



**COPPE/UFRJ**

BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA PARA CARACTERIZAÇÃO  
BIOMECÂNICA DO TRÍCEPS SURAL SAUDÁVEL E LESIONADO DE RATOS

Carolina Carneiro Peixinho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: João Carlos Machado

Lilium Fernandes de Oliveira

Rio de Janeiro

Março de 2010

BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA PARA CARACTERIZAÇÃO  
BIOMECÂNICA DO TRÍCEPS SURAL SAUDÁVEL E LESIONADO DE RATOS

Carolina Carneiro Peixinho

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO  
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA  
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Examinada por:

---

Prof. João Carlos Machado, Ph.D.

---

Prof. Liliam Fernandes de Oliveira., D.Sc.

---

Prof Marco Antonio von Krüger, Ph.D.

---

Prof. Tânia de Fátima Salvini, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2010

Peixinho, Carolina Carneiro

Biomicroscopia Ultrassônica para Caracterização Biomecânica do Tríceps Sural Saudável e Lesionado de Ratos/ Carolina Carneiro Peixinho. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2010.

X, 74 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: João Carlos Machado

Liliam Fernandes Oliveira

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2010.

Referencias Bibliográficas: p. 75-82.

1. Biomicroscopia Ultrassônica. 2. Arquitetura Muscular. 3. Lesão Muscular. I. Machado, João Carlos *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

## **Dedicatória**

À minha família, por toda a luz que me envolve.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador João Carlos Machado, pela presença e atenção constantes e pela permanente prestreza na resolução das dificuldades encontradas.

À minha orientadora Liliam Fernandes de Oliveira, pela compreensão, sugestões, apoio, viagens, e indicação do caminho.

À professora Célia Resende, que além de permitir o uso do aparelho de Biomicroscopia Ultrassônica e assim a conclusão da dissertação, acompanhou e guiou com entusiasmo os testes desenvolvidos.

Aos responsáveis do Laboratório de Biologia Muscular e do Exercício/EEFD/UFRJ pelos animais utilizados no trabalho e aos seus alunos, especialmente Marcelo Baldanza Ribeiro e Anderson Ferreira da Silva Porto, pela enorme e sempre presente ajuda com os ratos durante todos os testes.

Aos professores do PEB-COPPE pelos conhecimentos compartilhados.

Aos colegas e amigos do PEB, e especialmente aos do LABMUSC, por todos os momentos compartilhados ao longo dos anos do mestrado.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA PARA CARACTERIZAÇÃO  
BIOMECÂNICA DO TRÍCEPS SURAL SAUDÁVEL E LESIONADO DE RATOS

Carolina Carneiro Peixinho

Março/2010

Orientadores: João Carlos Machado

Liliam Fernandes de Oliveira

Programa: Engenharia Biomédica

Este trabalho visa, através da técnica de Biomicroscopia Ultrassônica (BMU), acompanhar o processo de degeneração-regeneração consequente de lesão por laceração induzida nos músculos gastrocnêmio (GAS) e solear (SOL) de ratos. As imagens de BMU (40 MHz) foram usadas para a caracterização biomecânica do tecido muscular pela quantificação do ângulo de penação (AP) e espessura muscular (EM). Os animais foram distribuídos em 3 grupos: GV=grupo de variabilidade (n=5), GG=grupo de lesão no GAS (n=6) e GS = grupo de lesão no SOL (n=5). O GV foi usado para análise da variabilidade e confiabilidade das medidas (coeficientes de variação de 9,37 e 3,97% para AP e EM, respectivamente). Os ratos de GG e GS foram submetidos ao protocolo de lesão nos músculos GAS e SOL da pata direita, respectivamente. Foram obtidas imagens de BMU dos músculos das duas patas nas condições: antes e após lesão (imediatamente, 7, 14, 21 e 28 dias). Para a pata não-lesionada, o AP aumentou em 28 dias: de 10,68 para 16,53° (GG) e de 9,65 para 14,06° (GS) ( $p < 0,05$  para os dois grupos). Adicionalmente, houve tendência de aumento de EM: de 2,92 para 3,13mm (GG) e de 2,12 para 2,35mm (GS). A pata lesionada manteve os valores pré-lesão. Sugere-se uma resposta hipertrófica compensatória adaptativa à condição de sobrecarga aumentada na pata saudável. Os dados indicam que a BMU permite a discriminação qualitativa e quantitativa do músculo nas condições saudável e em diferentes momentos após a lesão.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

ULTRASOUND BIOMICROSCOPY FOR BIOMECHANICAL  
CHARACTERIZATION OF HEALTHY AND INJURED TRICEPS SURAE OF  
RATS

Carolina Carneiro Peixinho

March/2010

Advisors: João Carlos Machado

Liliam Fernandes de Oliveira

Department: Biomedical Engineering

This work aims the use of Ultrasound Biomicroscopy (UBM) to follow up the degeneration-regeneration process due to a laceration injury induced in gastrocnemius (GAS) and soleus (SOL) muscles of rats. UBM (40MHz) images were acquired and used for biomechanical characterization of muscular tissue through pennation angle (PA) and muscle thickness (MT). The animals were distributed in 3 groups: VG=variability group (n=5), GG=gastrocnemius injured group (n=6) and SG=soleus injured group (n=5). VG was used to assess data variability and reliability (coefficients of variation of 9.37 and 3.97% for PA and MT, respectively). GG and SG rats were submitted to the injury protocol in GAS and SOL muscles of the right legs, respectively. UBM images of muscles of both legs were acquired at the following conditions: before and after injury (immediately, 7, 14, 21 and 28 days). It was observed an increase of PA for the non-injured leg 28 days after injury for both groups (GG= 10,68 to 16,53° e SG = 9,65 to 14,06°;  $p < 0.05$ ). Additionally, MT had a tendency to increase (GG = 2,92 to 3,13mm e GS = 2,12 to 2,35mm). Injured legs maintained PA and MT pre-injury values. It is suggested a compensatory hypertrophic response due to the overload condition imposed to healthy leg. The results indicate that UBM allows qualitative and quantitative muscle differentiation among healthy and injured muscle at different stages after lesion.

## Índice

	Página
Capítulo 1: <b>INTRODUÇÃO</b>	1
Capítulo 2: <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	4
2.1 – OBJETIVOS	7
2.1.1 – <i>Objetivos Gerais</i>	7
2.1.2 – <i>Objetivos Específicos</i>	7
Capítulo 3: <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	9
3.1 – BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA	9
3.1.1 - <i>Sistema de BMU para imagem de alta resolução</i>	9
3.2 – MÚSCULO ESQUELÉTICO	11
3.2.1 - <i>Tríceps Sural</i>	12
3.2.2 - <i>Anatomia Muscular em Ratos</i>	12
3.3 – CARACTERÍSTICAS BIOMECÂNICAS	17
3.4 – ARQUITETURA MUSCULAR	17
3.4.1 - <i>Definição e Implicações Fisiológicas</i>	17
3.4.2 – <i>Ângulo de Penação</i>	20
3.4.3 – <i>Espessura Muscular</i>	20
3.4.4 - <i>Adaptação dos Parâmetros Arquitetônicos a Condições de Uso Aumentado e Desuso</i>	21
3.5 – LESÃO MUSCULAR	23
3.6 – REGENERAÇÃO MUSCULAR	24
3.6.1 – <i>Fase de Destruição</i>	25
3.6.1.1 – <i>Necrose das Miofibrilas</i>	25
3.6.1.2 – <i>Inflamação</i>	25



3.6.2 – <i>Fases de reparo e remodelagem</i>	26
3.6.2.1 – Regeneração das Miofibrilas	26
3.6.2.2 – Formação da Cicatriz de Tecido Conectivo	27
3.7 – MODELOS DE ESTUDO EM LESÕES MUSCULARES	28
3.7.1 – <i>Método de Lesão Muscular por Laceração</i>	29
<b>Capítulo 4: MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1 – INSTRUMENTAÇÃO DE BMU	31
4.2 – ANIMAIS	33
4.2.1 – <i>Grupo de Variabilidade e</i> <i>Confiabilidade das Medidas (GV)</i>	33
4.2.2 – <i>Grupos de Lesão (GG e GS)</i>	34
4.3 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA LESÃO MUSCULAR POR LACERAÇÃO	34
4.4 – QUANTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOMECÂNICOS DA ARQUITETURA MUSCULAR	37
4.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
<b>Capítulo 5: RESULTADOS</b>	<b>44</b>
5.1 – IMAGENS	44
5.2 – GRUPO GV	47
5.3 – GRUPO GG	50
5.4 – GRUPO GS	54
<b>Capítulo 6: DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>Capítulo 7: CONCLUSÃO</b>	<b>66</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>67</b>

## Índice de Símbolos

AP	Ângulo de Penação
BMU	Biomicroscopia Ultrassônica
EM	Espessura Muscular
GAS	Gastrocnêmio
GG	Grupo de Lesão no Gastrocnêmio Lateral
GL	Gastrocnêmio Lateral
GM	Gastrocnêmio Medial
GS	Grupo de Lesão no Solear
GV	Grupo de Variabilidade
SOL	Solear
TS	Tríceps Sural

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

A biomicroscopia ultrassônica (BMU) é uma técnica de geração de imagens de alta resolução cuja importância e aplicabilidade diferenciada têm sido evidenciadas por muitas pesquisas, nas áreas médica e biológica. Na medicina, suas aplicações e resultados mais notáveis podem ser encontrados nas áreas de: oftalmologia, ultrassom intravascular, dermatologia, entre outras [1, 2, 3]. O principal objetivo de sua aplicação na medicina consiste em prover imagens de alta resolução de tecidos saudáveis e doentes, *in vivo*, fornecendo informações importantes sem a necessidade de biópsia do tecido. No âmbito da biologia, as pesquisas buscam acompanhar o desenvolvimento de pequenos animais em estudos longitudinais e criar, a partir dos dados obtidos das imagens, modelos de doenças e lesões humanas.

As frequências utilizadas na maioria das aplicações variam de 40 a 60MHz, o que possibilita uma resolução, em profundidade, na ordem de micrômetros ( $\cong 30\mu\text{m}$  em 50MHz) [3, 4, 5], obtendo para pequenos animais imagens similares àquelas dos equipamentos de ultrassom usados para diagnósticos de lesões musculares em humanos.

A ultrassonografia de alta resolução se diferencia pela conjunção de características importantes: geração de imagens com resolução microscópica, não-invasividade, visualização de tecidos vivos em tempo real e baixa profundidade de penetração (em virtude da frequência ultrassônica elevada). Tais características indicam o potencial de sua utilização para gerar imagens de tecido muscular esquelético usando modelos animais.

Sabe-se que o músculo esquelético possui uma grande capacidade regenerativa [6, 7, 8, 9, 10, 11]. Todavia, o acometimento de lesões graves e/ou sucessivas (muito comum em atletas competitivos) acarreta em um ciclo de degeneração-regeneração que pode levar o indivíduo à perda de função muscular e ao quadro de fibrose [6, 7, 9, 11]. Isto pode gerar graus significativos de perda da capacidade motora que está associada a um maior tempo de recuperação e à impossibilidade de obter desempenhos compatíveis no âmbito profissional.

As características funcionais do músculo esquelético são altamente influenciadas pela arquitetura muscular, terminologia utilizada para referenciar algumas características estruturais como o arranjo das fibras musculares relativas ao eixo de geração de força do músculo [12], além de outros como o comprimento da fibra e espessura muscular. As relações das características biomecânicas da arquitetura são

importantes no que diz respeito à estimativa de produção de força muscular, e, conseqüentemente, na sua função. As relações força/comprimento e força/velocidade dependem do arranjo especial das fibras no músculo esquelético [12, 13,14, 15, 16, 17]. O ângulo de penação (AP) está relacionado com a quantidade de tecido contrátil e, juntamente com o comprimento das fibras, influencia a capacidade de produção de força, a velocidade de encurtamento do músculo e as propriedades elásticas do complexo músculo-tendão, quando consideradas também as propriedades físicas do tendão. Estes parâmetros arquitetônicos, inicialmente medidos em cadáveres, têm sido quantificados através de técnicas não-invasivas de imagens, como o ultrassom e a ressonância magnética [14, 15, 16, 18, 19, 20, 21].

Esta dissertação consiste na avaliação, *in vivo*, da extensão e da gravidade da lesão muscular, assim como do processo de regeneração, usando o rato, *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), como um modelo animal, tendo em vista a probabilidade de êxito e a importância dos dados pretendidos com o uso da BMU para a obtenção de imagens de ultrassonografia de alta resolução que serão usadas para o acompanhamento do desenvolvimento do músculo, quanto às suas características anatômicas e biomecânicas.

A metodologia empregada consiste na análise das imagens de BMU do tecido muscular e a conseguinte caracterização biomecânica, *in vivo*, deste tecido através da quantificação dos seguintes parâmetros: ângulo de penação e espessura muscular (EM). Embora haja muitos estudos sobre os diferentes tipos de tratamento propostos objetivando a redução do tempo de recuperação e o retorno ao estado anterior à lesão (sem sequelas ao tecido) não foram encontrados relatos sobre o acompanhamento longitudinal dos mesmos indivíduos após a lesão de forma controlada, ou seja, com protocolos de lesão e desenhos experimentais confiáveis. A BMU permite que este acompanhamento seja realizado *in vivo* e em indivíduos submetidos ao mesmo tipo de lesão, além de possibilitar a quantificação de parâmetros biomecânicos e suas alterações no processo de degeneração-regeneração durante tratamentos diferenciados.

Por fim, outra vantagem deste estudo deve-se ao fato de que o músculo esquelético figura entre os melhores tecidos adaptados ao exame ultrassônico [22] devido à possibilidade de abordagem multiplanar (transversal e longitudinal), à ótima resolução espacial e definição da estrutura muscular, e à facilidade de obtenção de imagens em condições ativas e passivas, dinâmicas e estáticas. A disponibilidade, o baixo custo e a facilidade experimental tornam a técnica de ultrassom superior à de ressonância magnética, principalmente no que se refere ao acompanhamento de lesões e

processos de regeneração com seus problemas relacionados, tais como fibrose, hematomas, e outros [22, 23, 24, 25, 26].

As avaliações *in vivo*, incluindo a ultrassônica, trazem um diferencial aos resultados tradicionais *in vitro*, já que a função muscular é analisada no contexto fisiológico real, com preservação das estruturas vasculares, neurais e demais componentes músculo-esqueléticos.

O capítulo 2 desta dissertação apresenta uma revisão da literatura acerca do uso da técnica de BMU, a caracterização biomecânica muscular em condições de uso aumentado e desuso e o papel da ultrassonografia na avaliação de lesões. O capítulo 3 descreve os fundamentos teóricos dos conceitos básicos inerentes ao tema. Já o capítulo 4 detalha os materiais e métodos utilizados na parte experimental da pesquisa, enquanto o capítulo 5 apresenta os resultados obtidos. No capítulo 6 é apresentada uma discussão baseada nos resultados e sua relação com a literatura recente e com os fundamentos teóricos e, finalmente, o capítulo 7 finaliza a dissertação com as conclusões.

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO DA LITERATURA

O ultrassom de alta frequência para a imagem de microestruturas já existe desde os anos 30, quando Sokolov foi o primeiro a propor o microscópio acústico [27]. Nos anos 70 houve uma grande esperança com a aplicabilidade da microscopia ultrassônica, através do desenvolvimento do microscópio acústico de varredura laser [28] e do microscópio acústico de varredura [29]. Esperava-se que o contraste (maior cerca de 2 ordens de magnitude se comparado com o contraste óptico de tecidos), inerente à microscopia acústica, complementasse os resultados obtidos com a microscopia óptica. Entretanto, isto não se verificou. Pelo fato da microscopia óptica já estar estabelecida como uma ferramenta de rotina, a microscopia acústica não teve seus períodos de glória. Somente a partir do final da década de 80 a utilização do ultrassom em alta frequência voltou a ser considerada. Tal situação ocorreu na medicina, pela possibilidade de se utilizar a microscopia acústica na obtenção de imagens de tecidos vivos. As aplicações clínicas logo se sucederam na oftalmologia [30], na dermatologia [31], e ultrassonografia intravascular [32].

