) após lesão do tendão patelar de ratos. A avaliação ocorreu no 4º, 14º e 28º dia após a lesão. Verificou-se que o efeito estimulatório do UST foi evidente somente nos primeiros dias pós lesão, no qual houve aumento da expressão do mRNA do colágeno tipo 1 e 3 somente na fase de granulação. Piedade et al. (2008) avaliaram a aplicação do UST pulsado no músculo gastrocnêmio lacerado de ratos e observaram o aparecimento precoce de fibras de colágeno tipo 1 aos 4 dias de lesão, com melhor arranjo estrutural e melhor alinhamento dos miotubos em formação, no grupo tratado com UST (1 MHz, 20%, 0,57 W/cm², 5 min). Nesses estudos, os autores demonstraram a presença de colágeno tipo 1 no grupo tratado com UST já no 4º dia, sugerindo que o UST pode estimular precocemente a agregação deste tipo de colágeno, não causando acúmulo de colágeno o qual não seria benéfico. Como o processo de maturação do colágeno é importante no processo de cicatrização e reparo pois aumenta a força mecânica e a resistência a degradação (NIMNI, 1988), pode-se sugerir que o UST melhora a resistência biomecânica precocemente após a lesão muscular.

Em nosso estudo, o protocolo de alongamento preveniu a proliferação do colágeno quando comparado ao músculo somente lesado. Williams et al. (1988) relataram que ao alongar diariamente um músculo encurtado por imobilização, houve prevenção na deposição de tecido conjuntivo no tecido muscular. Corroborando com esses resultados, o estudo de Hwang et al. (2006) avaliaram os efeitos do alongamento em músculos lesionados e verificaram seu efeito antifibrótico. Observa-se que este é um dos únicos estudos demonstrando a importância do alongamento em músculos lesionados. Esses autores indicaram que o alongamento deve ser iniciado no 14º dia após a lesão. Segundo Robinson e Winegrad (1978), a força passiva imposta ao músculo durante o alongamento lhe é transmitida como um todo através do tecido conjuntivo intramuscular e que o aumento do tecido conjuntivo contribui para o aumento da resistência passiva extracelular do musculoesquelético. Jarvinen et al. (2007) sugeriram que as mudanças ocorridas no tecido conjuntivo intramuscular contribuem para a perda funcional e propriedades biomecânicas do musculoesquelético imobilizado. Estas conseqüências podem alterar a relação da expressão dos colágenos tipos I e III o

que modifica as propriedades de força tênsil, rigidez e complacência muscular. Para reorganização do tecido conjuntivo intramuscular, programas de alongamento passivo demonstram aumento da extensibilidade muscular devido a reorganização do tecido conjuntivo intramuscular (COUTINHO et al., 2006). Secchi et al. (2008) não verificaram alterações na quantidade de tecido conjuntivo em músculos saudáveis alongados 2 vezes por semana durante 40 min. Em nosso trabalho, foi observado que os músculos lesados apresentaram maior porcentagem de colágeno do que os músculos intactos (controle) e do que aqueles submetidos ao alongamento. O protocolo de alongamento aplicado foi melhor do que o UST para prevenir a proliferação de colágeno, no entanto, houve baixa evidência científica para este desfecho, já que tanto o músculo lesado submetido ao UST, quanto a associação do UST com o alongamento, apresentaram maior porcentagem de colágeno do que o grupo controle (intacto).

11.6 DESMINA E LAMININA

No presente estudo, o músculo gastrocnêmio submetido ao UST e alongamento (GLUSA) apresentou maior área de desmina em relação aos músculos somente alongados ($p < 0.05$). Alguns estudos avaliaram os efeitos do UST aplicado após contusão muscular e analisaram a quantidade de mioblastos e miotubos através do aumento da imunoreatividade da desmina (RANTANEN et al., 1999; PIEDADE et al., 2008; SHU et al., 2012).

Rantanen et al. (1999) reportaram que o UST pulsado (3 MHz, 1,5 W/cm²), aplicado 6 h e 3 dias após a contusão muscular de ratos, aumentou as células precursoras miogênicas e a proliferação dos fibroblastos sem aumento na formação de miotubos, avaliados por meio da desmina. Esses autores encontraram aumento da quantidade de desmina no 3º dia (UST iniciado após 6 horas da lesão) e no 4º dia (UST iniciado no 3º dia). O estudo de Shu et al. (2012), reportaram os efeitos do UST pulsado (20%), em diferentes doses (0,25; 0,5 e 0,75 W/cm²) na quantidade de desmina, após contusão muscular mecânica em ratos. O UST foi aplicado 24 h após a lesão até o 4º, 7º e 14º dia sendo encontrado aumento significativo de desmina em todos os grupos em relação ao controle ($p < 0,005$). Nesse estudo, os autores verificaram que a expressão da desmina aumentou do 4º ao 14º dia, tendo seu pico no 7º dia, porém, sem diferença significativa entre os grupos. Piedade et al. (2008)

avaliaram a aplicação do UST pulsado no músculo gastrocnêmio lacerado de ratos e observaram maior quantidade de mioblastos e miotubos, analisados por morfometria de desmina-positiva, na zona de regeneração, aos 14 dias, no grupo tratado com UST (1 MHz, 20%, 0,57 W/cm², 5 min). Os autores associam o aumento de mioblastos e miotubos desmina-positiva ao estímulo da proliferação e diferenciação das células satélites induzido pelo UST, favorecendo a regeneração muscular.

No presente estudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na área de desmina, de músculos lesados submetidos somente ao ultrassom. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que os ratos foram submetidos a aplicação do UST até o 8º dia e a desmina foi avaliada no 22º dia. Desta forma, o estímulo gerado pode ter sido insuficiente para as células satélites se diferenciarem em mioblastos, conseqüentemente não sendo marcados pela desmina. Apesar de não encontrarmos diferença estatisticamente significativa, verifica-se que o GLUS tem quase a metade da quantidade de desmina que o GC, o que pode justificar a falta de estímulo gerado pelo UST para produzir novos mioblastos.

Os estudos supracitados avaliaram o efeito do UST isoladamente, sem associar com outro recurso terapêutico ou exercício. Entretanto, no presente estudo, observou-se menor área de desmina no grupo submetido somente ao alongamento quando comparado ao grupo submetido ao UST associado ao alongamento. Pode ser hipotetizado que a aplicação isolada, seja do UST ou alongamento não gera estímulo suficiente para modificar o processo de regeneração avaliado pela desmina. Outra hipótese seria que o protocolo de alongamento aplicado estaria prejudicando o processo de regeneração, seja pela técnica, dorsiflexão passiva máxima ou pela duração total que foi mantido.

Correlacionando lesão muscular e alongamento, Hwang e colaboradores (2006) compararam o efeito da decorina, uma proteoglicana humana de ação antifibrótica, com o alongamento muscular do gastrocnêmio, mantido por 5 s e intercalado com 5 s de repouso, num tempo total de 15 min, realizados após dois, sete e quatorze dias da lesão muscular em ratos. Observaram que o grupo que utilizou a decorina demonstrou melhores resultados na regeneração, fibrose e nas propriedades contráteis, quando comparado ao grupo controle bem como os que realizaram alongamento. Porém, dos grupos que foram submetidos ao alongamento, verificou-se que aquele que iniciou após 14 dias, obteve melhores resultados no nível de fibrose (50% menor), no número de miofibrilas regeneradas e maior

comprimento muscular. No presente estudo, o alongamento iniciado 1 semana após a lesão, não apresentou alterações significativas na área de desmina e da laminina quando comparada ao grupo controle e ao lesão.