A grande promessa oferecida pela BMU consiste na possibilidade de visualização e caracterização de tecidos não superficiais sem a necessidade de biópsia e conta com a possibilidade técnica da construção de transdutores miniaturizados para aplicações intracavitárias ou endoluminais.

A BMU legitimou sua importância em diversas áreas da medicina, como a dermatologia e a oftalmologia, mas não existem relatos da obtenção de imagens em tempo real e *in vivo* do músculo esquelético do rato. No entanto, outros trabalhos indicam a possibilidade de se obter êxito na obtenção dessas imagens, usando ultrassom de alta resolução. Por exemplo, a BMU já foi usada satisfatoriamente para estudar o desenvolvimento embrionário através de imagens *in utero* de pequenos animais (comumente são utilizados camundongos) [33]. A grande relevância destes estudos reside na possibilidade de compreender os mecanismos genéticos e os processos de diferenciação celular que levam à evolução dos diferentes órgãos. Estes conhecimentos podem propiciar a determinação da origem de muitas doenças, e o estabelecimento de tratamentos adequados. Por exemplo, Olsson *et al.* [4] utilizaram a BMU para acompanhar o implante de células no tubo neural de embriões de camundongos, e analisaram modificações na expressão genética durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. Liu *et al.* [34] usaram a BMU para guiar o implante de células tanto no

tubo neural como nas estruturas progenitoras dos membros, observando as alterações no desenvolvimento destas. Turnbull *et al.* [35] estudaram o desenvolvimento do tubo neural e algumas alterações genéticas, conseguindo resoluções de até 50µm (frequências entre 40 – 100 MHz), e construindo imagens 2D e 3D. Zhou *et al.* [36] utilizaram a BMU para visualizar o embrião em tempo real, durante a injeção de meio de contraste no coração. Estudos do desenvolvimento do globo ocular de embriões de camundongo foram realizados por Foster *et al.* [3] usando a BMU. Witte *et al.* [37] utilizaram a BMU para descrever a organização e a coordenação de fibras musculares individuais de ratos, avaliando os efeitos da fadiga em testes *ex vivo*.

Embora não existam relatos da obtenção de imagens em tempo real e *in vivo* do músculo esquelético do rato, outros trabalhos indicam esta possibilidade. O ultrassom de alta resolução já foi empregado para determinar lesões musculares em coelhos [38] e para descrever a coordenação de fibras musculares individuais de um rato e um camundongo, durante contração isométrica [37].

Sabe-se que o músculo esquelético possui uma grande capacidade regenerativa [6, 7, 8, 9, 10, 11]. O acompanhamento das mudanças morfológicas provocadas pela lesão e pelos diferentes tipos de tratamento aplicados *in vivo* é um grande passo na busca pelo esclarecimento dos mecanismos inerentes ao processo degeneração-regeneração. São muitos os tratamentos propostos objetivando a redução do tempo de recuperação e o retorno ao estado anterior à lesão sem seqüelas ao tecido.

A possibilidade de comparar valores quantitativos e relacioná-los às etapas do processo de regeneração muscular é outra grande vantagem da técnica de BMU. A caracterização biomecânica, *in vivo*, deste tecido através da quantificação do AP e da EM é comumente realizado em humanos [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 39, 40] e é um avanço no sentido de compreender a resposta muscular diante de uma lesão e de um processo degenerativo. Tais parâmetros biomecânicos são conhecidamente variáveis de entradas de modelos musculares para estimativas da força e avaliação da função muscular [15, 41, 42, 43], e o rastreamento das modificações dos mesmos permitirá inferir sobre o quadro de lesão e a recuperação do tecido.

O estudo da arquitetura muscular é de grande importância funcional, já que permite a avaliação da relação entre estrutura e função dos músculos, ou seja, a avaliação do grau de adaptação do aparato muscular para condições de cargas aumentadas ou reduzidas [14, 39, 40].

Até pouco tempo atrás, o conhecimento sobre a arquitetura muscular humana era baseado em medidas realizadas em cadáveres [44], cujas fibras musculares

encontravam-se, normalmente, encurtadas devido ao método de fixação e pela idade [45]. Com a introdução de técnicas de imagem não-invasivas, tornou-se possível o estudo da arquitetura muscular *in vivo* em repouso e suas mudanças durante o movimento [15, 46, 47, 48]. As duas técnicas que se provaram as mais úteis para este propósito foram a ressonância magnética e a ultrassonografia.

Há na literatura um número crescente de estudos descrevendo a utilização do ultrassom convencional de imagem para avaliação do sistema músculo-esquelético humano em diferentes aplicações, desde a caracterização biomecânica até a avaliação de lesões [23, 26, 49, 50, 51, 52, 53, 54]. A possibilidade conferida por imagens ultrassônicas de acompanhar mudanças nas características estruturais do músculo até mesmo durante o movimento é de extrema importância, e tem sido explorada cada vez mais.

Diversos tipos de anormalidades musculares podem ser detectadas pela ultrassonografia. Imediatamente após uma lesão, hematomas são vistos nas imagens ultrassônicas com contornos irregulares e hipocóicos em relação ao músculo, embora possam, por vezes, ter uma ecogenicidade similar à do tecido circundante. Neste caso há um diagnóstico equivocado de aumento do volume muscular [23,52]. Dois a três dias depois da lesão, o fluido será anecóico e, mais tarde, poderá se formar uma cicatriz hiperecólica, possivelmente associada a calcificações [23, 24, 52]. É comum a visualização de regiões ecogênicas, sem definições marcantes e com padrão heterogêneo, nas lesões reincidentes ou crônicas. Hashimoto *et al.* [52] sugerem a utilização do ultrassom de alta resolução para detecção de rupturas de grau I, nas quais a lesão não é severa e as alterações comprometem apenas as estruturas microscópicas do músculo (as fibras ao invés dos fascículos).

Várias condições anormais, como cicatrizes, cistos e miosite ossificante, podem ser desenvolvidas após a recuperação de uma ruptura muscular. Cicatrizes são irregulares ou anormalidades de forma estelar na imagem ultrassônica que não mudam sua aparência com a contração muscular. Cistos musculares aparecem como estruturas ovais ou circulares anecóicas ou hipocóicas bem definidas e podem ter paredes espessadas [23, 52].

De acordo com Van Holsbeeck *et al.* [22], o papel da ultrassonografia relacionado à regeneração muscular reside em três áreas. Primeiramente, na avaliação da extensão da lesão e na mensuração da separação entre as margens normais, pois quanto maior o percentual de comprometimento muscular, maior é a proporção de aparecimento de cicatriz tecidual. O segundo papel refere-se à determinação do estágio



do processo de cura, demonstrando possivelmente o preenchimento da cavidade hemorrágica por um tecido hiperecótico relacionado ao processo de regeneração. Finalmente, a ultrassonografia tem como função a avaliação da magnitude de formação cicatricial, já que cicatrizes fibróticas são visualizadas como zonas hiperecóticas dentro do músculo e estão sempre presentes quando a lesão é grave. A importância desta função justifica-se pelo fato do risco de recorrência de lesão ser proporcional à extensão de tecido cicatricial fibroso residual no músculo [22].

Apesar dos muitos estudos envolvendo a avaliação da plasticidade do tecido muscular sob condições diferenciadas e a análise do músculo lesionado através de imagens de ultrassom convencional, não foi possível encontrar na literatura pesquisas que quantificassem as características biomecânicas diante de um processo de regeneração desencadeado por protocolo de lesão controlado com metodologia confiável, e com acompanhamento longitudinal das alterações estruturais internas do músculo.

A utilização da BMU para qualificar o aparecimento e a modificação dos tecidos fibrosos e conectivos e quantificar as características biomecânicas do músculo poderá ser feita através da análise das imagens e sua evolução ao longo do tempo.

## 2.1 OBJETIVOS

### 2.1.1 *Objetivo Geral*

O objetivo geral deste estudo é a caracterização biomecânica do tecido muscular do tríceps sural (TS) de ratos saudáveis e submetidos a protocolos de lesão por laceração induzida, assim como o acompanhamento da plasticidade da arquitetura muscular no processo de regeneração deste tecido, através de imagens ultrassônicas de alta resolução.

### 2.1.2 *Objetivos Específicos*

- Quantificar as características da arquitetura muscular do tríceps sural de ratos - espessura muscular e ângulo de penação – obtidas das imagens de ultrassom;
- Quantificar a variabilidade das medidas realizadas nas imagens ultrassônicas pós-processadas com o software apropriado e analisar a influência desta variabilidade nos resultados:

- Avaliar a variabilidade de tais características em diferentes posições articulares (posição neutra e extensão máxima do tornozelo) e em diferentes dias de testes;
- Descrever as características da arquitetura muscular, espessura muscular e ângulo de penação em condições de presença e ausência de lesão;
- Acompanhar e rastrear modificações no tecido muscular esquelético, durante o processo de regeneração da lesão por laceração, através das imagens de ultrassom;

## CAPÍTULO 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 3.1 BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA

#### *3.1.1 Sistema de BMU para imagem de alta resolução*

Um equipamento de BMU se assemelha a um instrumento de ultrassom convencional que opera no modo B. A diferença fundamental reside na alta frequência usada para a biomicroscopia, o que lhe confere maior poder de resolução. Em contrapartida, a profundidade de penetração do ultrassom em tecidos biológicos diminui drasticamente, já que o coeficiente de atenuação aumenta com a frequência de uma forma exponencial. Há também uma dependência do coeficiente de atenuação com o tipo de tecido biológico. Tecidos estruturais, como a pele e paredes arteriais, tendem a ter coeficientes de atenuação maiores, enquanto a íris e a córnea têm perdas mínimas de sinal, aproximando-se do comportamento da água. O mecanismo físico exato para tais diferenças não é completamente entendido, mas a concentração e organização de colágeno e outras proteínas estruturais são fatores importantes [2].

A utilização da ultrassonografia de alta resolução em medicina se estende de frequências inferiores, da ordem de 20MHz, como é o caso da caracterização da pele e da parede arterial, até 60MHz para as aplicações em oftalmologia. Para a frequência de 30MHz e usando um transdutor com foco natural e abertura de 0,5mm, operando na água, consegue-se profundidade de campo com 2,5mm e resoluções lateral e axial de 250 e 62 $\mu$ m, respectivamente. Essas resoluções são comparáveis com as obtidas pela microscopia por ressonância magnética, com a qual se consegue resoluções da ordem de 75 $\mu$ m. Para um transdutor operando em 100MHz, focalizado, estes valores se reduzem para 1,6mm, 60 $\mu$ m e 19 $\mu$ m, respectivamente [2]. Portanto, para frequências mais elevadas a resolução do ultrassom se aproxima daquela oferecida por microscopia óptica. Daí denominar ultrassonografia de alta frequência, aplicada na visualização de tecidos vivos por: biomicroscopia ultrassônica (BMU), microscopia ultrassônica por retroespalhamento, ultrassom de alta frequência ou então ultrassom de frequência muito elevada.

A escolha das especificações do sistema de BMU depende da natureza da aplicação e das propriedades acústicas dos tecidos específicos que serão estudados. A melhor imagem possível de qualquer equipamento de ultrassom é determinada pela

frequência, geometria do transdutor e pelas propriedades do tecido em acordo com as leis da difração [2].

A resolução de um sistema de imagem de ultrassom é definida pela distribuição do feixe ultrassônico (resolução lateral) e pela duração ou largura de banda do pulso de onda emitido no meio de propagação (resolução axial).

A resolução lateral,  $R_{lat}$ , que normalmente é a resolução limitante, pode ser estimada pela geometria do transdutor e pela frequência central do pulso característico do mesmo. Para transdutores com focalização esférica, é calculada por:

$$R_{lat} = \bar{\lambda} \frac{\text{distância focal}}{\text{abertura do transdutor}} = \bar{\lambda} \cdot f_{\text{número}}, \quad (1)$$

onde  $\bar{\lambda}$  é o comprimento de onda relativo à frequência central do espectro do pulso de onda emitido no meio e  $f_{\text{número}}$  é a razão entre a distância focal e a abertura do transdutor ( $\approx$  o diâmetro do transdutor). Em um ultrassom convencional de frequências de 3,5MHz, um transdutor típico de  $f_{\text{número}} = 2,5$  possui uma resolução lateral da ordem de 1mm. Se a frequência for aumentada para 50MHz, a resolução lateral melhora para 75 $\mu$ m. O custo de uma resolução melhorada é a redução na profundidade de penetração que, por exemplo, passa de 10 a 20cm para 1cm nas frequências de 3,5 e 50MHz, respectivamente [31].

A resolução axial,  $R_{ax}$ , é, na maioria dos casos, significativamente melhor do que a resolução lateral e proporcional ao inverso da largura de banda do pulso de onda emitido no meio. Um transdutor típico de alta frequência com uma largura de banda de 40% e uma frequência central de 30MHz permite uma resolução axial de 63 $\mu$ m, quando o meio de propagação é a água. Em termos teóricos,  $R_{ax}$  é determinada como segue:

$$R_{ax} = \frac{c}{2BW}, \quad (2)$$

onde  $c$  é a velocidade de propagação da onda no meio e  $BW$  é a largura de banda do pulso de onda transmitido ao meio.

A profundidade de campo,  $DOF$ , a qual representa a região útil ao longo do feixe emitido pelo transdutor para a obtenção de imagens, para transdutores com focalização esférica é determinada por [2]:

$$DOF = 7.0 \cdot \bar{\lambda} \cdot f_{\text{número}}^2 \quad (3)$$

Embora possa parecer que mudanças simples no transdutor permitirão aumentos significativos na magnitude da resolução, outros fatores importantes devem ser considerados em frequências altas, como a perda de penetração e de profundidade do campo, e questões acerca da confecção dos transdutores.

Tipicamente, sistemas de BMU que utilizam transdutores com focalização esférica operam limitados a profundidades de penetração e de campo da ordem de 10 e 1,5mm, respectivamente.

### 3.2 MÚSCULO ESQUELÉTICO

As fibras musculares são, basicamente, as unidades contráteis do músculo esquelético, sendo individualmente circundadas por uma camada de tecido conjuntivo e agrupadas em feixes para formá-lo, como se pode observar na Figura 2. Este tecido conjuntivo fibroadiposo, que circunda um feixe muscular, é denominado perimísio e/ou aponeurose e sua junção nas extremidades musculares forma os tendões, cuja principal função é a de inserção do músculo no osso.

As fibras musculares podem estar organizadas em paralelo, ou formando uma estrutura penada, unipenados ou bipenados, com uma aponeurose central. Esta estrutura penada é bem demonstrada em imagens ultrassônicas, nas quais os feixes de fibras são visualizados em zonas hipoecóicas e o perimísio como linhas hiperecóicas separando os fascículos (Figura 2). O epimísio, fâscias, nervos e tendões também aparecem hiperecóicos em relação ao músculo [22, 26, 52].

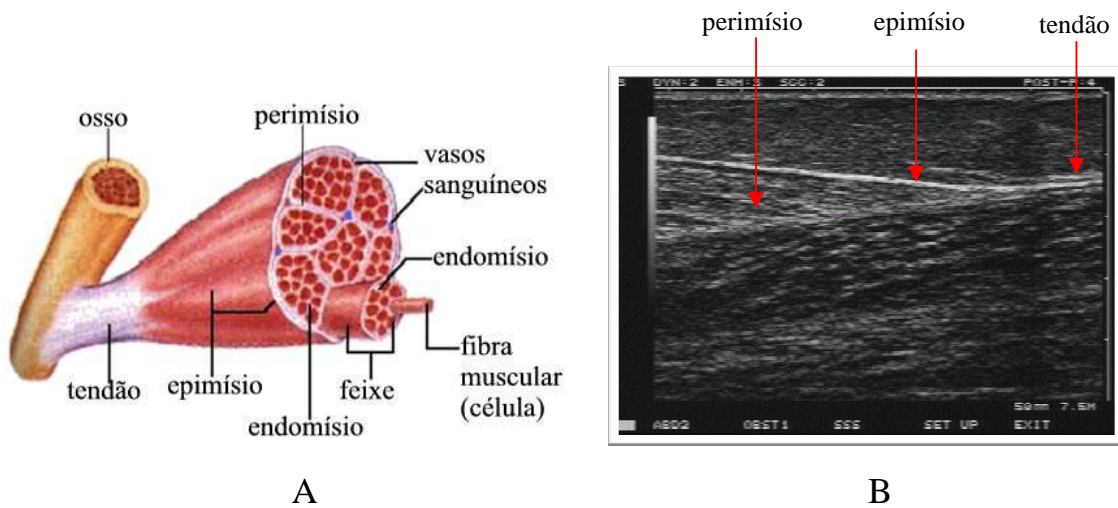


Figura 3.1 – (A) Relação do músculo esquelético com os ossos e tecidos conjuntivos fibrosos dos tendões e (B) imagem ultrassônica (7,5MHz) de tecido muscular esquelético do TS de humano.