No entanto, quando o alongamento foi associado ao UST (GLUSA) observou-se maior área de desmina, o que poderia ser atribuída a maior duração de estímulo desta combinação terapêutica, isto é, por 3 semanas. Esse foi o único grupo que recebeu intervenção todos os dias, primeiramente com o UST e depois com o alongamento. Sabe-se que as células satélites estão quiescentes na fibra muscular sadia e quando há uma lesão elas iniciam rapidamente sua divisão e recolocação no tecido lesado (LIEBER, 2002). Há grande evidência que as células satélites representam a população de células tronco que podem diferenciar-se em células musculares ou outro tipo de células (LIEBER, 2002). Células satélites migram para a região da lesão e entram em ativação, proliferação e diferenciação em mioblastos, que ao fundirem-se formam miotubos (LIEBER, 2002). Estudos demonstram que tanto o UST (RANTANEN et al., 1999. PIEDADE et al., 2008 e SHU et al., 2012), quanto o alongamento, através de seu efeito mecânico (KENNEDY et al., 1988; TATSUMI et al., 2001 e 2006) estimulam as células satélites.

Assim, propõe-se que o aumento da desmina resultante da associação do UST com o alongamento, pode ter favorecido o processo de regeneração muscular pela ativação de células satélites. No presente estudo as células satélites não foram marcadas, porém, o núcleo centralizado observado na histologia poderia indicar esta ativação. Sugere-se para futuros estudos a marcação das células satélites para elucidar os efeitos do UST e do alongamento no mecanismo de regeneração muscular.

A laminina é uma proteína presente na lâmina basal e que possui um papel importante em processos de diferenciação, migração e adesão celular (DURBEEJ, 2010). A perda da membrana basal, evidenciada pela diminuição da expressão da laminina e do colágeno IV, tem sido observada em áreas com perda de diferenciação (HAAS et al, 2001). A integridade da lâmina basal é importante para o sucesso da regeneração, para a formação e orientação espacial dos novos miotubos e desenvolvimento mínimo de fibrose (ENGEL; ARMSTRONG, 1994). No presente estudo verificou-se que todos os grupos apresentaram integridade da lâmina basal.

Esse estudo limita-se por ter utilizado a imunohistoquímica para laminina de forma geral, não sendo utilizada a laminina $\alpha 2$ que é específica para

musculoesquelético. Sugerem-se novos estudos sobre os efeitos do alongamento na fase aguda da lesão muscular, bem como analisar outras glicoproteínas como integrinas, colágeno IV e fibronectina e também realizar análises com técnicas de biologia molecular.

12 CONCLUSÕES

- A contusão, UST e alongamento não interferiram no ganho de peso corporal dos animais, porém, quanto maior foi o período de intervenção, como o alongamento por 2 semanas, o ganho de peso foi inferior.
- A associação do UST com o alongamento foi determinante para a sarcomerogênese nos músculos lesados.
- Somente o alongamento realizado isoladamente preveniu o aumento de colágeno nos músculos lesados.
- O protocolo realizado com ultrassom, independente da associação com o alongamento, não foi suficiente para impedir o aumento da porcentagem de colágeno nos músculos lesados.
- O UST associado ao alongamento melhorou o processo de regeneração muscular, verificado por meio da análise imunohistoquímica da desmina.
- Com as devidas restrições de extrapolação, o protocolo de ultrassom associado ao alongamento poderia ser indicado para tratamento da contusão muscular auxiliando no processo de regeneração muscular.

13 APOIO FINANCEIRO

Universidade Federal do Paraná; UNIBRASIL; Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq, Processo 474303/2011-0 e Processo 308696/2012-3); Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR) e Unibrasil.

14 APOIO TÉCNICO

Ana Paula Camargo Martins (PUC-PR), Marina Luise Viola de Azevedo (PUC-PR), Carolina Cantuário (UNIBRASIL), Jaqueline Pacheco (UNIBRASIL), Julye Leiko Ywazaki (Mestranda PPGEDF-UFPR), Sibelly Blum Gonçalves (UNIBRASIL), Tallyta Camargo (UNIBRASIL).

15 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNE, J. *Eu Sei eletroterapia*. Santa Maria: Pallotti; 2009.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

AKESON, W. H.; AMIEL, D.; ABEL, M. F.; GARFIN, S. R.; WOO, S. L. Effects of immobilization on joints. **Clinical Orthopedic Related Research**, v. 219, p. 219:28-37, 1987.

ALTER, M. J. **Science of flexibility**. 3rd ed. United States of America: Human Kinetics, 2004.

ANSVED, T. Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. **Acta Physiology Scandinavian**, v. 154, n. 3, p. 291-302, 1995.

AOKI, M. S.; MIYABARA, E.H.; SOARES, A. G.; SALVINI, T. F.; MORISCOT, A. S. Cyclosporin does not affect skeletal muscle mass during disuse and recovery. **Braz Journal Medical Biological Research**, v. 39, n. 2, p. 243-51, 2006.

ARMSTRONG, R. B. Initial events in exercise-induced muscular injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 22, n. 4, p. 429-35, 1990.

AUMAILLEY, M.; PESCH, M.; TUNGGAI, L.; GAILL, F.; FASSIER, R. Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in $\beta 1$ integrin-deficient embryoid bodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 259-268, 2000.

BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Physical Therapy**, v. 81, n. 7, p.1351-58, 2001.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n. 1, p. 27- 51, 2005.

BANDY, W. D.; IRION, J.M.; BRIGGLER, M. The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscles. **Physical Therapy**, v. 78, n. 3, p.321-2, 1997.

BARANDA P. S.; AYALA, F. Chronic flexibility improvement after 12 week of stretching program utilizing the ACSM recommendations: Hamstring Flexibility. **International Journal of Sports Medicine**, v. 31, n. 6, p. 389-96, 2010.

BASSOLI, D. A. **Avaliação dos efeitos do UST pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica**. Dissertação (Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BEHRENS, B. J.; Michlovitz, S. L. **Physical agents theory and practice**. Philadelphia: FA Davis, 2006, p. 85-7.

BENNETT, M. R.; HO, S. The formation of topographical maps in developing rat gastrocnemius muscle during synapse elimination. **The Journal of Physiology**, v. 381, p. 351-76, 1988.

BERNE, R.M.; LEVY, M. N. Fisiologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BERTOLINI, G. R. F.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Análise longitudinal de músculos sóleos de ratos submetidos a alongamento passivo com uso prévio de ultrassom. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.15, n. 2, p.115-8, 2009.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P. O processo de cicatrização influenciado pelo hipotireoidismo e pelo envelhecimento. Estudo da cicatrização das anastomoses intestinais, em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 113-99, 2005.

BLACK, J. D. J.; FREEMAN, M.; STEVENS, E.D. A 2 week routine stretching programme did not prevent contraction-induced injury in mouse muscle. **The Journal of Physiology**, v. 544, n. 1, p.137-47, 2006.

BLEAKLEY, C. M.; GLASGOW, P.; MACAULEY, PRICE needs updating, should we call the POLICE. **Brazilian Journal of Sports Medicine**, v. 46, p. 220-221, 2012.