### 3.2.1 *Tríceps Sural*

O Tríceps Sural constitui um conjunto de músculos posteriores da perna formado pelo gastrocnêmio (GAS) e o solear (SOL). Possui diversas características específicas na compreensão de padrões fundamentais da marcha, equilíbrio, entre outros. O GAS é dividido em duas porções: lateral (GL) e medial (GM). Ambas compõem as partes mais superficiais do TS e encontram-se bem próximas à pele. O SOL, por sua vez, é mais profundo.

### 3.2.2 *Anatomia Muscular em Ratos*

A anatomia muscular nos ratos é similar, em vários aspectos, à dos humanos. Como pode ser visto nas Figuras 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5, e através de dissecações realizadas no Instituto de Biofísica da UFRJ (Figuras 3.6, 3.7 e 3.8), o TS apresenta características conformacionais e anatômicas similares.

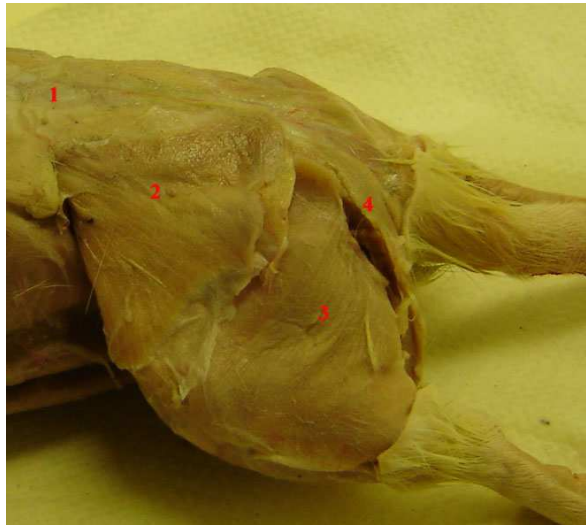


Figura 3.2 – Estruturas do rato assinaladas: (1) fáscia lombodorsal; (2) glúteo superficial; (3) bíceps femoral; (4) semitendinoso. Reproduzido com autorização do autor e retirado de <http://www.personal.psu.edu/dys100/anatomy/rat/index.htm>.



Figura 3.3 - Músculos do rato assinalados: (1) glúteo superficial (refletido); (2) glúteo médio; (3) piriforme ; (4) semitendinoso; (5) bíceps femoral (refletido); (6) semimembranoso; (7) vasto lateral; (8) gastrocnêmio. Reproduzido com autorização do autor e retirado de <http://www.personal.psu.edu/dys100/anatomy/rat/index.htm>.

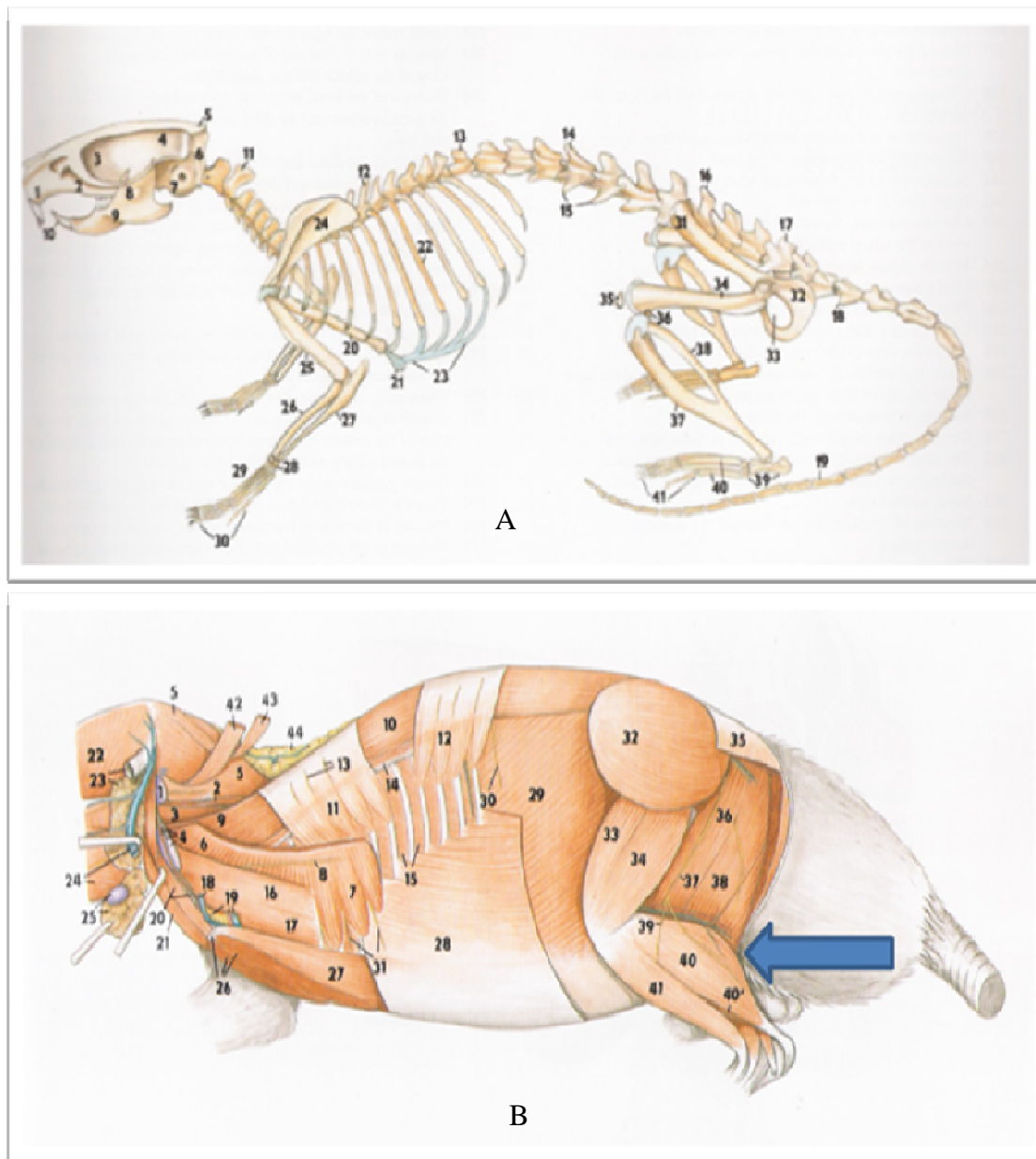


Figura 3.4 - (A) Esqueleto ósseo do rato e (B) músculos superficiais que o recobrem. A seta indica o GAS. Reprodução autorizada pela editora e retirado de [53].



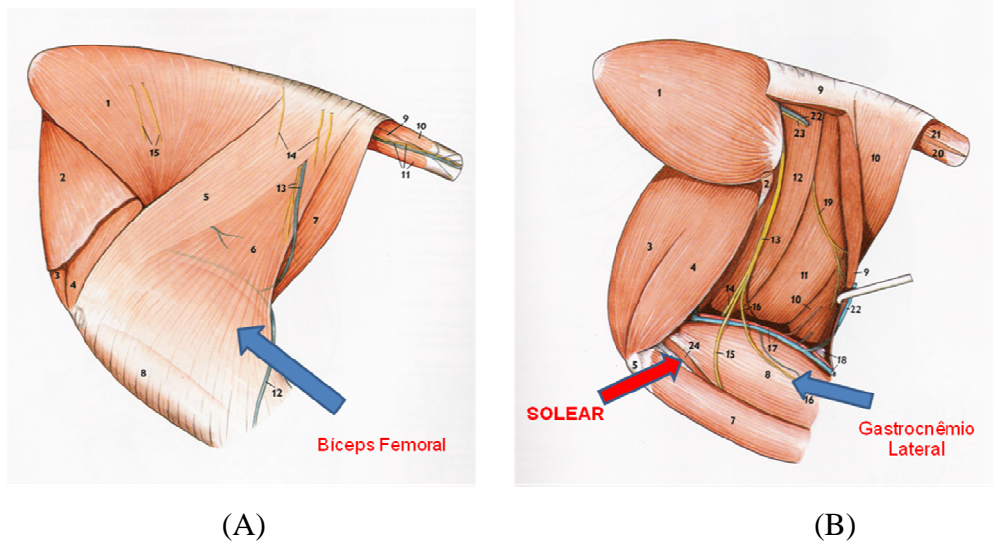


Figura 3.5 - Detalhamento da musculatura do membro inferior do rato. (A) musculatura superficial da parte proximal da perna e (B) musculatura profunda da parte proximal da perna. Reprodução autorizada pela editora e retirado de [53].

As fotos obtidas durante a dissecação mostram características importantes da anatomia muscular do grupamento do TS, tal como o posicionamento de seus componentes, que possuem seus análogos nas imagens providas pelo sistema de BMU.

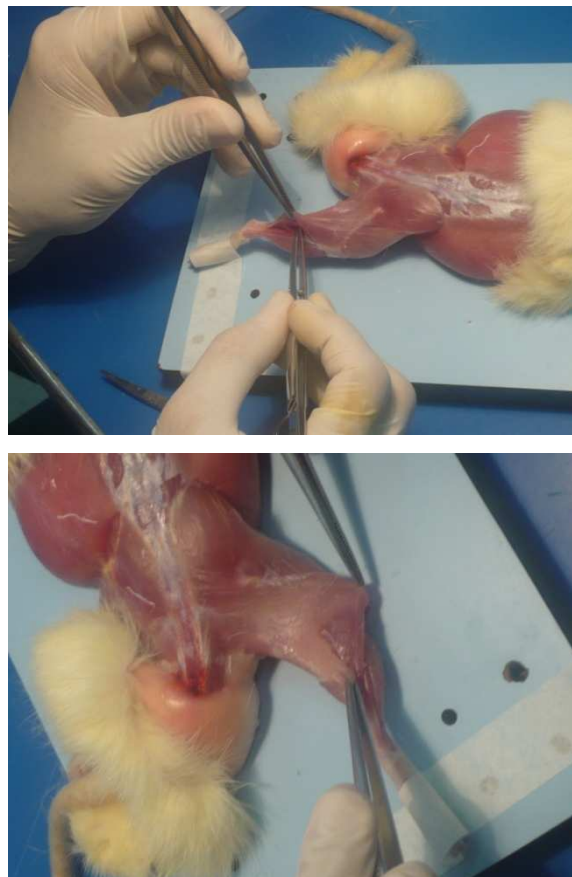


Figura 3.6 - Bíceps femoral sendo descolado para visualização dos músculos mais profundos do TS.

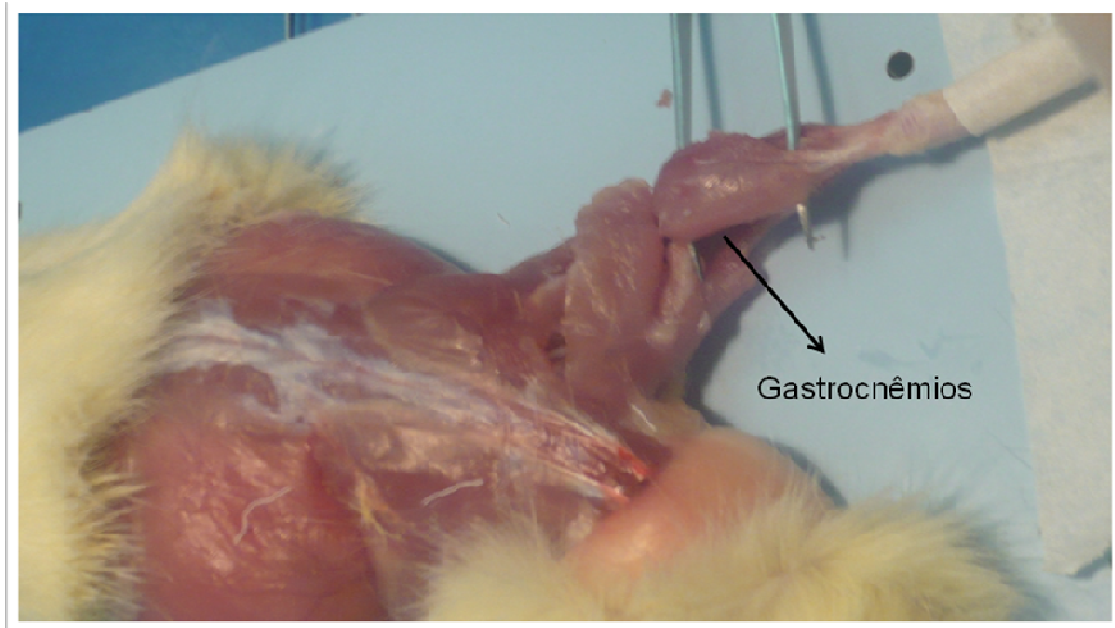


Figura 3.7 - Visualização dos gastrocnêmios medial e lateral.

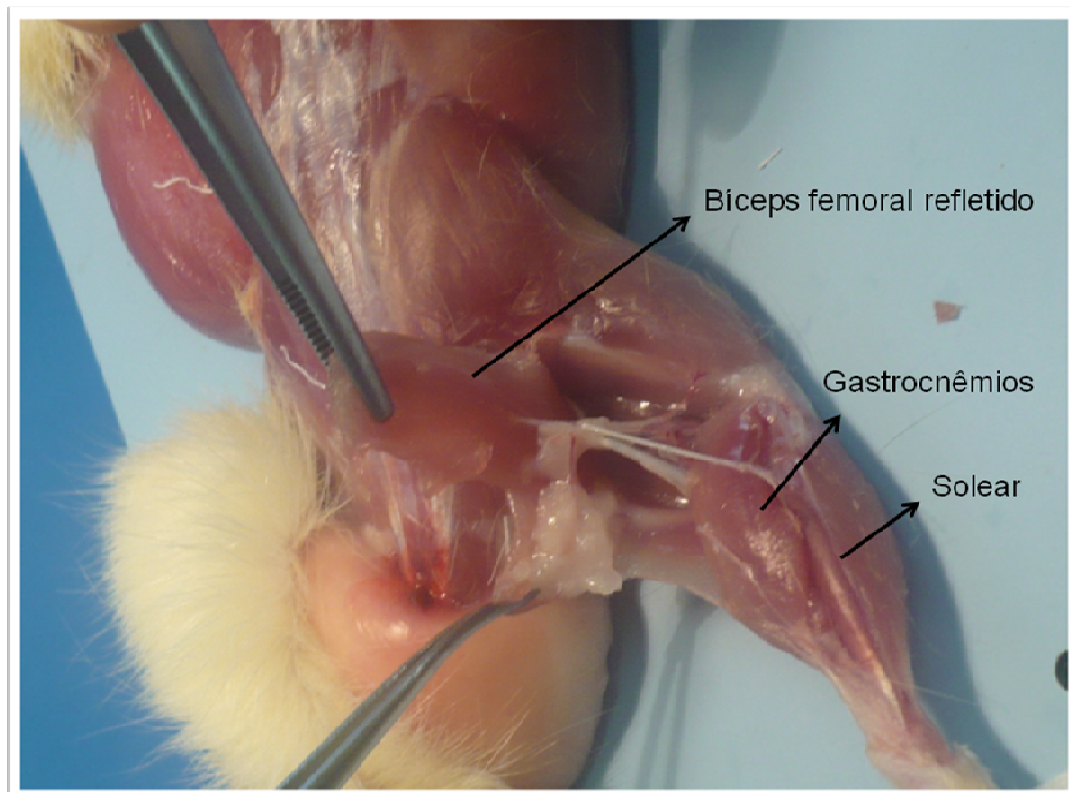


Figura 3.8 - Visualização dos gastrocnêmios medial e lateral, e solear.