BURKE, R. E.; LEVINE, D. N.; TSAIRIS, P.; ZAJAC, F. E. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. **The Journal of Physiology**, v. 234, n. 3, p. 723-48, 1973.

BURKHOLDER, T. J.; LIEBER, R. L. Sarcomere number adaptation after retinaculum transection in adult mice. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 309-16, 1998.

BYL, N. N.; MCKENZIE, A.; WONG, T.; WEST, J.; HUNT, T. K. Incisional wound healing: a controlled study of low and high dose ultrasound. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v.18, n. 5, p. 619-28, 1993.

CAMMARATO, A.; DAMBACHER, C. M.; KNOWLES, A. F.; KRONERT, W. A.; BODMER, R.; OCORR, K.; et al. Myosin transducer mutations differentially affect motor function, myofibril structure, and the performance of skeletal and cardiac muscles. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 2, p. 553-62, 2008.

CAPETANAKI, Y.; MILNER, D. J.; WEITZER, G. Desmin muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. **Cell Structure and Function**, v. 22, n. 1, p. 103-116, 1997.

CHAN, S. P.; HONG, Y.; ROBINSON, P. D. Flexibility and passive resistance of the hamstrings of young adults using two different static stretching protocols. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 11, n. 2, p. 81-6, 2001.

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, n.1, p. 209-238, 2004.

COELHO, L. P. S. O treino da flexibilidade muscular e o aumento da amplitude de movimento: uma revisão crítica da literatura. **Motricidade**, v. 4, n. 4, p. 59-70, 2007.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R.S.; FRANÇA, C. N.; OISHI, J.; SALVINI, T. F. Effect of a passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1853-61, 2004.

COUTINHO, E. L.; DELUCA, C.; SALVINI, T. F.; VIDAL, B. C. Bouts of Passive Stretching after Immobilization of the Rat Soleus Muscle Increase Collagen Macromolecular Organization and Muscle Fiber Area. **Connective Tissue Research**, v. 47, n. 5, p. 278-286, 2006.

CRISCO J. A muscle contusion injury model. **American Journal of Sports Medicine**, v. 22, n. 5, p. 702-10, 1994.

DA CUNHA, A.; PARIZZOTO, N.; VIDAL, B. C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendon calcaneus) of the rat. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 27, n. 12, p.1691-96, 2001.

DEYNE, P. G. Application of Passive Stretch and Its Implications for Muscle Fibers. **Physical Therapy**, v. 81, n. 2, p. 819-27, 2001.

DRAPER, D. O.; SUNDERLAND, S.; KIRKENDALL, D. T.; RICARD, M. A comparison of temperature rise in human calf muscles following applications of underwater and topical gel ultrasound. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v.17, n. 5, p. 247-51, 1993.

DRAPER, D. O.; CASTEL, J. C.; CASTEL, D. Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz continuous ultrasound. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 22, n. 4, p.142-50, 1995.

DUBOWITZ, V.; SEWRY, C. A. **Muscle biopsy: practical approach**. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.

DURBEEJ, M. Laminins. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n.1, p. 259-68, 2010.

DYSON, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v. 73, n.3, p.116-120, 1987.

EBENBICHLER, G. R.; RESCH, K. L.; NICOLAKIS, P. Ultrasound treatment for treating the carpal tunnel syndrome: randomized "sham" controlled trial. **Brazilian Medical Journal**, v. 316, p. 731-35, 1998

EBENBICHLER, G. R.; ERDOGMUS, C. B.; RESCH K. L. Ultrasound therapy for calcific tendinitis of the shoulder. *New England Journal Medical*, v. 340, p. 1533-38, 1999.

ENGBRING, J. A.; KLEINMAN, K. H. The basement membrane matrix in malignancy. **The Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 465-70, 2003.

ENGEL, A. G.; ARMSTRONG, C. F. **Myology**. 2 ed. New York: McGraw-Hill, 1994.

ENWEMEKA, C. S.; RODRIGUEZ, O.; MENDOSA, S. The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 16, n. 8, p. 801-7, 1990.

EPSTEIN, Y. Clinical significance of serum creatine phosphokinase activity levels following exercise. **Israel Journal of Medical Science**, v. 13, n. 11, p.698-699, 1995,

ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **The Journal of Cell Biology**, v.122, n. 4, p.809-82, 1993.

FABRIZIO, P. A.; SCHIMIDT, J. A.; CLEMENTE, F. R. Acute effects of therapeutic ultrasound delivered at varying parameters on the blood flow velocity in a muscular distribution artery. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 24, n. 5 294-302, 1996.

FALCAI, M. J.; MONTE-RASO, V. L.; OKUBO, R.; ZAMARIOLI, A.; CARVALHO, L. C.; SHIMANO, A. C. Análise biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidas à lesão muscular e tratados com laserterapia de baixa intensidade. **Revista Brasileira de Ortopedia** v. 45, n.4, p. 444-48, 2010.

FARIA, F. E. T.; FERRARI, R.; DISTEFANO, G.; DUCATTI, A. C.; SOARES, K. F.; MONTEBELO, M. I. L.; MINAMOTO, M. B. The onset and duration of mobilization affect the regeneration in the rat muscle. **Histology Histopathology**, v. 23, n. 5, p. 565-71, 2008.

FELAND, J. B.; MYRER, J. W.; SCHULTIES, S. S.; FELLINGHAM, G. W.; MEASOM, G. W. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people aged 65 years or older. **Physical Therapy**, v. 81, n. 5, p. 1100-17, 2001.

FERBER, R.; GRAVELLE, D. C.; OSTERNIG, L. R. Effect of proprioceptive neuromuscular facilitation stretch techniques on trained and untrained older adults. **Journal of Aging and Physical Activity**, v. 10, n. 2, p. 132-42, 2002.

FERNANDES, T. L.; PEDRINELLI, A.; HERNANDEZ, A. J. Lesão muscular-fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e apresentação clínica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 3, p. 247-55, 2011.

FISHER, B. D.; BARACOS, V. E.; SHNITKA, T. K.; MENDRYK, S. W.; REID, D. C. Ultrastructural events following acute muscle trauma. **Medicine Science Sports & Exercise**, v. 22, n. 2, p. 185-93, 1990.

FOSTER, R. F.; THOMPSON, J. M.; KAUFMAN, S. J. A laminin substrate promotes myogenesis in rat skeletal muscle cultures: analysis of replication and development using antidesmin and anti-BrdUrd monoclonal antibodies. **Developmental Biology**, v. 122, n.1, p. 11–20, 1987.

FU, S.; HUNG, L. K.; SHUM, W.; LEE, Y.; CHAN, L.; HO, G.; CHAN, K. In Vivo Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) following tendon injury promotes repair during granulation but suppresses decorin and biglycan expression during remodeling. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 40, n. 7, p. 422-29, 2010.

FUCHS, E.; CLEVELAND, D. W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 514-19, 1998.

FURST, D. O.; OSBORN, M.; NAVE, R.; WEBER, K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 5, p. 1563-72. 1988

FYFE, M. C.; CHAHL, L. A. The effect of ultrasound on experimental oedema in rats. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 6, n. 2, p.107-11, 1980.

GAJDOSIK, R. L. Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications. **Clinical Biomechanics**, v. 16, n. 2, p. 87-101, 2001.

GAM, N. A.; JOHANNSEN, F. Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: a meta-analysis. **Pain**, v. 63, n. 1, p. 85-91, 1995.

GARCIA, A. S.; HERNADEZ, M. M. A.; SANCHEZ, E. F.; GONZALEZ, R. J.; VILLARDON, P. G.; HERNADEZ, J. J. C. E-caderin, laminin and collagen IV expression on evolution from dysplasia to oral squamous cells carcinoma. **Oral Medicine and Pathology**, v. 11, p.100-5, 2006.

GAWLIK, K. I.; DURBEEJ, M. Skeletal muscle laminina and MDC1A: pathogenesis and treatment strategies. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 9, p. 1-13, 2011.

GETHING, M. J. Molecular chaperones: clasping the prize. **Current Biology**, v. 6, n. 12, p.1573-76, 1996.

GOLDBERG, A. L.; ETLINGER, J. D.; GOLDSPINK, D. F.; KABLECKI, C. Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. **Medicine and Science in Sports**, v. 7, n. 3, p.185-98, 1975.

GOLDSPINK, D. F. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. **The The Journal of Physiology**, v. 264, p. 267-282, 1977.

GOLDSPINK, D. F.; COX, V. M.; SMITH, S. K.; EAVES, L. A.; OSBALDESTON, N. J.; LEE, D. M. Muscle growth in response to mechanical stimuli. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. 288-97, 1995.

GOLDSPINK, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. **Journal of Anatomy**, v. 194, n. 3, p. 323-34, 1999.

GOMES, A. R. S.; COUTINHO, E. L.; FRANÇA, C. N.; POLONIO, J.; SALVINI, T. F. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n.10, p. 1473-80, 2004.

GOMES, A. R. S.; CORNACHIONE, A.; SALVINI, T. F.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **Journal of Anatomy**, v. 210, n.3, p. 328 –35, 2007.

GORDON, A. M.; HUXLEY, A. F.; JULIAN, F. J. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibers. **The Journal of Physiology**, v. 184, p. 170-192, 1966.

GRAY, H.; WILLIAMS, P. L.; BANNISTER, L. H. **Anatomia- A base anatômica da prática clínica**. 40 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.

GREGORY, T. M.; HECKMANN, R. A.; FRANCIS, R. S. The effect of exercise on the presence of leukocytes, erythrocytes and collagen fibers in skeletal muscle after contusion. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v. 18, n. 2, p. 72-8, 1995.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GROUNDS, M. D.; WHITE, J. D.; ROSENTHAL, N.; BOGOYEVITCH, M. A. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n.5, p. 589-610, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Espanha: Elsevier; 2006.

HAAR, G. T. Therapeutic applications of ultrasound. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 93, n. 1-3, p. 111-129, 2007.

HAAS, K. M.; BERNDT, A.; STILLER, K. J.; HYCKEL, P.; KOSMEHL, H. A comparative quantitative analysis of laminin-5 in the basement membrane of normal, hyperplastic, and malignant oral mucosa by confocal immunofluorescence imaging. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1261-68, 2001.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 2, p. 534-51, 2001.

HAYLE, J. S.; SCOVILLE, C. R.; GREATHOUSE, D. G. Ultrasound's effect on the conduction latency of the superficial radial nerve in man. **Physical Therapy**, v. 61, n. 3, p. 345-50, 1981.

HERBERT, R. D.; GABRIEL, M. Effects of stretching before and after exercising on muscle soreness and risk of injury: systematic review. **British Medical Journal**, v. 325, n. 7362, p. 468-70, 2002.

HIROTA, J.; YONEDA, K.; OSAKI, T. Basement membrane type IV collagen in oral squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 12, n. 5, p. 400-5, 1990.

HOANG, P.D.; HERBERT, R.D.; TODD, G., GORMAN, R.B.;GANDEVIA, S.C. Passive mechanical properties of human gastrocnemius muscle–tendon units, muscle fascicles and tendons *in vivo*. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 4159-68, 2007.

HOGAN, R. D.; BURKE, K. M.; FRANKLIN, T. D. The effect of ultrasound on microvascular hemodynamics in skeletal muscle: Effects during ischemia. **Microvascular Research**, v. 23, n. 3, p. 370-79, 1982.

HOOGLAND, R. **Ultrasound therapy**. Delft: Manufacturer of Enraf Nonius Equipment, 1986.

HOROWITS, R.; KEMPNER, E.S.; BISHOP, M. E.; PODOLSKY, R. J. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. **Nature (Lond)**, v. 323, p. 160-64, 1986.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F. H. Muscle injuries and repair: current trends in research. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 84, n. 5, p. 822-32, 2002.

HWANG, J. H.; RA, Y.; LEE, K. M.; LEE, J. Y.; GHIL, S. H. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 87, n. 1, p. 20-6, 2006.

ITOH, Y.; SUZUKI, T.; KIMURA, S.; OHASHI, H.; HIGUCHI, H.; SAWADA, H.; SHIMIZU, T.; SHIBATA, M.; MARUYAMA, K. Extensible and less-extensible domains of connectin filaments in stretched vertebrate skeletal muscle sarcomeres as detected by immunofluorescence and immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies. **Journal of Biochemistry**, v. 104, n. 4, p. 504-508, 1988.

JÄRVINEN, M.; SOVARI, T. Healing of crush injury in rat striated muscle. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology**, v. 83, n. 3, p. 269–82, 1975.

JÄRVINEN, M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. **Acta Chirurgica Scandinavica**, v. 142, n. 1, p. 47-56, 1976.

JARVINEN, T. A. H.; KAARIAINEN, M.; JARVINEN, M.; KALIMO, H. I. Muscle strain injuries. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 12, n. 2, p. 155-161, 2000.

JARVINEN, T. A. H.; JARVINEN, T. L. N.; KAARIAINEN, M.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle Injuries. Biology and treatment. **American Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 5, p. 745- 64, 2005.

JARVINEN, T. A.; JARVINEN, T. L. N.; KAARIAINEN, M.; AARIMAA, V.; VAITTINEN, S.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle Injuries: Optimising recovery. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 2, p. 317-331, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KANNUS, R.; JÖZSA, L.; RENSTRÖM, R.; JÄRVTOEN, M.; KVIST, M.; LENTO, M.; OJA, P.; VUORL, I. The effects of training, immobilization and remobilization on musculoskeletal tissue. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 2, n. 3, p. 100-8, 1992.

KARNES, J.L.; BURTON, H.W. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction induced skeletal muscle damage in rats. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 83, n. 1, p.1-4, 2002.

KERKHOFFS, G. M. N. J.; VAN ES, N.; WIELDRAAIJER, T.; SIEREVELT, I. N.; EKSTRAND, J.; VAN DIJK, C. N. Diagnosis and prognosis of acute hamstring injuries in athletes. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 21, n. 2, p. 500-9, 2013.

KETEYIAN, S. J.; FOSS, M. L. **Bases fisiológicas do exercício e do esporte – Fox**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KIMBALL, S. R.; VARY, T. C.; JEFFERSON, L. S. Regulation of protein synthesis by insulin. **Annual Review of Physiology**, v. 56, n. 1, p. 321-48, 1994.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, 1998.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. A review of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v. 76, n. 10, p. 593-600, 1990.

KIERSZENBAUM, A.; TRES, L.L. *Histology and Cell Biology*. 3 ed. Philadelphia: Elsevier; 2011.

KJAER M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical load. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 649-98, 2004.