### 3.3 CARACTERÍSTICAS BIOMECÂNICAS

As características biomecânicas do músculo esquelético são ferramentas importantes para categorizá-lo e para estimar sua função, servindo como parâmetros de entrada para diversos modelos matemáticos de avaliação funcional, principalmente da força muscular [15, 17, 18, 20, 41]. Destas, destacam-se as características arquitetônicas, tais como o ângulo de penação, comprimento do fascículo, espessura muscular, área de secção transversa anatômica e fisiológica, e volume muscular, muito pesquisadas na atualidade com variados objetivos, já que influenciam a contratilidade muscular e as propriedades mecânicas do complexo músculo-tendão. Maganaris *et al.* [41], por exemplo, apresentaram um modelo geral para avaliar as características torque-ângulo em músculos esqueléticos humanos e suas contribuições individuais para a produção de força de um grupamento muscular em contração isométrica máxima, utilizando parâmetros como volume muscular, braço de força, e ângulo de penação. Os mesmo autores [19] ressaltam a importância de informações precisas sobre o ângulo de penação, importante em dois tipos de análise: quando o torque que um músculo pode produzir é calculado a partir da predição da força do mesmo na direção de suas fibras e, inversamente, quando a produção de força na direção das fibras é calculada a partir da capacidade de geração de torque do músculo. Fukunaga *et al.* [46] investigaram mudanças no comprimento dos fascículos e tendão para avaliar o comportamento elástico e armazenamento de energia do tendão durante a marcha, dados que são utilizados para estimativa da força muscular durante atividades funcionais e que também foram avaliados por outros autores para condições distintas de corrida [54], treinamento isométrico [55] e saltos verticais [56].

O uso de técnicas não-invasivas de aquisição de imagens, como o ultrassom, parece promissor para o estudo de adaptações do músculo esquelético a condições de uso aumentado ou desuso na saúde e na doença [23, 33, 36, 51, 54, 55, 57].

### 3.4 ARQUITETURA MUSCULAR

#### 3.4.1 Definição e Implicações Fisiológicas

A terminologia arquitetura muscular é utilizada para referenciar o arranjo das fibras musculares relativas ao eixo de geração de força do músculo [24], e possui um papel primordial na determinação de suas características funcionais. As relações

geométricas formadas pelo arranjo das fibras são importantes no que diz respeito à estimativa de produção de torque por qualquer músculo, e, conseqüentemente, na descrição de sua função.

Músculos esqueléticos podem ser constituídos de fibras paralelas ou penadas. No primeiro caso, as fibras correm paralelamente à linha de ação muscular, enquanto no segundo as fibras estão dispostas obliquamente à linha de ação e se inserem no tecido conjuntivo (aponeurose interna) formando um ângulo, chamado ângulo de penação [12, 13, 16, 19, 20].

As relações força-comprimento e força-velocidade de encurtamento do músculo esquelético dependem deste arranjo especial das fibras. O ângulo de penação relaciona-se diretamente com a quantidade de tecido contrátil por unidade de área muscular e juntamente com o comprimento da fibra, reflete na capacidade de produção de força, na velocidade de encurtamento do músculo e nas propriedades elásticas do complexo músculo-tendão.

Normalmente, um músculo penado possui fibras com menores comprimentos o que significa uma menor quantidade de sarcômeros (unidade funcional muscular) em série se comparada com a de uma fibra longa de um músculo paralelo ou fusiforme (Figura 3.9). Segue que, para o mesmo valor absoluto de redução do comprimento da fibra, o encurtamento relativo por sarcômero será maior para uma fibra curta. Conseqüentemente, uma pequena alteração no comprimento de um músculo penado pode significar que o mesmo deslocou-se o suficiente para encontrar-se em uma posição desvantajosa para geração de força (encurtamento), de acordo com a curva comprimento-tensão. No entanto, como vantagem, estes músculos possuem mais fibras dispostas em paralelo e o número de sarcômeros é expressivamente aumentado, apresentando uma área de seção transversa fisiológica normalmente maior do que a dos músculos paralelos (Figura 3.9). Este fato permite uma maior produção de força normalizada pela massa muscular [12, 20].

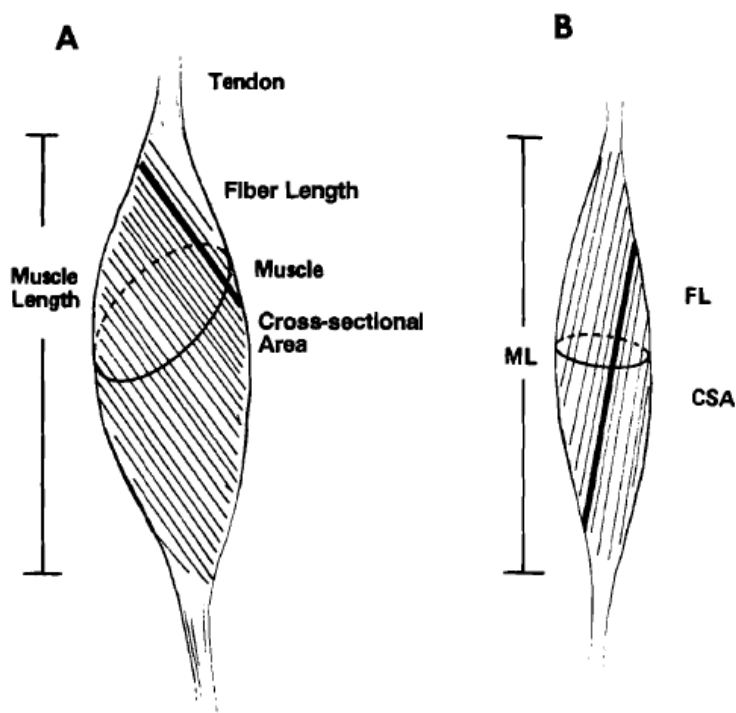


Figura 3.9 - Representação esquemática de dois músculos com diferentes arquiteturas musculares. A: músculo com fibras curtas e grande área de secção transversa fisiológica e (B) músculo com fibras longas e pequena área de secção transversa fisiológica. FL = comprimento da fibra. CSA = área de secção transversa fisiológica. ML = comprimento do músculo. Reprodução autorizada pelo autor, retirada de [12].

Os efeitos da arquitetura muscular sobre as características de força-velocidade foram estudados por Spector *et al.* [58] nos músculos solear e gastrocnêmio medial de gatos. Estes músculos diferem significativamente na composição de fibras desse animal (o SOL é composto totalmente por fibras lentas e o GM tem alta proporção de fibras rápidas), AP (GM: 21° e SOL: 6°), e comprimento da fibra (GM: 20mm e SOL: 37mm). Estes autores encontraram para o GM uma velocidade máxima de encurtamento dos sarcômeros três vezes maior relativamente ao SOL, provavelmente devido à atividade da miosina ATPase ser 2,6 vezes mais intensa nas fibras do GM. No entanto, devido às diferenças no ângulo de penação e comprimento da fibra, a velocidade máxima desenvolvida pelo GM no tendão calcâneo foi somente 1,5 vezes maior do que a do SOL. Similarmente, o pico de tensão isométrica do GM no tendão foi quase cinco vezes maior que o do SOL. Entretanto, depois de normalizadas as diferenças do volume muscular, comprimento da fibra e ângulo de penação, os índices de tensão específica (força por área de secção transversa das fibras) destes dois músculos foram similares. Ao analisar tais resultados, fica evidente a influência da arquitetura muscular nas

características de força-velocidade de músculos esqueléticos em mamíferos e a indicação de que os parâmetros arquitetônicos a serem considerados, isolada ou conjuntamente, para relacionar a estrutura muscular com suas características funcionais são: espessura muscular, ângulo de penação, comprimento da fibra e distância entre as aponeuroses, dos quais, os dois primeiros serão descritos em detalhe posteriormente.

### 3.4.2 Ângulo de Penação

O ângulo de penação refere-se à organização das fibras musculares, e pode ser entendido como o ângulo agudo relativo formado entre a aponeurose principal do músculo (aponeurose interna), que possui a mesma direção da linha de tração, e as fibras musculares [12, 16]. É facilmente identificável nas imagens de ultrassom, como pode ser visto na Figura 3.10.

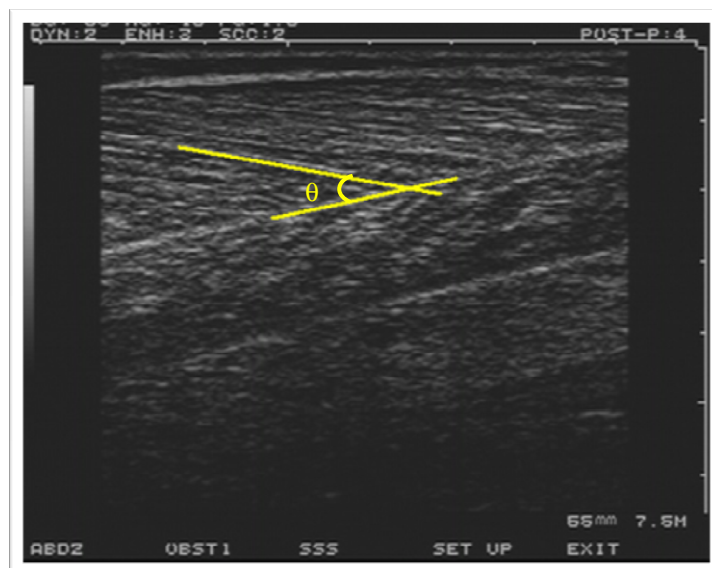


Figura 3.10 - Ângulo de penação ( $\theta$ ) do gastrocnêmio medial de humanos identificado em imagens de ultrassom (7,5MHz).

### 3.4.3 Espessura Muscular

A espessura muscular é a distância perpendicular entre as aponeuroses interna e externa, medida em local de maior diâmetro muscular, descrito na literatura a partir de trabalhos de validação com peças anatômicas ou ressonância magnética. É visualizada em imagens transversais ou longitudinais à linha de ação muscular [12, 16] (Figura 3.11).

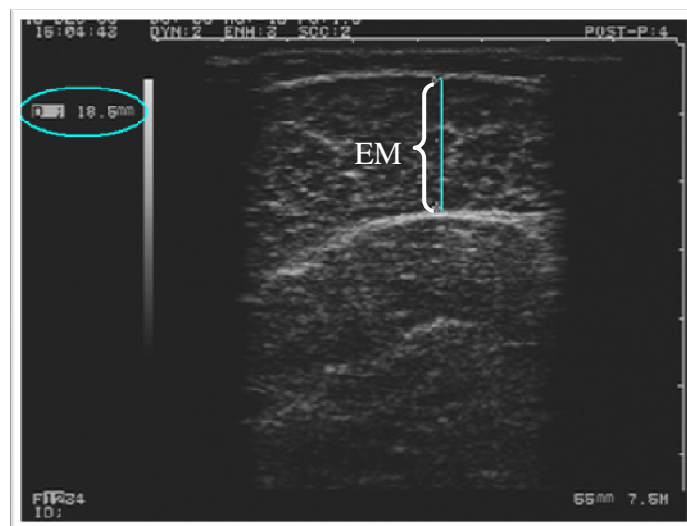


Figura 3.11 - Espessura muscular (EM) do gastrocnêmio medial de humanos identificado em imagem transversal de ultrassom (7,5MHz). A reta azul corresponde à distância perpendicular entre as aponeuroses externa e interna e o comprimento da reta está indicado dentro do círculo azul.

Há alguns estudos que descrevem os parâmetros da arquitetura muscular em ratos *in vitro* [17, 59]. Mais recentemente, Eng *et al.* [60] realizaram uma pesquisa abrangente inter-relacionando as características biomecânicas dos músculos da parte posterior do membro inferior de ratos, e analisando a especialização funcional de cada grupamento. Os autores demonstraram grande variabilidade destes parâmetros entre os músculos, indicando alto grau de especialização dos músculos coerente com as demandas funcionais de cada um.

Em humanos, existem estudos relatando a quantificação destes parâmetros através de imagens de ultrassom de baixa frequência assim como o acompanhamento das mudanças provocadas por diferentes tipos de treinamento nos parâmetros arquitetônicos musculares [13, 14]. Estes estudos reportam variação nos valores destas características associadas à variação passiva do ângulo articular, indicando a necessidade de um estudo preliminar para confirmar que tal associação ocorre também em ratos.

#### 3.4.4 Adaptação dos parâmetros arquitetônicos a condições de uso aumentado e desuso

A principal relação entre arquitetura e função muscular é a de que a velocidade de encurtamento e a amplitude de excursão são proporcionais ao número de sarcômeros

em série, ou simplificada ao comprimento das fibras, enquanto a força muscular é proporcional à área de seção transversa total de sarcômeros, que corresponde à área de seção transversa fisiológica (estimativa da área de seção transversa total das fibras) [12]. Músculos com fibras longas geram maiores velocidades e mantêm níveis médios de força durante grande parte da amplitude de movimento, mas com custo metabólico maior do que aqueles com fibras curtas [40, 61]. Músculos que se inserem no tendão ou na aponeurose com uma dada angulação possuem uma maior área de seção transversa fisiológica pois contém mais fibras dispostas paralelamente e, conseqüentemente, são capazes de gerar picos de força relativamente maiores do que os gerados pelos fusiformes [40] (Figura 3.12).

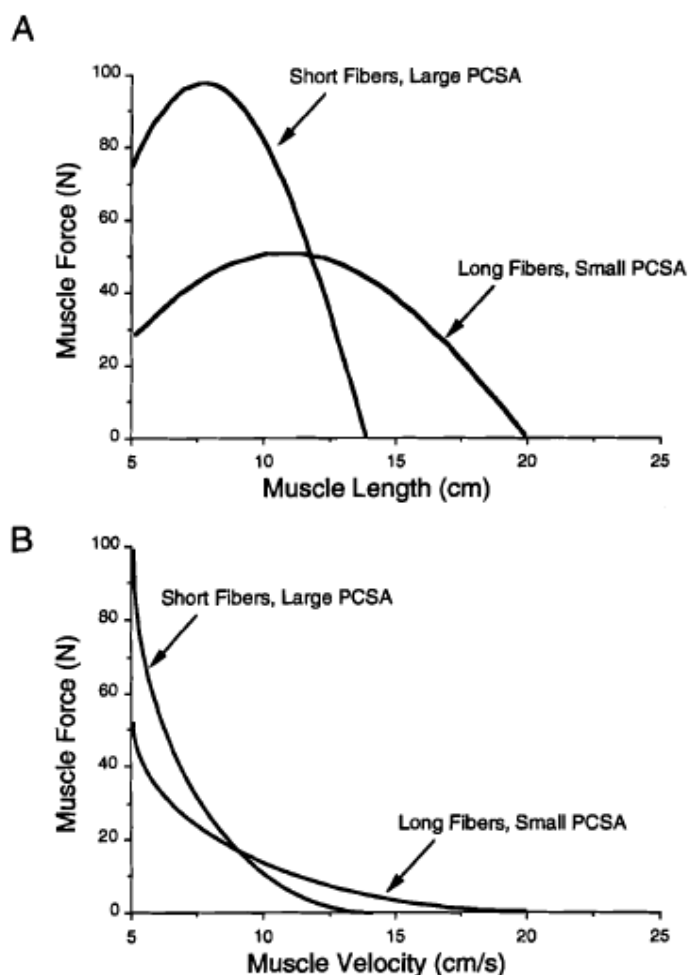


Figura 3.12 - Propriedades isométricas e isotônicas de músculos com diferentes arquiteturas (como os da figura 3.9). A: relação comprimento-tensão. B: relação força-velocidade. Notar que tensão tetânica máxima é o ponto comum entre as duas curvas. PCSA = área de seção transversa fisiológica. Reproduzido com autorização do autor, retirado de [12].