KNIGHT, C. A.; RUTLEDGE, C. R.; COX, M. E.; ACOSTA, M.; HALL, S. J. Effect of superficial heat, deep heat, and active exercise warm-up on the extensibility of the plantar flexors. **Physical Therapy**, v. 81, n. 6, p.1206-14, 2001.

KOH, T. J. Do adaptations in serial sarcomere number occur with strength training? **Human Movement Science**, v. 14, n. 1, p. 61-77, 1995.

KONDO W, DAL LAGO EA, FRANCISCO JC, SIMEONI RB, NORONHA L, MARTINS APC, DE AZEVEDO MLV, FERREIRA CC, MAESTRELLI P, OLANDOSKI M, GUARITA-SOUZA LC, DO AMARAL VF. Effect of the bone marrow derived-mononuclear stem cells transplantation in the growth, VEGF-R and TNF-alpha expression of endometrial implants in Wistar rats. **European Journal Obstetric Gynecology Reproduction of Biology**, v. 158, n. 2, p. 298-304, 2011.

KONNO, E. V. B.; ALVES, E. D. P.; BERTOLINI, G. R. F.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Remobilização por alongamento estático cíclico em músculo sóleo de ratos imobilizados em encurtamento. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 2, p. 122-25, 2008.

KNOTT, M.; VOSS, D. E. **Proprioceptive neuromuscular facilitation**. New York: Harper e Row, 1968.

KOKKONEN, J; NELSON, A.G.; ELDREDGE, C.; WINCHESTER, J.B. Chronic static stretching improves exercise performance. **Medicine and Science Sports and Exercise**. v.39, n.10, p.1825-31, 2007.

KOKKONEN, J; NELSON, AG, CORNWELL A. Acute muscle stretching inhibits maximal strength performance. **Research Quartely for Exercise and Sport**. v. 69, n. 4, p. 411-15, 1998.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. Fundamentals of Resistance Training: Progression and Exercise Prescription. **Physical Fitness and Performance**, v. 36, n. 4, p. 674-88, 2004.

LAPOINTE, B. M.; FRÉMONT, P.; CÔTÉ, C. H. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment duration and time of onset on recovery from exercise-induced muscle damage in rats. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 84, n. 5, p. 651-55, 2003.

LARSEN, A.; KRISTENSEN, G.; THORLACIUS-USSING, O.; OXLUND, H. The influence of ultrasound on the mechanical properties of healing in rabbits. **Acta Orthopaedica**, v. 76, n. 2, p. 225-30, 2005.

LAZARIDES, E.; HUBBARD, B. D. Immunological characterization of the 100 Å filaments from muscle cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 73, n. 12, p. 4344–48, 1976.

LEECH, SJ. Review of muscle healing. **New Zeland Journal of Physiotherapy**, v. 25, p. 15-18, 1997.

LEHTO, M. U. K.; JARVINEN, M. J. Muscle Injuries, their healing process and treatment. **Annales Chirurgiae et Gynaecologiae**, v. 80, n. 2, p. 102-8, 1991.

LEHTO, M. U. K.; DUANCE, V. C.; RESTALL, D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. **Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume**, v. 67, n. 5, p. 820-28, 1985.

LI, Z.; MERICKSKAY, M.; AGBULUT, O.; BUTLER-BROWNE, G.; CARLSSON, L.; THORNELL, L.; BABINET, C.; PAULIN, D. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 1, p. 129–144, 1997.

LIEBER, R. L.; THORNELL, L. E.; FRIDEN, J. Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contraction. **Journal of Applied Physiology**, v. 80, n. 1, p. 278-84, 1996.

LIEBER, R. L. **Skeletal muscle structure, function and plasticity**. 2nd ed. United States: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

LOMAX, M. E.; MCCONNELL, A. K. Inspiratory muscle fatigue in swimmers after a single 200 m swim. **Journal of Sport Science**, v. 21, p. 659-64, 2003.

LOPES, A. S.; KATTAN, R.; COSTA, S.; MOURA, C. E. Estudo clínico e classificação das lesões musculares. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 28, n.10, p. 707-17, 1994.

LOPES, L. G.; BERTOLINI, S. M. M. G.; MARTINS, E. R.; GEWEHR, P.; LOPES, M. S. Análise morfométrica de tecido muscular de coelhos submetidos a ultra-som pulsado e contínuo de 1 MHz. **Fisioterapia e Pesquisa**; v. 12, n. 3, p. 15-21, 2005.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia explicada**. São Paulo: Manole, 2001.

MAGNUSSON, S. P.; SIMONSEN, E. B.; AAGAARD, P.; GLEIM, G. W.; MCHUGH, M. P.; KJAER, M. Viscoelastic response to repeated static stretching in the human

hamstring muscle. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 5, n. 6, p. 342-47, 1995.

MAGNUSSON, S. P.; SIMONSEN, E. B.; AAGAARD, P.; KJAER, M. Biomechanical responses to repeated stretches in human hamstring muscle in vivo. **American Journal of Sports Medicine**, v. 24, n. 5, p. 622-28, 1996.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MANIOTIS, A. J.; CHEN, C. S.; INGBER, D. E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 94, n. 3, p. 849-54, 1997.

MASON, D.; DICKENS, V.; VAIL, A. Rehabilitation for hamstring injuries. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 17, n. 2, p. 191–192, 2007.

MARKET, C.D.; MERRICK, M. A.; KIRBY, T. E.; DEVOR, S. T. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 86, n. 7, p. 1304-10, 2005.

MARTINES, M. U.; DAVOLOS, M. R.; JUNIOR, M. J. O efeito do UST em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-56, 2000.

MASON, D.; DICKENS, V.; VAIL, A. Rehabilitation for hamstring injuries. **Cochrane database of systematic reviews**, v. 12, 2012.

MATANO, T.; TAMAI, K.; KUROKAWA, T. Adaptation of skeletal muscle in limb lengthening: a light diffraction study on the sarcomere length in situ. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 12, p.193-196, 1994.

MATTES, A. L. Active isolated stretching. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 1, n. 1, p. 28-33, 1996.

MATTIELLO-SVERZUT, A. C.; CARVALHO, L. C.; CORNACHIONE, A.; NAGASHIMA, M.; NEDER, L.; SHIMANO, A. C. Morphological effects of electrical stimulation and intermittent muscle stretch after immobilization in soleus muscle. **Histology Histopathology**, v. 21, p. 957-64, 2006.

MAXWELL, L. Therapeutic Ultrasound: its effect on the Cellular and Molecular Mechanisms on Inflammation and Repair. **Physiotherapy**, v. 78, n. 6, p. 21-6, 1992.

McHUGH, M. P.; NESSE, M. Effect of stretching on strength loss and pain after eccentric exercise. **Medicine Science in Sports and Medicine**, v. 40, n. 3, p. 566-73, 2008.

MENDIAS, C. L.; TATSUMI, R.; ALLEN, R. E. Role of cyclooxygenase-1 and -2 in satellite cell proliferation, differentiation, and fusion. **Muscle Nerve**, v. 30, n. 4, p. 497-500, 2004.

MENON, T.; CASAROLLI, L. M.; CUNHA, N. B.; SOUZA, B.; ANDRADE, P. H. M.; ALBUQUERQUE, C. E.; BERTOLINI, G. R. F. Influência do alongamento passivo em três repetições de 30 s a cada 48 horas em músculo sóleo imobilizado de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 6, p. 407-10, 2007.

MICHALANY J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3ª ed. São Paulo: Michalany, 1998.

MILNER, D. J.; MAVROIDIS, M.; WEISLEDER, N.; CAPETANAKI, Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, p. 1283–98, 2000.

MICHLOVITZ, S. L. **Modalities for therapeutic intervention**. 5th ed. Davis Company, 2012.

MINAMOTO, V. B.; BUNHO, S. R.; SALVINI, T. F. Regenerate rat skeletal muscle after periodic contusions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1447-52, 2001.

MINER, J. H.; LI, C.; MUDD, J. L. Composition and structural requirements for lamin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. **Development**, v.131, n. 10, p. 2246-57, 2004.

MIYABARA, E. H.; AOKI, M. S.; MORISCOT, A. S. Cyclosporin A preferentially attenuates skeletal slow-twitch muscle regeneration. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 559-63, 2005.

MOUGIOS, V. Reference intervals for serum creatine kinase in athletes. *Brazilian Journal of Sports Medicine*, v. 41, p. 674–678, 2007.

MUFTIC, M.; MILADINOVIC, K. Therapeutic ultrasound and pain in degenerative diseases of musculoskeletal system. **Acta Informatica Medica**, v. 21, n. 3, p. 3170-172, 2013.

NELSON, R. T.; BANDY, W. D. Eccentric training and static stretching improve hamstring flexibility of high school males. **Journal of Athletic Training**, v. 39, n. 3, p. 254-58, 2004.

NELSON, A.G.; KOKKONEN, J.; ARNALL, A. D. Acute muscle stretching inhibits muscle strength endurance performance. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.19, n. 2, p.338-43, 2005.

NIMNI, M. E.; HARKNESS, R. D. Molecular structure and function of collagen, in: Nimni ME . **Collagen**. Universidade de Wisconsin: CRC Press, 1988, p. 3–77.

NOAKES TD. Effect of exercise on serum enzyme activities in humans. *Sports Med*, v. 4, n. 4, p. 245-67, 1987.

NOONAN, T.; GARRETT, W. E. Muscle strain injury: diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgery**, v. 7, n. 4, p. 262-69, 1999.

OLIVEIRA, N. M. L., RAINERO, E. P., SALVINI, T. F. Three intermittent sessions of cryotherapy reduce the secondary muscle injury in skeletal muscle of rat. **Journal Sports Science & Medicine**, v. 5, p. 228-34, 2006.

OLSON, J. E.; STRAVINO, V. D. A review of cryotherapy. **Physical Therapy**, v. 52, n. 8, p. 840, 1972.

PATTON, B. L.; MINER, J. H.; CHIU, A. Y.; SANES, J. R. Distribution and functions of laminins in the neuromuscular system of developing, adult and mutant mice. **The Journal Cell Biology**, v. 139, n. 6, p. 1507-21, 1997.

PATTON, B. L.; CONNOL, A. M.; MARTIN, P. T.; CUNNINGHAM, J. M.; MEHTA, S.; PESTRONK, A.; MINER, J. H.; SANES, J. R. Distribution of ten laminin chains in dystrophy and regenerating muscles. **Neuromuscular Disorders**, v. 30, n. 6, p. 442-60, 1999.

PAULA, J. L. UST terapêutico: considerações gerais. **Fisioterapia em Movimento**, v. 7, n. 1, p. 9-16, 1994.

PESTANA, P. R. D.; ALVES, A. N.; FERNANDES, K. P. S.; SILVA JUNIOR, J. A.; FRANÇA, C. M.; MARTINS, M. D.; et al. O efeito da natação na expressão de fatores regulatórios miogênicos durante o reparo musculoesquelético de rato. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 18, n.6, p. 419-22, 2012.

PEVIANE, S. M.; GOMES, A. R. S.; MOREIRA, R. F. C.; MORISCOT, A. S.; SALVINI, T. F. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, v. 35, n. 3, p. 363-70, 2007.

PIEIDADE, M. C. B.; GALHARDO, M. S.; BATTEHNER, C. N.; FERREIRA, M. A.; CALDINI, E. G.; TOLEDO, S. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. **Ultrasonics**, v. 48, n. 5, p. 403-11, 2008.

POLIZELLO, J. C.; CARVALHO, L. C.; FREITAS, F. C.; PADULA, N.; SHIMANO, A. C.; MATIELLO-SVERZUT, A. C. Propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas, imobilizado e posteriormente submetido a diferentes protocolos de alongamento. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 3, p. 195- 9, 2009.

PRENTICE, W. E. **Modalidades Terapeuticas em Medicina Esportiva**. São Paulo: Manole, 2002.

RANTANEN, J.; THORSSON, O.; WOLLNER, P.; HURME, T.; KALIMO, H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 27, n. 54, p. 54-9, 1999.

REED, B.; ASHIKAGA, T. The effects of heating with ultrasound on knee joint displacement. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 26, n. 3, p.131-7, 1997.

REHER, P.; DOAN, N.; BRADNOCK, B.; MEGHJI, S.; HARRIS, M. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. **Cytokine**, v. 11, n. 6, p. 416-23, 1999.

REURINK G.; GOUDSWAARD, G. J.; TOL, J. L.; VERHAAR, J. A. N.; WEIR, A.; MOEN, M. H. Therapeutic interventions for acute hamstring injuries: a systematic review. **British Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 2, p. 103-9, 2012.

RETTIG, A. C.; MEYER, S., BHADRA, A. K. Platelet-Rich Plasma in Addition to Rehabilitation for Acute Hamstring Injuries in NFL Players: Clinical Effects and Time to Return to Play. **Orthopedic Journal Sports Medicine**, v. 1, p. 1-5, 2013.

ROBERTSON, V. J.; BAKER, K. G. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. **Physical Therapy**, v. 81, n. 7, p. 1339-50, 2001.

ROBERTS, M.; RUTHERFORD, J. H.; HARRIS, D. The effect of ultrasound on flexor tendon repairs in the rabbit. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 72, n. 3, p. 433, 1983.

ROBERTS, J. M.; WILSON, K. Effect of stretching duration on active and passive range of motion in the lower extremity. **British Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 4, p. 259-63, 1999.

ROBINSON, S. E.; BUONO, M. J. Effect of continuous-wave ultrasound on blood flow in skeletal muscle. **Physical Therapy**, v. 75, p. 145-49, 1995.

ROBINSON, T. F.; WINEGRAD, S. Variation of thin filament length in heart muscle. **Nature**, v. 267, n. 5606, p. 74 – 75, 1977.

ROCHA, W. A.; GOBBI, G. A.; ARAUJO, V. F.; SANTUZZI, C. H.; COUTINHO, G. C.; NOGUEIRA, B. V.; GONÇALVES, W. L. S. Alterações morfofuncionais musculares em resposta ao alongamento passivo em modelo animal de imobilização prolongada de membro posterior. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 6, p. 450-54, 2010.

RUBIN, M. J.; ETCHISON, M. R.; CONDRA, K. A.; FRANKLIN JR, T. D.; SNOODY, A. M. Acute effects of ultrasound on skeletal muscle oxygen tension, blood flow, and capillary density. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 16, n. 3, p. 271–77, 1990.