A utilização do ultrassom e da ressonância magnética para medir parâmetros da arquitetura muscular *in vivo* permitiu que pesquisadores relatassem que aumentos significativos do ângulo de penação ocorrem juntamente com aumentos na área de seção transversa ou espessura em resposta a períodos prolongados de treinamento de resistência de alta intensidade [39, 62]. Tal aumento no ângulo de penação e o consequente aumento do material contrátil no músculo, permite uma elevação da capacidade de força máxima e é relatado como um dos mecanismos desta adaptação após treinamento. Portanto, a arquitetura muscular parece ser altamente plástica, e essas mudanças parecem contribuir para as alterações na expressão de força. Em animais, a imobilização muscular em uma posição alongada, por dias ou semanas, resultou em aumento do número de sarcômeros em série e do comprimento total da fibra [63, 64, 65], enquanto o alongamento moderado realizado durante 30 minutos por dia foi suficiente para reduzir ou reverter o encurtamento da fibra que acompanhou a imobilização em posições encurtadas em um músculo de rato [66]. Além disso, variações na sobrecarga muscular (ações excêntricas e concêntricas) em ratos produziram mudanças significativas no número de sarcômeros em série depois de um período de 3 dias do estímulo de exercício [67].

Estas evidências indicam a possibilidade de adaptação das características da arquitetura muscular dos ratos quando submetidos a um protocolo de lesão, assim como do membro contralateral não-lesionado, responsável pela compensação da perda da função do membro prejudicado.

### 3.5 LESÃO MUSCULAR

As lesões musculares possuem alta incidência entre praticantes de atividade física e atletas, sendo passíveis de ocorrer por traumatismo direto, como em contraturas e estiramentos, ou por causas indiretas, tais como isquemia, lesões neurológicas e distrofias musculares [68, 69].

A alta prevalência de lesões musculares é, de certa forma, compensada pela grande capacidade regenerativa do tecido muscular, o que garante a manutenção da funcionalidade da musculatura esquelética [6]. Porém, sua ocorrência repetida ou grave implica a submissão do tecido muscular a vários ciclos de degeneração-regeneração, o que pode levar a uma redução significativa da função muscular, além de um possível quadro de fibrose, e conseqüentemente à redução da capacidade motora e a um tempo de recuperação mais prolongado do que o normal [7, 10, 11, 70].

Uma revisão da literatura acerca dos possíveis tratamentos da lesão muscular indica que o mais utilizado e que visa a recuperação do tecido muscular é o repouso e a regressão gradual e assistida da função muscular [7, 71, 72, 73, 74, 75]

### 3.6 REGENERAÇÃO MUSCULAR

O músculo lesionado atravessa, normalmente, um processo de regeneração-degeneração composto de 3 fases: destruição, reparo e remodelagem [6, 7, 9, 10, 70].

A fase de destruição é caracterizada pela formação de hematoma entre os fragmentos de fibra rompidos, necrose do tecido, degeneração, e resposta celular inflamatória. A fase de reparo inclui a fagocitose do tecido lesionado, regeneração do músculo estriado, produção de cicatriz de tecido conectivo e crescimento capilar. Na fase final de remodelagem, o músculo regenerado amadurece e contrai com a reorganização da cicatriz tecidual [6, 7, 9, 10, 73]. As duas últimas fases estão normalmente associadas ou sobrepostas, e a Figura 3.11 ilustra eventos destas fases.

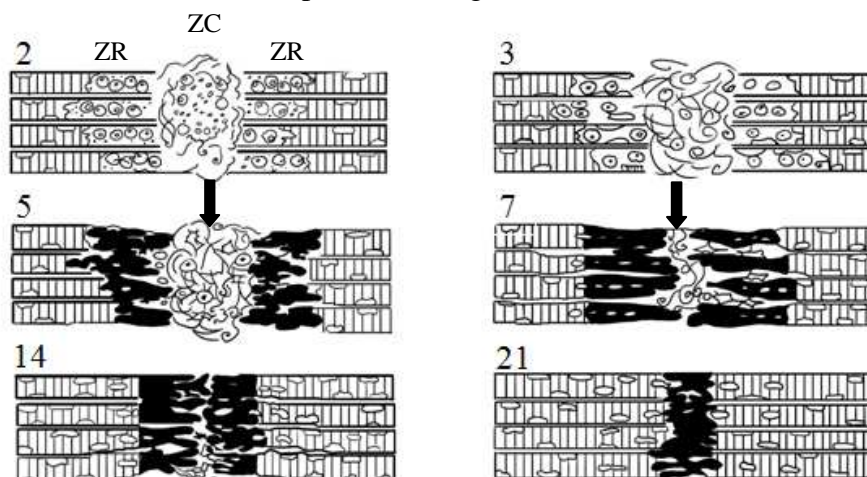


Figura 3.11 - Ilustração esquemática da regeneração do músculo esquelético. Dia 2: os fragmentos necrosados das miofibrilas partidas estão sendo removidos por macrófagos enquanto, concomitantemente, fibroblastos iniciam a formação da cicatriz de tecido conectivo na zona central (ZC). Dia 3: células satélite são ativadas dentro dos cilindros da lâmina basal na zona de regeneração (ZR). Dia 5: mioblastos se fundiram com miofibrilas na ZR, e o tecido conectivo (seta) se tornou mais denso. Dia 7: as células musculares em regeneração invadem a ZC e começam a atravessar a cicatriz (seta). Dia 14: a cicatriz da ZC está ainda mais condensada e reduzida em tamanho, e as miofibrilas regeneradas fecham a lacuna da ZC. Dia 21: as miofibrilas que se entrelaçam estão virtualmente fundidas com pouco tecido conectivo cicatricial se interpondo. Reproduzido com autorização do autor, retirado de [7].

Embora o tecido muscular retenha sua habilidade de regeneração após lesão, este processo tende a ser mais lento em casos graves ou recorrentes e, muitas vezes, incompleto [73, 75]. A recuperação completa do músculo esquelético é dificultada pelo desenvolvimento de fibrose, quadro que aparece tipicamente na segunda semana após a lesão e aumenta ao longo do tempo [7, 70, 75].

### 3.6.1 Fase de destruição

#### 3.6.1.1 Necrose das Miofibrilas

Quando um músculo é lesionado, uma força mecânica excessiva se estende através de toda seção transversa das miofibrilas (Figura 3.11), rasgando também o sarcoplasma dos fragmentos de fibra rompidos e deixando assim uma abertura. Como as miofibrilas são longas (especialmente em músculos de fibras paralelas), há a ameaça de que a necrose iniciada no local da lesão se estenda por todo o comprimento das mesmas. No entanto, existe uma estrutura específica chamada banda de contração, formada por material citoesquelético condensado, que age como um sistema de portas contra-incêndio. Dentro de poucas horas após a lesão, a propagação da necrose é interrompida e limitada a um processo local, pois a banda de contração isola o dano da membrana plasmática e forma uma barreira protetora, dentro da qual a membrana pode ser reparada [7]. Estudos recentes demonstraram que vesículas lisossomais inseridas no local da ruptura da membrana plasmática agem como uma membrana temporária e têm um papel fundamental no isolamento da membrana para o processo de reparo [6, 7, 9].

#### 3.6.1.2 Inflamação

Além das miofibrilas, os vasos sanguíneos do tecido muscular são naturalmente rompidos, e assim, as células inflamatórias sanguíneas ganham acesso direto ao local da lesão (Figura 3.11). O início da reação inflamatória é mais tarde ampliado devido à liberação de substâncias hormonais pelas células satélites e pelas partes necrosadas das miofibrilas, que atuam como quimioatraentes potencializadores da proliferação de células inflamatórias [7, 72, 77]. No interior do músculo lesionado, há macrófagos e fibroblastos que são ativados e produzem sinais quimiotácteis adicionais (fatores de crescimento, citocinas) para as células inflamatórias. Além disso, a maioria dos tecidos

contém tais fatores armazenados sob uma forma inativa em sua matriz extracelular para serem utilizados quando ocorre uma necessidade aguda, como em uma lesão muscular. Este estoque de fatores de crescimento é produzido por células residentes e inativado por sua forte aderência à proteoglicanos e outros constituintes da matriz extracelular. No entanto, quando ocorre dano tecidual, o rompimento da integridade do tecido normal resulta na ativação/liberação destes hormônios que passam a direcionar o processo de reparo. Imediatamente após a lesão, leucócitos polimorfonucleares são as células mais abundantes no local da lesão, mas já no primeiro dia eles são substituídos por monócitos. De acordo com os princípios inflamatórios básicos, estes monócitos são eventualmente transformados em macrófagos que iniciam ativamente a proteólise e fagocitose do material necrosado pela liberação de enzimas lisossomais. A fagocitose realizada pelos macrófagos é um processo notavelmente específico em relação ao material necrosado, já que os cilindros preservados da lâmina basal que envolvem as partes necrosadas sobrevivem (permanecem intactos) ao ataque dos macrófagos, e conseqüentemente, servem como um alicerce no qual as células satélites viáveis formarão novas miofibrilas. Uma demonstração da alta especificidade e coordenação deste processo é o fato dos macrófagos fagocitarem os restos necrosados que envolvem as células satélites ao mesmo tempo em que enviam fatores de sobrevivência para as células regenerativas [6, 7, 79, 80].

### *3.6.2 Fases de reparo e remodelagem*

Depois de terminada a fase de destruição, o real reparo do tecido muscular se inicia com dois processos concomitantes (simultaneamente competitivos e cooperativos): a regeneração das miofibrilas rompidas e a formação de cicatriz de tecido conectivo (Figura 3.11). Uma progressão equilibrada dos dois processos é pré-requisito para a otimização da recuperação da função contrátil do músculo [6, 7, 79, 80].

#### *3.6.2.1 Renegeração das miofibrilas*

Apesar das miofibrilas serem geralmente consideradas como irreversivelmente pós-mitóticas, a acentuada capacidade regenerativa do músculo esquelético é garantida por um mecanismo intrínseco que restabelece o aparato contrátil danificado. A regeneração de miofibrilas se inicia com a ativação de células miogênicas precursoras, ou células satélites, localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática de cada

miofibrila individual. Quando ativadas, ocorre sua transformação em mioblastos e proliferação e diferenciação em miotúbulos multinucleados, e eventualmente em miofibrilas. Muitos destes mioblastos possuem a capacidade de se fundirem entre si ou com miofibrilas em regeneração, podendo prevenir a degeneração completa de fibras musculares [7, 8, 71, 79, 80]. Eventualmente, as partes regeneradas das miofibrilas adquirem sua forma madura com estriações cruzadas normais e núcleos periféricos. É interessante notar que, diante de uma lesão suave (como exemplo provocada por uma contração excêntrica), as células satélites respondem imediatamente iniciando sua proliferação, mas devido à não gravidade da lesão, a ativação celular é interrompida antes da transformação em mioblastos [7].

Depois dos cilindros da lâmina basal antiga serem preenchidos por miofibrilas em regeneração, estas invadem a abertura na lâmina em direção à cicatriz de tecido conectivo que se formou entre os fragmentos de fibra. Nos dois lados da cicatriz, as miofibrilas dos fragmentos de músculo que sobreviveram formam múltiplas ramificações enquanto tentam perfurar a cicatriz que as separa [6, 7]. No entanto, após obter êxito somente em uma curta distância, as ramificações começam a aderir ao tecido conectivo com suas extremidades formando junções miotendíneas em miniatura com a cicatriz. Com o tempo, o tamanho da cicatriz diminui progressivamente, fazendo com que os fragmentos de fibras se aproximem, mas ainda não é sabido se tais fragmentos de fibras rompidas de cada lado da cicatriz ficarão unidos em algum momento ou se algum septo de tecido conectivo permanecerá entre eles [7, 81].

### 3.6.2.2 Formação da cicatriz de tecido conectivo

Imediatamente após a lesão, a lacuna formada entre as fibras rompidas é preenchida por hematoma. No primeiro dia, as células inflamatórias, incluindo fagócitos, invadem o hematoma e começam a desfazer o coágulo sanguíneo [7, 11]. Fibrina e fibronectina sanguíneas se ligam para formar tecido granular proliferativo, ou seja, uma matriz extracelular inicial que age como alicerce para os fibroblastos e confere ao tecido lesionado a força inicial necessária para suportar as forças de contração aplicadas no músculo. Os fibroblastos começam então a sintetizar as proteínas e proteoglicanos da matriz extracelular para restaurar a integridade da estrutura do tecido conectivo.

O tecido granular inicialmente extenso (cicatriz interpondo os fragmentos de fibra) é condensado de forma eficiente em uma massa de tecido conectivo

significativamente reduzida e composta, principalmente, por colágeno tipo I [7, 9, 81, 82, 83]. Apesar das proposições mais comuns apontarem para a ocorrência de fibrose generalizada no músculo em regeneração, a quantidade de tecido conectivo intramuscular não é aumentada salvo nas situações em que o músculo fica completamente imobilizado por um período significativo [7, 83].

A cicatriz de tecido conectivo formada no local da lesão é o ponto mais fraco do músculo logo após o trauma, mas sua força tênsil aumenta consideravelmente com a produção de colágeno tipo I. A estabilidade mecânica do colágeno é atribuída à formação de pontes cruzadas intermoleculares durante a maturação do tecido cicatricial. Aproximadamente 10 dias após o trauma, a maturação da cicatriz atinge um patamar em que a mesma deixa de ser o ponto mais fraco do músculo lesionado, e, se o mesmo for sobrecarregado até a falha, a ruptura usualmente ocorrerá no tecido muscular adjacente às junções miotendíneas em miniatura formadas recentemente entre as fibras regeneradas e o tecido cicatricial [7, 81]. No entanto, um período relativamente longo de tempo é necessário até que a força muscular seja completamente restaurada para os níveis anteriores à lesão.

Apesar da regeneração da maioria das lesões do músculo esquelético ocorrer sem a formação de uma cicatriz fibrótica funcionalmente incapacitante, a proliferação de fibroblastos pode, em alguns casos, ser excessiva, resultando em um tecido cicatricial denso dentro do músculo. Nestes casos, usualmente associados com traumas graves ou com reincidência de rupturas, a cicatriz pode criar uma barreira mecânica que atrasa consideravelmente, ou até mesmo restringe completamente, a regeneração das miofibrilas através da abertura da lesão [7, 80, 82].

### 3.7 MODELOS DE ESTUDO EM LESÕES MUSCULARES

As diferentes fases do processo de degeneração e regeneração do tecido muscular variam em termos de desenvolvimento e duração de acordo com tipo, extensão e modelo animal utilizado [6, 8]. Tal variabilidade determina a necessidade de uma metodologia científica precisa, ou seja, da criação de modelos de estudo para lesão muscular.

Muitas metodologias para indução à lesão muscular já foram descritas e testadas em diversos tipos de músculos. Algumas que podem ser citadas são: miotoxinas, estiramento forçado, agente hipertônico, laceração, trauma direto, esmagamento,

autotransplante, deinervação, imobilização e contrações excêntricas [73, 74, 75, 85, 86, 87, 88, 89, 90].

Destas metodologias, o modelo de laceração muscular figura como a melhor opção para este estudo, já que é um método bem descrito na literatura e consagrado, com importância e aplicação na área médica e traumatológica, além de já ter sido realizado em outras pesquisas no Instituto de Biofísica da UFRJ, o que confere uma maior confiabilidade ao mesmo.

### *3.7.1 Método de Lesão Muscular por Laceração*

A laceração muscular é uma lesão incapacitante na medicina esportiva e um problema desafiador na traumatologia, embora rara em situações esportivas.

A laceração, que ocorre quando o músculo é cortado por um objeto afiado após trauma direto, permanece um problema desafiador e não há diretrizes estabelecidas na literatura para seu tratamento[70, 71, 74, 75].

Na maioria das vezes, a recuperação muscular após a laceração é lenta e incompleta, levando a danos permanentes e hipofunção muscular. No entanto, o músculo é capaz de regeneração massiva eficiente após a lesão, desde que o mesmo não esteja obstruído por tecido conectivo em excesso[70, 71, 74, 75].

Em um músculo lacerado, o espaço lesionado é sempre preenchido com hematoma, tecido granular proliferativo, e cicatriz de tecido conectivo, elementos que tornam o reparo complexo e podem inibir a regeneração completa, levando a uma recuperação funcional parcial. A recuperação funcional do músculo lacerado pode depender da inervação do mesmo, sendo relatado na literatura que a regeneração é prejudicada pela presença de um percentual elevado de miofibrilas deinervadas localizadas distalmente ao local da lesão [70, 71, 74, 75].

Duas opções de tratamento mais pesquisadas e investigadas são a sutura e a imobilização por curto período seguida por mobilização irrestrita. A sutura da lesão pode melhorar o processo de regeneração, mas não previne a formação de tecido cicatricial fibroblástico denso, o que pode levar a uma recuperação funcional incompleta, pois a cicatriz não passa por um processo de regeneração eficiente. A imobilização curta permite que o tecido granular alcance uma força tênsil suficiente para resistir às forças causadas pela mobilização e previne a reincidência de rupturas. A sutura aparentemente restaura a continuidade do revestimento do músculo e melhora o ambiente para a regeneração, e estudos mostraram que a injeção de agentes

antifibróticos e a utilização de exercícios passivos no momento adequado reduziu a área de fibrose em músculos lacerados [70, 71, 74, 75].



## CAPÍTULO 4

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 INSTRUMENTAÇÃO DE BMU

O diagrama de blocos básico da instrumentação de BMU pode ser visto no esquema a seguir (Figura 4.1). A instrumentação de imagem por ultrassom é similar aos sistemas convencionais de imagem modo-B, com exceção do fato da frequência ser aproximadamente uma ordem de grandeza maior e as tolerâncias mecânicas são mais rigorosas.

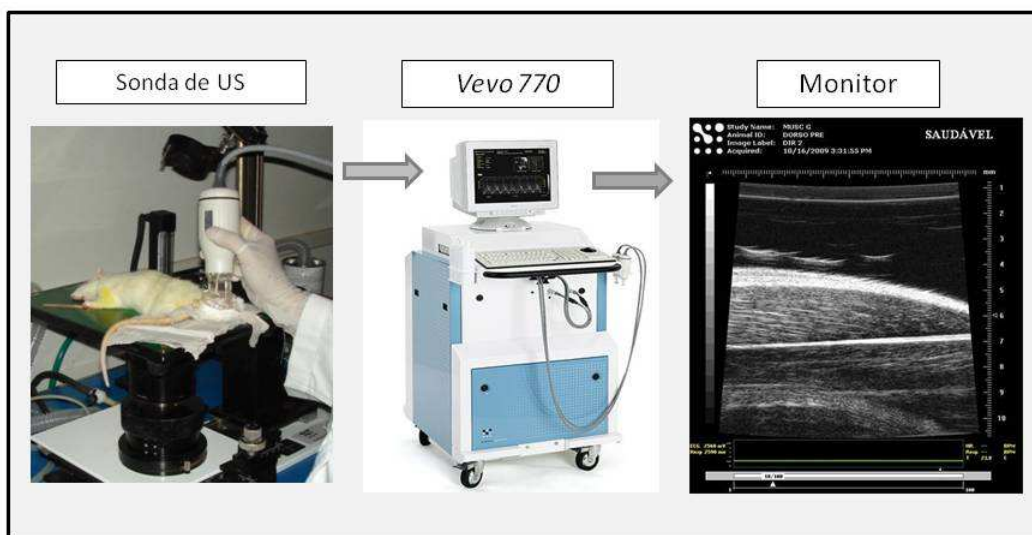


Figura 4.1 - Diagrama de blocos simplificado do equipamento de BMU Vevo 770.

Tipicamente, o sistema de imagem consiste em um dispositivo de microposicionamento unidimensional que movimenta o transdutor de alta frequência (20-200MHz) sobre o campo de imagem (2-10mm), coletando sinais de radiofrequência de ultrassom em linhas igualmente espaçadas (normalmente 10 a 20 $\mu$ m de espaçamento). Um pulso de alta voltagem (100-400V, pico a pico) é aplicado no transdutor, o qual gera um pulso de ultrassom que é transmitido para o tecido. Ao se propagar no tecido, o pulso de ultrassom é retroespalhado pelas diversas estruturas não-homogêneas do meio e detectado pelo mesmo transdutor. A saída elétrica do transdutor gera um sinal de radiofrequência correspondente à onda nele incidente e proveniente do retroespalhamento. Esse sinal passa por um amplificador logarítmico, para dar ênfase nos sinais de baixa intensidade, e por um conversor analógico-digital, cujo sinal de

saída é transmitido para um processador digital de sinal para a conversão de varredura e exibição da imagem na tela do monitor. O sistema de movimento/posicionamento e processamento de sinal é controlado e sincronizado pelo computador [2, 91].

O equipamento de ultrassom utilizado foi o Vevo 770 (VisualSonics, Toronto, Canadá) pertencente ao Laboratório Antonio Paes de Carvalho (Instituto de Biofísica da UFRJ, Rio de Janeiro). Este equipamento opera com um transdutor monoelemento e permite a visualização e quantificação de estruturas anatômicas, da hemodinâmica, e de intervenções terapêuticas de pequenos animais através de imagens com resolução de até 30 micrômetros. Por não ser invasivo, permite o monitoramento longitudinal de regimes terapêuticos através do acompanhamento do mesmo animal ao longo do tempo. O Vevo 770 opera na faixa de altas frequências (25 a 55MHz), e a resolução e profundidade de penetração dependem do tipo do transdutor escolhido. O transdutor inserido no cabeçote da sonda é utilizado para transmitir um pulso ultrassônico para o interior do animal através de um meio de acoplamento como água ou gel. À medida que o transdutor faz a varredura são adquiridas múltiplas linhas de ultrassom que são então combinadas para formar a imagem modo-B. O número máximo de linhas na varredura é 384 e este valor varia de acordo com a excursão da varredura, a frequência do transdutor e outros parâmetros.

A VisualSonics desenvolveu a série de sondas RMV-700 (*real-time microvisualization*) para otimização da geração de imagens de ultrassom de alta resolução para pesquisa em pequenos animais. Esta série tem como característica um *design* ergonômico e leve, com taxa de até 200 quadros/segundo e permite maior sensibilidade, profundidade de penetração e resolução.

No presente trabalho de dissertação foi utilizada a sonda RMV704 (VisualSonics, Toronto, Canadá) a qual possui um transdutor que funciona na frequência central de 40MHz. Este transdutor é composto de um copolímero com foco fixo. A sonda permite a obtenção de um campo de imagem com 10 x 10mm e a uma taxa de 34 quadros/segundo. O equipamento oferece a possibilidade de utilização manual ou um sistema de posicionamento mecânico da sonda conforme pode ser visualizado no esquema (Figura 4.1). Outras especificações técnicas da sonda são apresentadas na Tabela 4.1.

Foi utilizado um gel (Ultrax-gel; Farmativa Indústria e Comércio Ltda) para o acoplamento acústico, entre a sonda e o tecido, e para manutenção do foco do feixe ultrassônico na profundidade desejada.

Tabela 4.1 - Especificações técnicas da sonda RMV-704

SONDA DE ULTRASSOM MODELO: RMV-704	
Faixa de Frequência (MHz)	Até 60
Frequência (MHz)	40
Resolução axial ( $\mu\text{m}$ )	40
Resolução lateral ( $\mu\text{m}$ )	80
Comprimento focal (mm)	6
Profundidade do campo (mm)	1,5
Campo de imagem (mm)	14,6

## 4.2 ANIMAIS

Os animais, ratos Wistar fêmeas de 2-3 meses de idade, foram distribuídos em 3 grupos: grupo de variabilidade (GV, n=5), grupo de lesão no solear, (GS, n=6) e grupo de lesão no gastrocnêmio (GG, n=6). O grupo de variabilidade foi utilizado em testes prévios para avaliação da variabilidade e confiabilidade das medidas, enquanto os outros dois grupos foram submetidos ao protocolo de lesão por laceração para acompanhamento do processo de degeneração-regeneração.

Durante a aquisição das imagens, cada animal foi anestesiado com xilazina (10 a 15mg/kg) e ketamina (50 a 75mg/kg) e, então suas patas direita e/ou esquerda foram depiladas para evitar interferências nas imagens. Os animais foram posicionados em decúbito ventral na plataforma do equipamento, com a pata imobilizada de forma a manter a parte posterior voltada para a sonda de ultrassom e o ângulo desejado na articulação talocrural. Foram obtidas imagens transversais e longitudinais do tecido muscular do TS.

### 4.2.1 Grupo de variabilidade e confiabilidade das medidas (GV)

Os 5 animais do grupo GV, com peso de  $214,8 \pm 12,3\text{g}$  (média  $\pm$  1 desvio padrão), foram usados para análise da variabilidade da medida dos parâmetros de arquitetura muscular (ângulo de penação e espessura muscular) e sua correlação com o ângulo do tornozelo do rato.

Foram obtidas imagens das patas direitas destes ratos para dois ângulos diferentes da articulação do tornozelo: posição neutra e extensão máxima. Os ratos

foram posicionados na plataforma do equipamento e suas patas foram fixadas em cada posição do tornozelo sem uma ordem específica pré-determinada para que as imagens ultrassônicas fossem adquiridas. Foram obtidas fotos em cada posição (Panasonic DMC-FX12, *Matsushita Electric Industrial Co.*, Osaka, Japão) para o processamento e quantificação do ângulo do tornozelo através do pós-processamento destas no software ImageJ (NIH – National Institute of Health). Este protocolo de teste foi repetido uma semana depois para os ratos 1, 2 e 3.

A sonda com o transdutor foi operada manualmente sempre pelo mesmo pesquisador.

#### 4.2.2 Grupos de lesão (GG e GS)

Foram utilizados 12 animais para indução do modelo de lesão muscular e acompanhamento do processo de regeneração. O acompanhamento da evolução da região lesionada foi feito através de imagens de BMU em intervalos de 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a lesão. Todos os animais foram sacrificados para análise histológica (a ser finalizada), havendo uma perda no grupo GS com 14 dias após a lesão por causa desconhecida.

Os animais foram submetidos ao protocolo de lesão logo após a aquisição das imagens do músculo saudável, para realização de novos testes que permitiram a geração de imagens dos músculos imediatamente após a lesão.

Da mesma forma que no grupo GV, os ratos foram posicionados na plataforma com uma das patas imobilizadas e o pesquisador operou a sonda de ultrassom manualmente, até obter as melhores imagens para quantificação dos parâmetros biomecânicos e/ou visualização do local da lesão.

### 4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA LESÃO MUSCULAR POR LACERAÇÃO

O desenho de modelo de laceração utilizado foi desenvolvido no laboratório do Instituto de Biofísica da UFRJ e se baseou em modelos descritos por Menetrey *et al.* [71].

O protocolo consistiu em anestésiar os ratos profundamente, e posicioná-los em uma pequena mesa cirúrgica em decúbito ventral com a pata direita fixada para que fosse realizada uma incisão longitudinal posterior na pele, na área da panturrilha, e uma dissecação subcutânea permitindo a exposição do limite anatômico do músculo

gastrocnêmio, caracterizado por uma linha esbranquiçada na parte lateral da pata. Nesta altura, utilizando uma pinça, era realizada uma nova incisão para descolar o músculo gastrocnêmio, possibilitando o acesso ao músculo solear, posicionado imediatamente mais profundo do que o primeiro e facilmente reconhecido por sua cor avermelhada e seu tendão de origem proeminente. O solear era então cortado em sua extremidade lateral a uma distância de 60% de seu comprimento a partir da sua inserção distal, em aproximadamente 50% de sua largura e 100% de sua profundidade, sendo a pele rapidamente suturada utilizando fio de sutura de nylon (VICRYL 3.0) (Figura 4.2).

O protocolo de lesão no gastrocnêmio possuía os mesmos passos iniciais de anestesia e incisão para exposição de seu limite anatômico. Na mesma altura, era realizada nova incisão para descolar o gastrocnêmio da fáscia do bíceps femoral, que o recobre, expondo sua superfície anterior. O músculo era então cortado na sua parte medial a uma distância de 60% de seu comprimento a partir da sua inserção distal, em aproximadamente 50% de sua largura e 50% de sua profundidade (Figura 4.3), sendo a pele rapidamente suturada utilizando fio de sutura.

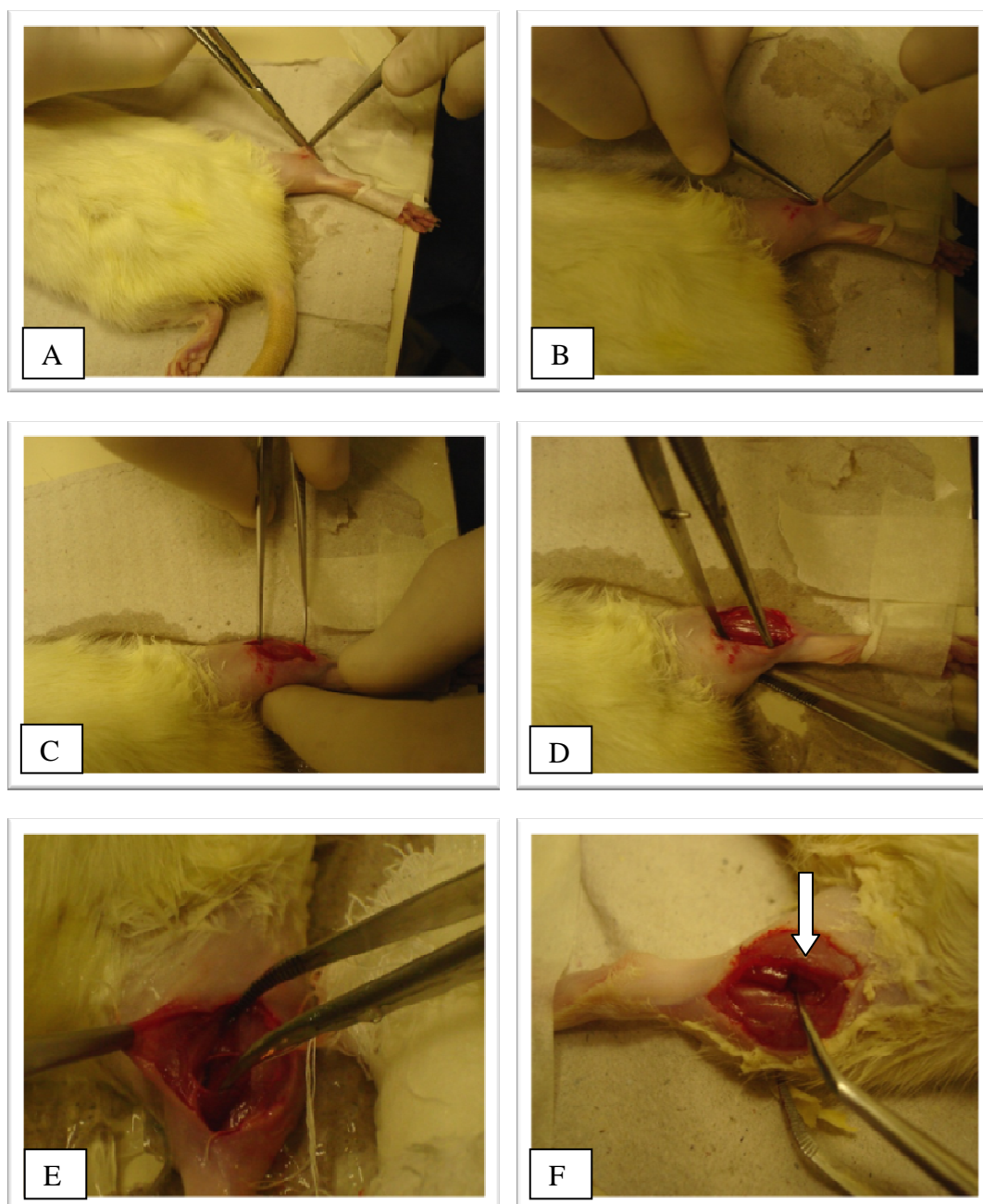


Figura 4.2 - Passos do protocolo de lesão no solear: (A e B) incisão longitudinal posterior na pele na área da panturrilha seguida de (C) dissecação subcutânea permitindo a exposição do limite anatômico do músculo gastrocnêmio. Nesta altura, (D e E) utilizando uma pinça, era realizada uma nova incisão para descolar o músculo gastrocnêmio, possibilitando o acesso ao músculo solear em que era realizada a (F) laceração, indicada pela seta.