RYAN, E. D.; BECK, T. W.; HERDA, T. J.; HULL, H. R.; HARTMAN, M. J.; COSTA, P. B.; DEFREITAS, J. M.; STOUT, J. R.; CRAMER, J. T. Do practical durations of stretching alter muscle strength? A dose-response study. **Medicine Science in Sports Exercise**, v. 40, n. 8, p.1529-1537, 2008.

SALVINI, T. F.; COUTINHO, E. L.; RUSSO, T. L.; DELUCA, C. One-minute bouts of passive stretching after immobilization increase sarcomerogenesis in rat soleus muscle. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 271-77, 2006.

SANGER, J. W.; CHOWRASHI, P.; SHANER, N. C.; SPALTHOFF, S.; WANG, J.; FREEMAN, N. L. and SANGER, J. M. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 403, p.153-62, 2002.

SCHASER, K. D.; DISCH, A. C.; STOVER, J. F.; LAUFFER, A.; BAIL, H. J.; MITTLMEIER, T. Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. **American Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 1, p. 93-102, 2007.

SECCHI, K. V.; MORAIS, C. P.; CIMATTI, P. F.; TOKARS, E.; GOMES, A. R. S. Efeito de alongamento e do exercício contra-resistido no musculoesquelético de rato. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.12, n. 3, p. 228-34, 2008.

SEGAL, R. L.; SONG, A. W. Nonuniform activity of human calf muscles during an exercise task. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 86, n. 10, p. 2013-7, 2005.

SESTARE, T. H. I., MINAMOTO, V. B. Adaptação muscular após contusão: análise da área e tipos de fibras. **Fisioterapia em Movimento**, v. 19, n. 2, p. 109-14, 2006.

SHAH, S. B.; PETERS, D.; JORDAN, K. A.; MILNER, D. J.; FRIDÉN, J.; CAPETANAKI, Y.; LIEBER, R. L. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin null mouse skeletal muscle. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 10, p.1703-10, 2001.

SHAH, S. B.; DAVIS, J.; WEISLEDER, N.; KOSTAVASSILI, I.; MCCULLOCH, A. D.; RALSTON, E.; CAPETANAKI, Y.; LIEBER, R. L. Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. **Biophysical Journal**, v. 86, n. 5, p. 2993–3008, 2004.

SHAH, S. B.; LOVE, J. M.; O'NEILL, A.; LOVERING, R. M.; BLOCH, R. J. Influences of desmin and keratin on passive biomechanical properties of mouse skeletal muscle. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-12, 2012.

SHU, B.; YANG, Z.; XIANGPING, L.; ZHANG, L. Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 62, n. 2, p. 329–36, 2012.

SMITH, C.; KRUGER, M. J.; SMITH, R. M.; MYBURG, K. H. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. **Sports Medicine**, v. 38, n. 11, p. 947-69, 2008.

SMYTHE, G. M.; DAVIES, M. J.; PAULIN, D.; GROUNDS, M. D. Absence of desmin slightly prolongs myoblast proliferation and delays fusion in vivo in regenerating grafts of skeletal muscle. **Cell and Tissue Research**, v. 304, n. 2, p. 287-94, 2001.

SOROKIN, L. M.; MALEY, M. A. L.; MOCH, H.; MARK, H. V. D.; MARK, K. V. D.; CADALBERT, L.; KAROSI, S.; DAVIES, M. J.; MCGEACHIE, J. K.; GROUNDS, M. D. Laminin $\alpha 4$ and Integrin $\alpha 6$ Are Upregulated in Regenerating *dy/dy* Skeletal Muscle: Comparative Expression of Laminin and Integrin Isoforms in Muscles Regenerating after Crush Injury. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 500–14, 2000.

STARKEY, C. **Therapeutic modalities**. FA Davis Company; 2001.

STAUBER, W. T.; MILLER, G. R.; GRIMMETT, J. G.; KNACK, K. K. Adaptation of rat soleus muscle to 4 wk of intermittent strain. **Journal Applied of Physiology**, v. 77, p. 58-62, 1994.

STRATTON, S. A.; HECKMANN, R.; FRANCIS, R. S. Therapeutic ultrasound, its effects on the integrity of an on penetrating wound. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 5, n. 5, p. 278-81, 1984.

SURBURG, P. R.; SCHRADER, J. W. Proprioceptive neuromuscular facilitation techniques in sports medicine. A Reassessment. **Journal of Athletic Training**, v. 32, n. 1, p. 34-39, 1997.

SVZERZUT, A. C. M.; CHIMELLI, L. O papel das células satélites nas respostas adaptativas do tecido muscular esqueléticos. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, v. 6, n. 2, p. 132-139, 1999.

TABARY, J. C.; TABARY, C.; TARDIEU, C.; TARDIEU, G.; GOLDSPINK, G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. **The Journal of Physiology**, v. 224, N. 1, p. 231-44, 1972.

TAMAI, K.; KUROKAWA, T.; MATSUBARA, I. In situ observation of adjustment of sarcomere length in skeletal muscle under sustained stretch. **Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi**, v. 63, n. 12, p.1558-63, 1989.

TARDIEU, C.; TABARY, J. C.; TABARY, C.; HUET DE LA TOUR, E. Comparison of the sarcomere number adaptation in young and adult animals. **Journal de Physiologie**, v. 73, n. 8, p. 1045-55, 1977.

TATSUMI, R.; SHEEHAN, S. M.; IWASAKI, H.; HATTORI, A.; ALLEN, R. E. Mechanical Stretch Induces Activation of Skeletal Muscle Satellite Cells *in Vitro*. **Experimental Cell Research**, v.267, n. 1, p.107–114, 2001.

TATSUMI, R.; LIU S.; PULIDO, A.; MORALES, M.; SAKATA, T. DIAL, S.; HATTIORI, A.; IKEUCHI Y.; ALLEN, R. E. Satellite cell activation in stretching skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 209, n. 6, p. 1487-94, 2006.

TAYLOR, D. C.; DALTON JR, J. D.; SEABER, A. V.; GARRETT JR, W. E. Viscoelastic properties of muscle-tendon units: The biomechanical effects of stretching. **American Journal of Sports Medicine**, v. 18, n. 3, p. 300-8, 1990.

TER HAAR, G. Therapeutic applications of ultrasound. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 93, n. 1-3, p. 111-129, 2007.

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.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. 345–53, 2005.

TIMPL, R.; TISI, D.; TALTS, J. F.; ANDAC, Z.; SASAKI, T.; HOHENESTER, E. Structure and function of laminina LG modules. **Matrix**, v. 19, n. 4, p. 309-17, 2000.

TORRES, R. J. A.; MAIA, M.; NORONHA, L.; FARAH, M. E.; LUCHINI, A.; BRIK, D.; MUCCIOLI, C.; PRÉCOMA, D. B. Avaliação das alterações precoces na coróide e esclera ocorridas em coelhos hipercolesterolêmicos. Estudo histológico e histomorfométrico. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 72, n 1, p. 68-74, 2009.

TORRES, R.; RIBEIRO, F.; DUARTE, J. A.; CABRI, J. M. H. Evidence of the physiotherapeutic interventions used currently after exercise-induced muscle damage: Systematic review and meta-analysis. **Physical Therapy in Sport**, v. 13, n. 2, p. 101-14, 2012.

TOUMI, H.; FGUYER, S.; BEST, T. M. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. **Journal of Anatomy**, v. 208, p. 459-70, 2006.

VIEIRA, W. B. H.; AGUIAR, K. A.; SILVA, K. M.; CANELA, P. B.; SILVA, F. S.; ABREU, B. J. Overview of ultrasound usage trends in orthopedic and sports physiotherapy. **Critical Ultrasound Journal**, v. 4, n. 11, p. 2-8, 2012.

WAKAMATSU, A.; SIMÕES, A. B.; KANAMURA, C. T. **Manual de imunohistoquímica**. Sociedade Brasileira de Patologia, 1995, 99p.

WANG, K.; WRIGHT, J. K.; JENNATE, B.; RAMINEZ-MITCHELL, R. Viscoelasticity of sarcomere matrix of skeletal muscles: the titin myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. **Biophysics Journal**, v. 64, n. 4, p.1161–77, 1993.

WANG, K.; WRIGHT, J.; RAMIREZ-MITCHELL, R. Architecture of the titin/nebulin containing cytoskeletal lattice of the striated muscle sarcomere: evidence of elastic and inelastic domains of the bipolar filaments. **Biophysics**, v. 47, n. 2, p. 349a, 1985.

WHATMAN, C.; KNAPPSTEIN, A.; HUME, P. Acute changes in passive stiffness and range of motion post stretching. **Physical Therapy in Sport**, v. 7, n. 4, p. 195-200, 2006.

WEPLER, C. F.; MAGNUSSON, S. P. Increasing Muscle Extensibility: A Matter of Increasing Length or Modifying Sensation? **Physical Therapy**, v. 90, n. 3, p. 438-449, 2010.

WESSLING, K. C.; DEVANE, D. A.; HYLTON, C. R. Effects of static stretch versus static stretch and ultrasound combined on triceps surae muscle extensibility in healthy women. **Physical Therapy**, v. 67, n. 5, p. 674-9, 1987.

WHITING, A.; WARDALE, J.; TRINICK, J. Does titin regulate the length of muscle thick filaments? **Journal of Molecular Biology**, v. 205, n. 1, p. 263-68, 1989.

WILKIN, L. D.; MERRICK, M. A.; KIRBY, T. E.; DEVOR, S. T. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. **Journal of Sports Medicine**, v. 25, n. 1, p. 73-7, 2004.

WILLIAMS, P.; GOLDSPINK, G. Longitudinal growth of striated muscle fibers. **Journal of Cell Science**, v. 9, n. 3, p. 751-67, 1971.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. **Journal of Anatomy**, v. 116, n. 1, p. 45-55, 1973.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. **Journal of Anatomy**, v. 127, n. 3, p. 459-68, 1978.

WILLIAMS, P. E. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 47, n. 12, p. 1014-16, 1988.

WILLIAMS, P. E. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 49, n. 5, p. 316-17, 1990.

WILLY, R. W.; KYLE, B. A.; MOORE, S. A.; CHLEBOUN, G. S. . Effect of cessation and resumption of static hamstring muscle stretching on joint range of motion. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 31, n. 3, p. 138-44, 2001.

WONG, R. A.; SCHUMANN, B.; TOWNSEND, R.; PHELPS, C. A. A Survey of Therapeutic Ultrasound Use by Physical Therapists Who Are Orthopaedic Certified Specialists. **Physical Therapy**, v. 87, n. 8, p. 986-94, 2007,

YANG, S.; ALNAQEEB, M.; SIMPSON, H.; GOLDSPINK, G. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. **Journal of Anatomy**, v. 190, n. 4, p. 613-22, 1997.

YOUNG, S. **Terapia por ultrassom**. In: _____. Kitchen Sheila; Bazin Sarah. Eletroterapia de Clayton. 10. ed. São Paulo: Manole, 1998, p. 235-58.

YOUNG, S. R.; DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 16, n. 3, p. 261–69, 1990.

ZAKAS, A.; BALASKA, P.; GRAMMATIKOPOULOS, M. G. L. Acute effects of stretching duration on the range of motion of elderly women. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 9, n. 4, p. 270-76, 2005.

ZEHLIN, L. I.; MERICKSKAY, M.; AGBULUT, O.; BUTLER-BROWNE, G.; CARLSSON, L.; THORNELL, L. E.; BABINET, C.; PAULIN, D. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation and fusion of skeletal muscle. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 1, p. 129-44, 1997.

ZITO, M.; DRIVER, D.; PARKER, C.; BOHANNON, R. Lasting effects of one bout of two 15-second passive stretches on ankle dorsiflexion range of motion. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 26, n. 4, p. 214-21, 1997.

ANEXOS

ANEXO I

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA M EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 491

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.040616/2010-25

APROVADO: 05/10/2010 – R.O. 09/2010

TÍTULO: Estudo comparativo morfológico e imunohistoquímico entre diferentes métodos de tratamento da contusão muscular de gastrocnêmio em ratos

AUTORES: Anna Raquel Silveira Gomes, Ana Carolina Brandt de Macedo, Julye Leão Ywazaki, Viviane Prodócimo, Tatiana Cidral da Costa, Claudia Marino

DEPARTAMENTO: UFPR Setor Litoral


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA

ANEXO II

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS:

- 1- MACEDO ACB; Pacheco J; Blum S; Ywazaki JL; Gomes ARS. Efeitos agudos do alongamento muscular do gastrocnêmio após contusão em ratos. 10ª Jornada Paraense de Traumatologia e Ortopedia. SULBRAFITO e XII Congresso Paranaense de Ortopedia e Traumatologia - SBOT – PR. 2012.
- 2- MACEDO, ACB, Prodocimo, V, Ywazaki, JL, Gomes, ARS. Efeito do UST pulsado e do alongamento no tratamento da contusão muscular em ratos, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Evento: XIX Congresso Brasileiro de Fisioterapia-COBRAF.

PREMIAÇÃO DE TRABALHO EM REUNIÃO CIENTÍFICA

Premiação 2º Lugar Poster. MACEDO ACB; Pacheco J; Blum S; Ywazaki JL; Gomes ARS. Efeitos agudos do alongamento muscular do gastrocnêmio após contusão em ratos. 10ª Jornada Paraense de Traumatologia e Ortopedia. SULBRAFITO e XII Congresso Paranaense de Ortopedia e Traumatologia - SBOT – PR. 2012.

MANUSCRITO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

- 1- Ana Carolina Brandt de Macedo, Julye Leiko Ywazaki, Jaqueline Pacheco, Sibelly Gonçalves; Anna Raquel Silveira Gomes. Efeitos agudos do alongamento muscular do gastrocnêmio após contusão em ratos. Revista Fisioterapia e Pesquisa.

MANUSCRITOS SUBMETIDOS:

- 1- Ana Carolina Brandt de Macedo, Julye Leiko Ywazaki, Jaqueline Pacheco, Sibelly Gonçalves; Carolina Cantuário, Tallyta Camargo, Rafael Michel de Macedo, Lucia Noronha, Anna Raquel Silveira Gomes. Estudo comparativo

morfológico entre diferentes métodos de tratamento da contusão muscular de gastrocnemio em ratos. Revista Brasileira de Medicina do Esporte.

- 2- Ana Carolina Brandt de Macedo, Julye Leiko Ywazaki, Ana Paula Camargo Martins, Marina Luise Viola de Azevedo; Rafael Michel de Macedo, Lucia Noronha, Anna Raquel Silveira Gomes. Immune-histochemical study of the effects of ultrasound and stretching on muscle contusions in wistar rats. *Ultrasound in Medicine & Biology*.