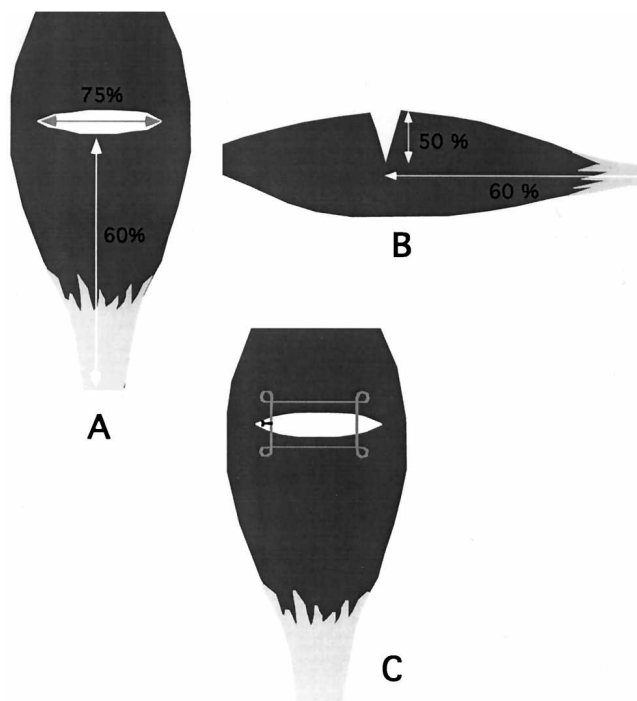


Figura 4.3 - representação esquemática do modelo de lesão no gastrocnêmio. A: distância da inserção distal; B: espessura; C: largura.

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOMECÂNICOS DE ARQUITETURA MUSCULAR

A espessura muscular e o ângulo de penação foram determinados nas imagens de ultrassom obtidas em um plano longitudinal em relação à linha de ação da musculatura, em pontos anatômicos identificáveis e determinados pelos testes piloto (espessura muscular), ou em fibras que pudessem ser bem visualizadas (ângulo de penação). Todas as medidas foram obtidas através de um programa computacional de análise de imagens, o *ImageJ* (*National Institute of Health, Maryland, EUA*) executado com imagens selecionadas de acordo com a melhor visualização das estruturas e pós-processadas (níveis de cinza e magnificação). As Figuras 4.5, 4.6 e 4.7 demonstram a metodologia aplicada.

Foram gravados vídeos com 100 quadros, dos quais foram selecionados cinco de cada pata, de acordo com a possibilidade de visualização e quantificação dos parâmetros. Em cada um dos cinco quadros, foram realizadas duas medições (sempre pelo mesmo avaliador) dos dois parâmetros sem ordem pré-determinada de quadro e

variável analisada. As Figuras 4.8, 4.9 e 4.10 apresentam fluxogramas dos testes e medições nas imagens para cada grupo de ratos.

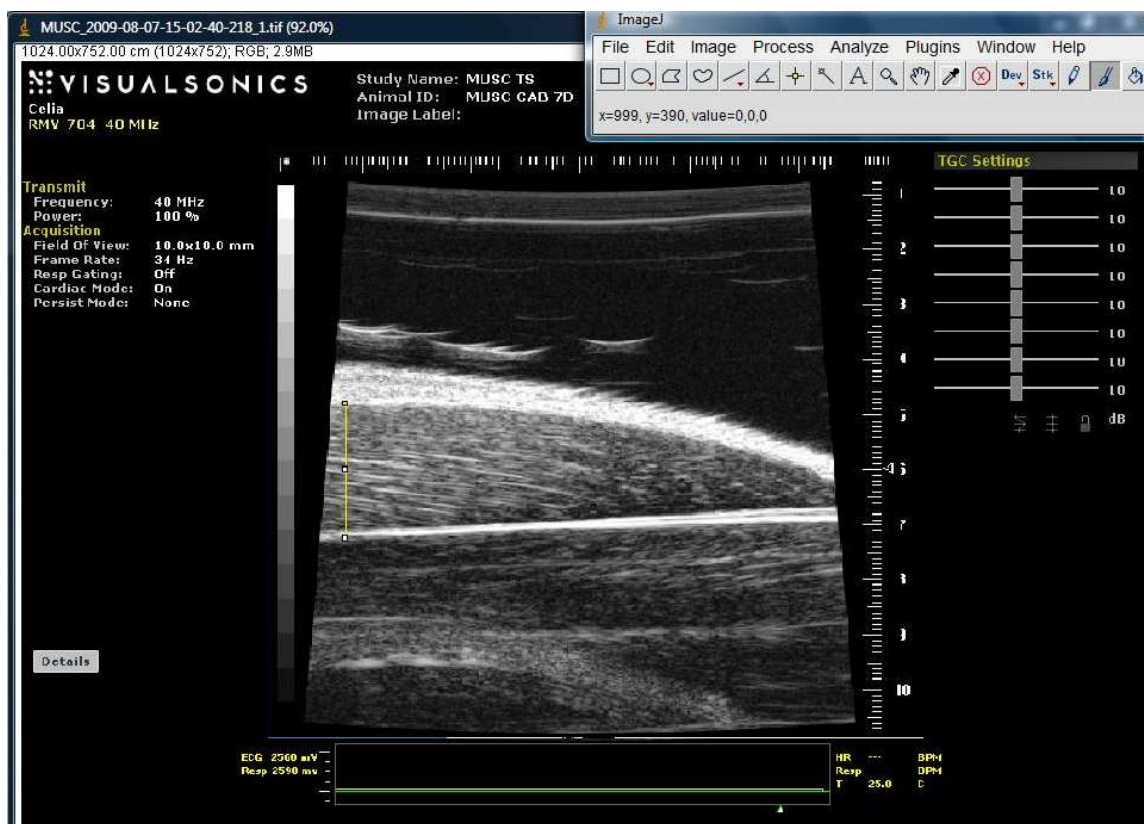


Figura 4.5 - Imagem ultrassônica processada pelo software *ImageJ* (NIH). A espessura muscular é dada pelo comprimento da reta amarela traçada com uma das ferramentas do programa. A barra no canto superior direito demonstra algumas das ferramentas do software.



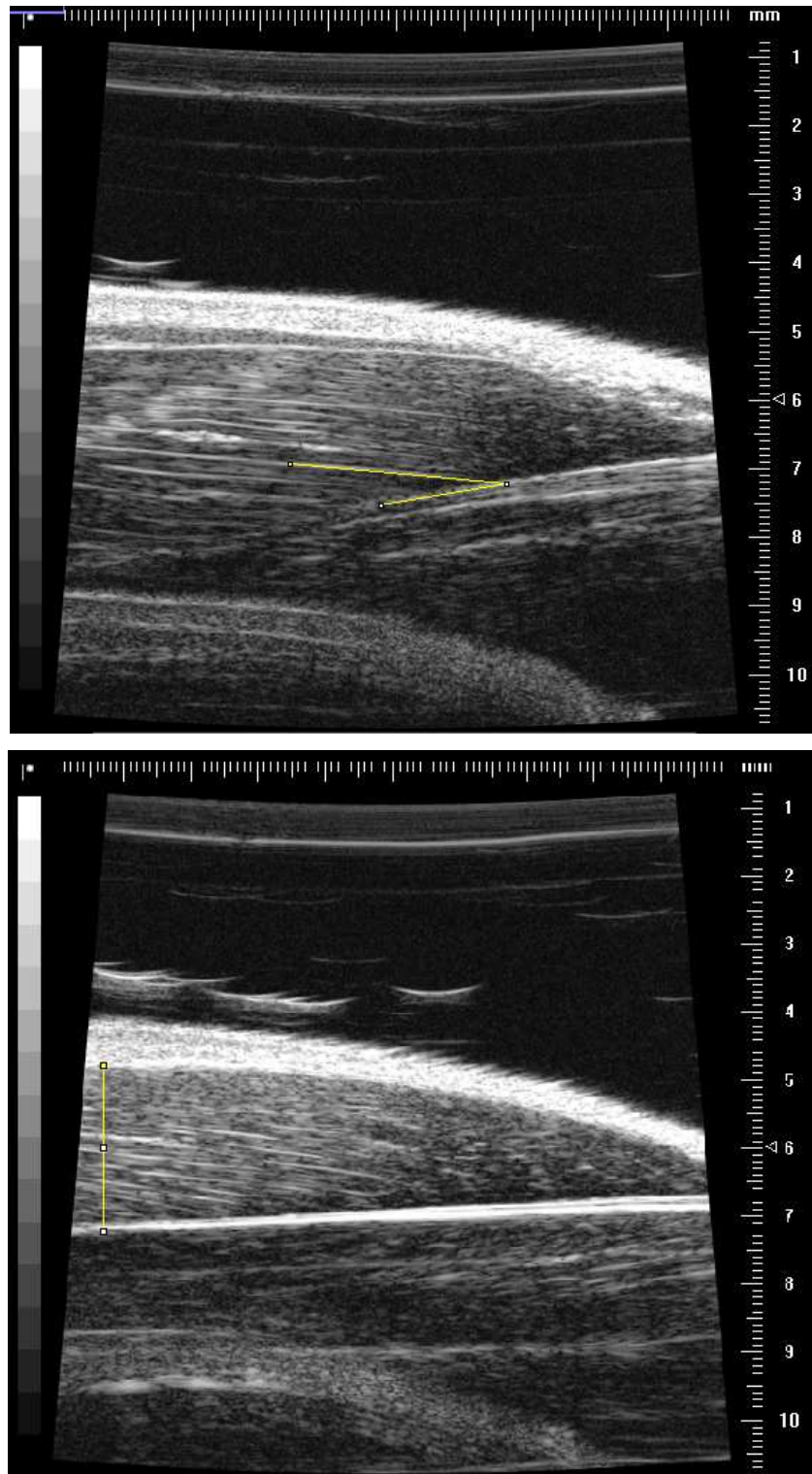


Figura 4.6 - Medição do AP (ângulo formado entre as retas amarelas, traçadas com ferramenta do software) e da EM (comprimento da reta amarela traçada com ferramenta do software) do gastrocnêmio lateral (GL) em imagem de US de alta resolução em ratos.

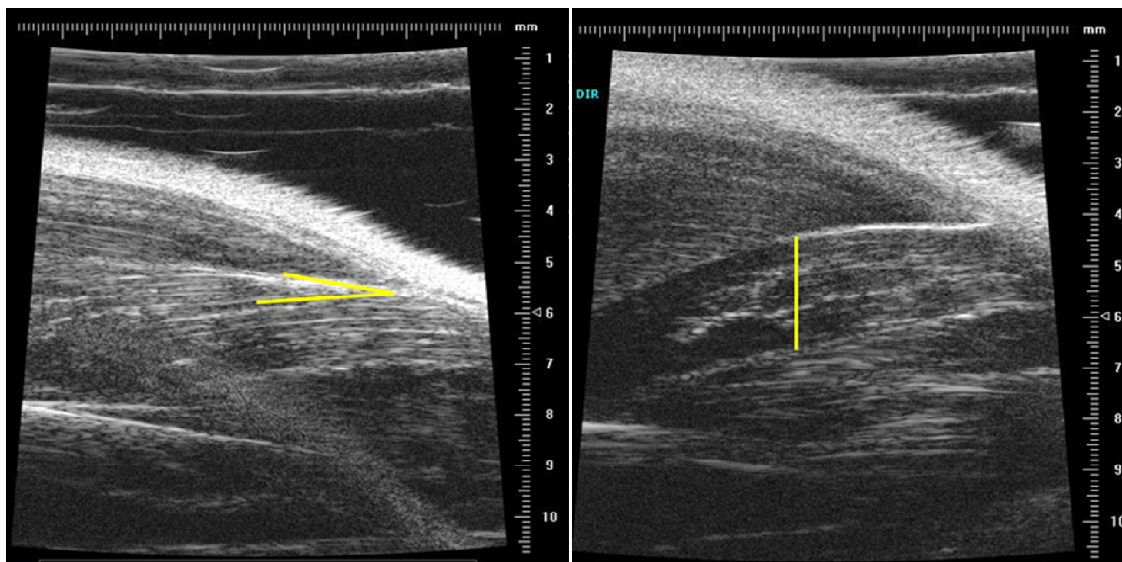


Figura 4.7 - Medição do AP (ângulo formado entre as retas amarelas, traçadas com ferramenta do software) e da EM (comprimento da reta amarela traçada com ferramenta do software) do solear (SOL) em imagem de US de alta resolução em ratos.

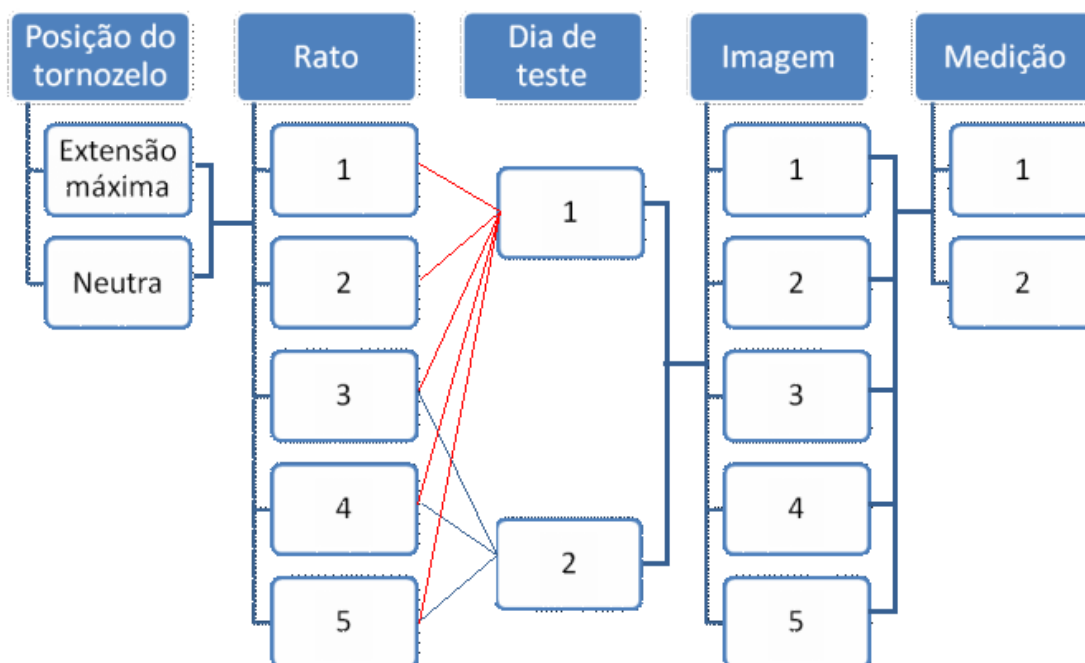


Figura 4.8 - Fluxograma do protocolo de escolha das imagens para medição do AP e EM do grupo de variabilidade (GV).

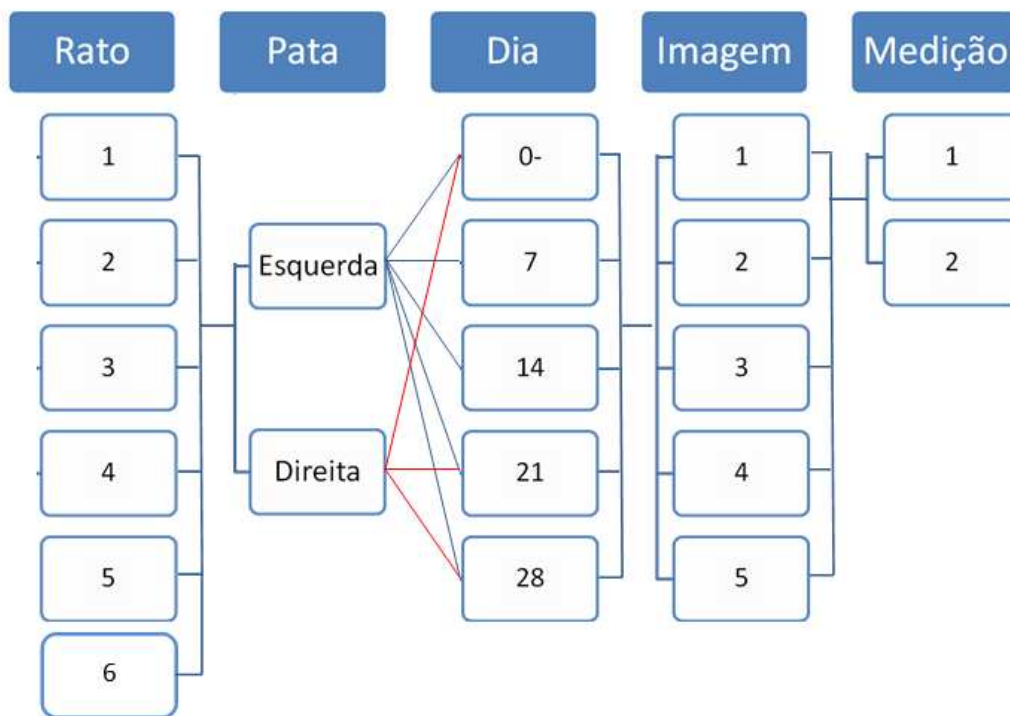


Figura 4.9 - Fluxograma do protocolo de escolha das imagens para medição do AP e EM do grupo de lesão no gastrocnêmio (GG).

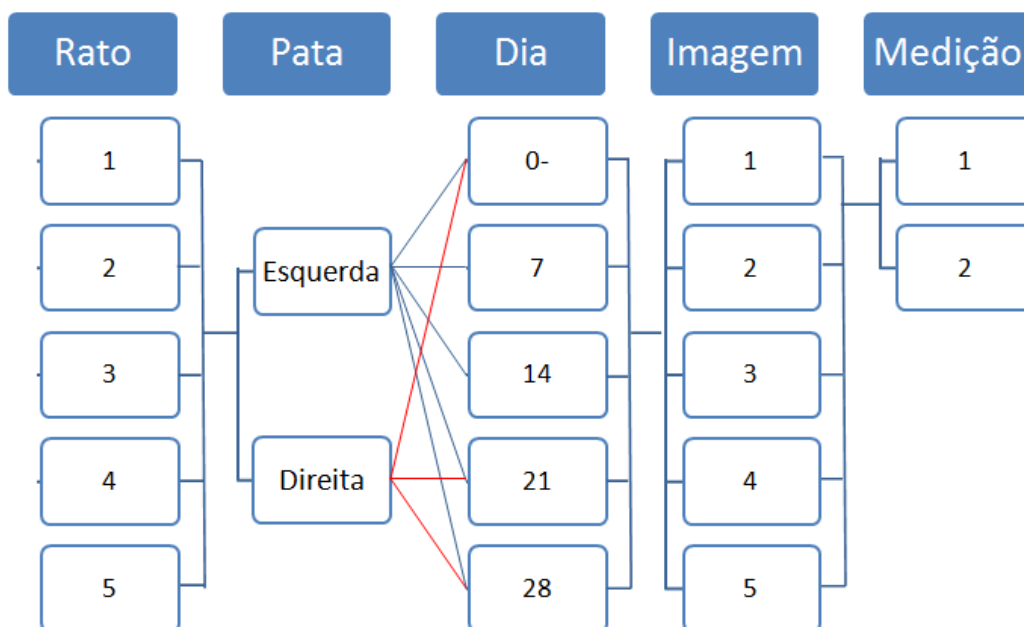


Figura 4.10 - Fluxograma do protocolo de escolha das imagens para medição do AP e EM do grupo de lesão no solear (GS).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após os experimentos *in vivo* e o processamento das imagens, foram realizadas as análises estatísticas usando o programa *STATISTIC 7.0* (*Statsoft*; Oakland, EUA). A estatística descritiva calculou os valores individuais dos sujeitos e a média aritmética (desvio-padrão) de todos os parâmetros medidos. Os testes estatísticos para o grupo de variabilidade compararam as medidas com o intuito de avaliar a dispersão e a confiabilidade das mesmas, e compararam os valores obtidos para dois ângulos articulares do tornozelo, correspondentes ao tornozelo em posição neutra e em extensão máxima. Os testes de hipótese para os grupos de lesão compararam os parâmetros biomecânicos (espessura muscular e ângulo de penação) do tecido muscular saudável (0-) com os correspondentes encontrados em diferentes estágios da lesão e da regeneração (0-, 21 e 28 dias para a pata direita e 0, 7, 14, 21 e 28 dias para a pata esquerda) através dos seguintes testes com nível de significância  $p < 0,05$ :

- Teste de aderência (*Kolmogorov-Smirnov*) para verificar a aproximação da distribuição dos dados observados com a distribuição normal teórica em cada grupo (GV, GS e GG);
- ANOVA *one-way* e *post-hoc* Tukey para verificar diferenças dos parâmetros entre os ratos em cada grupo (GV, GS e GG);
- ANOVA multifatorial (fatores: imagem e medida) e *post-hoc* Tukey para verificar diferenças entre as medidas realizadas repetidas vezes e em diferentes quadros de imagens em cada grupo (GV, GS e GG);
- ANOVA multifatorial (fatores: dia e posição articular) e *post-hoc* Tukey para verificar diferença entre os dias das medidas (1 e 2) e as posições do tornozelo (neutra e extensão máxima) para os ratos do grupo GV;
- ANOVA multifatorial (fatores: pata e momento após lesão) e *post-hoc* Tukey para verificar diferenças entre as patas (direita e esquerda) e os momentos após lesão (0, 21 e 28 dias após lesão) para os ratos dos grupos GS e GG;

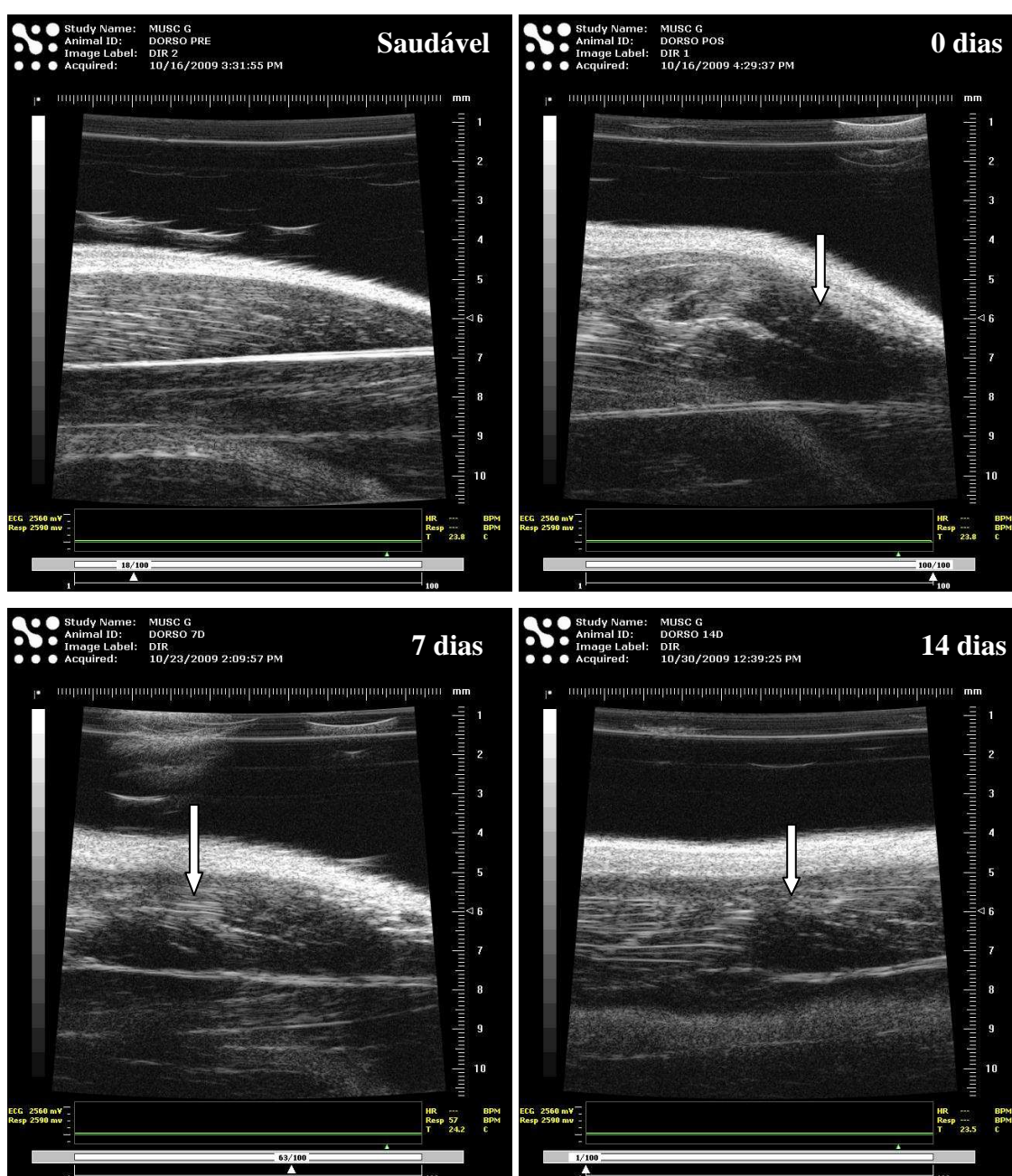
- ANOVA *one-way* e *post-hoc* Tukey para verificar as diferenças entre os momentos da pata esquerda (0, 7, 14, 21 e 28 dias após lesão);
- Coeficiente de Variação dos parâmetros medidos nas diferentes posições de tornozelo no grupo GV;
- Coeficiente de Variação dos parâmetros medidos nas duas patas e em todos os momentos após lesão dos grupos GS e GG;

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1 IMAGENS

Foram obtidas imagens longitudinais de alta resolução dos músculos GL e SOL das patas direita e esquerda nas condições saudável (0-), imediatamente após (0+), 7, 14, 21 e 28 dias após a lesão. A sequência das imagens obtidas nos diferentes dias para a pata lesionada pode ser vista nas Figuras 5.1 e 5.2.



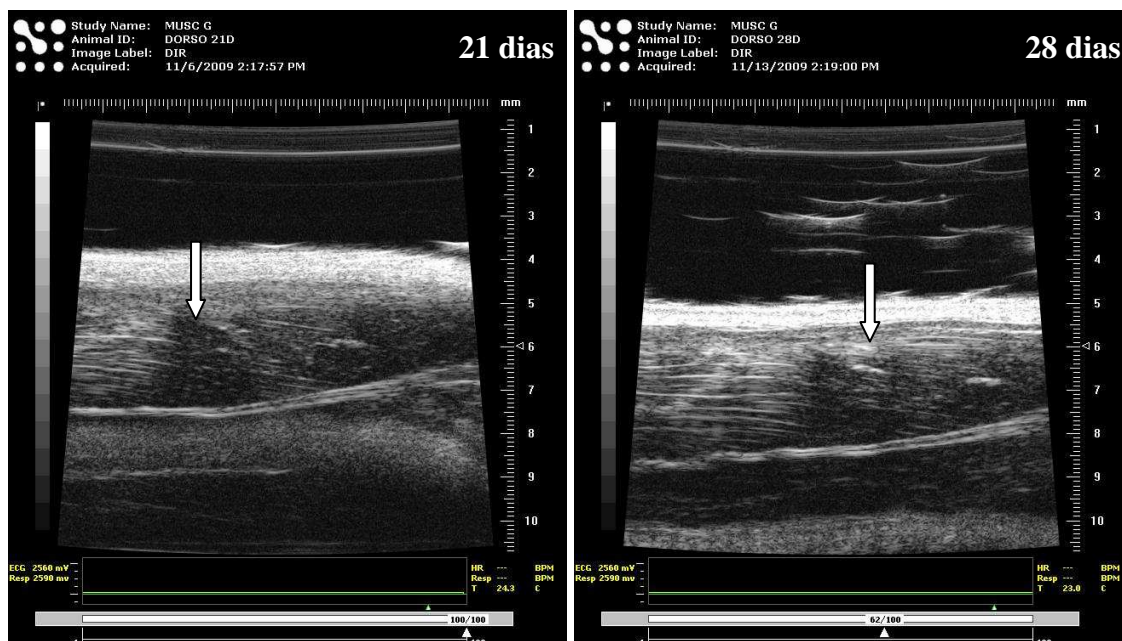
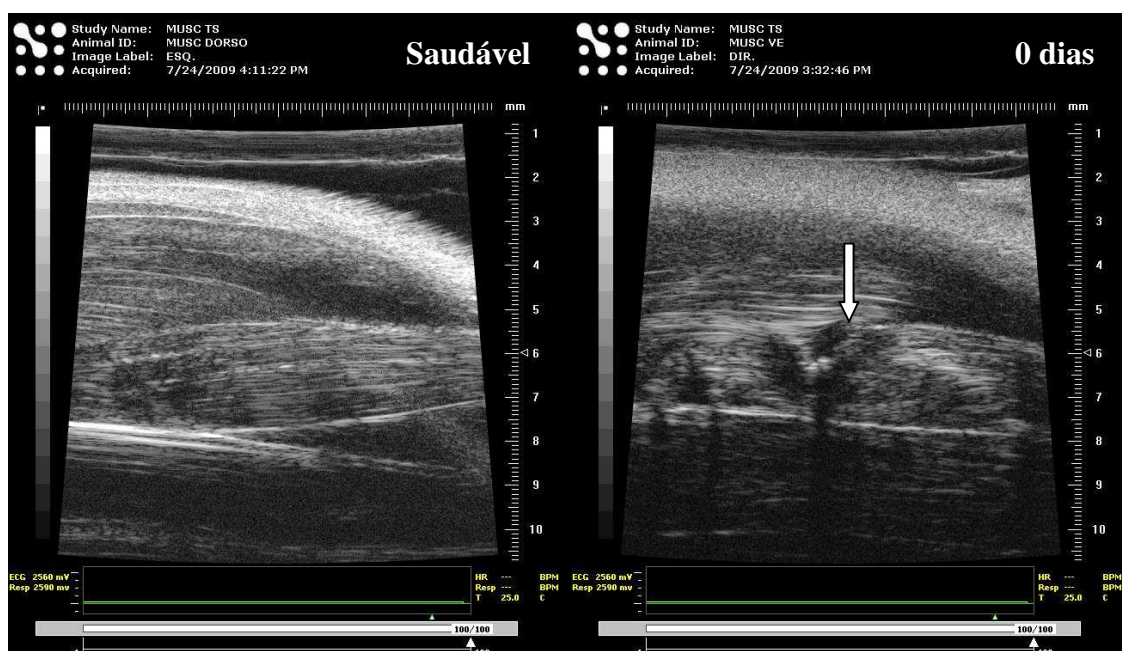


Figura 5.1 - Seqüência de imagens ultrassônicas do GL da pata direita nos diferentes momentos antes e depois da lesão. Saudável: fascículos e aponeuroses íntegras, permitindo a identificação do ângulo de penação e espessura muscular. 0 dia (imediatamente após a lesão): desorganização tecidual e descontinuidade dos fascículos e aponeuroses, com áreas hipoecóicas correspondentes a hemorragia e edema (seta), além de aumento expressivo da espessura muscular. 7 e 14 dias: aponeurose interna reorganizada com descontinuidade dos fascículos o que impede a medição dos parâmetros. 21 dias: reorganização tecidual incompleta com lacuna (seta) entre os fascículos. 28 dias: aparecimento de feixes hiperecóticos (seta) associados à cicatriz de tecido conectivo fibroadiposo.



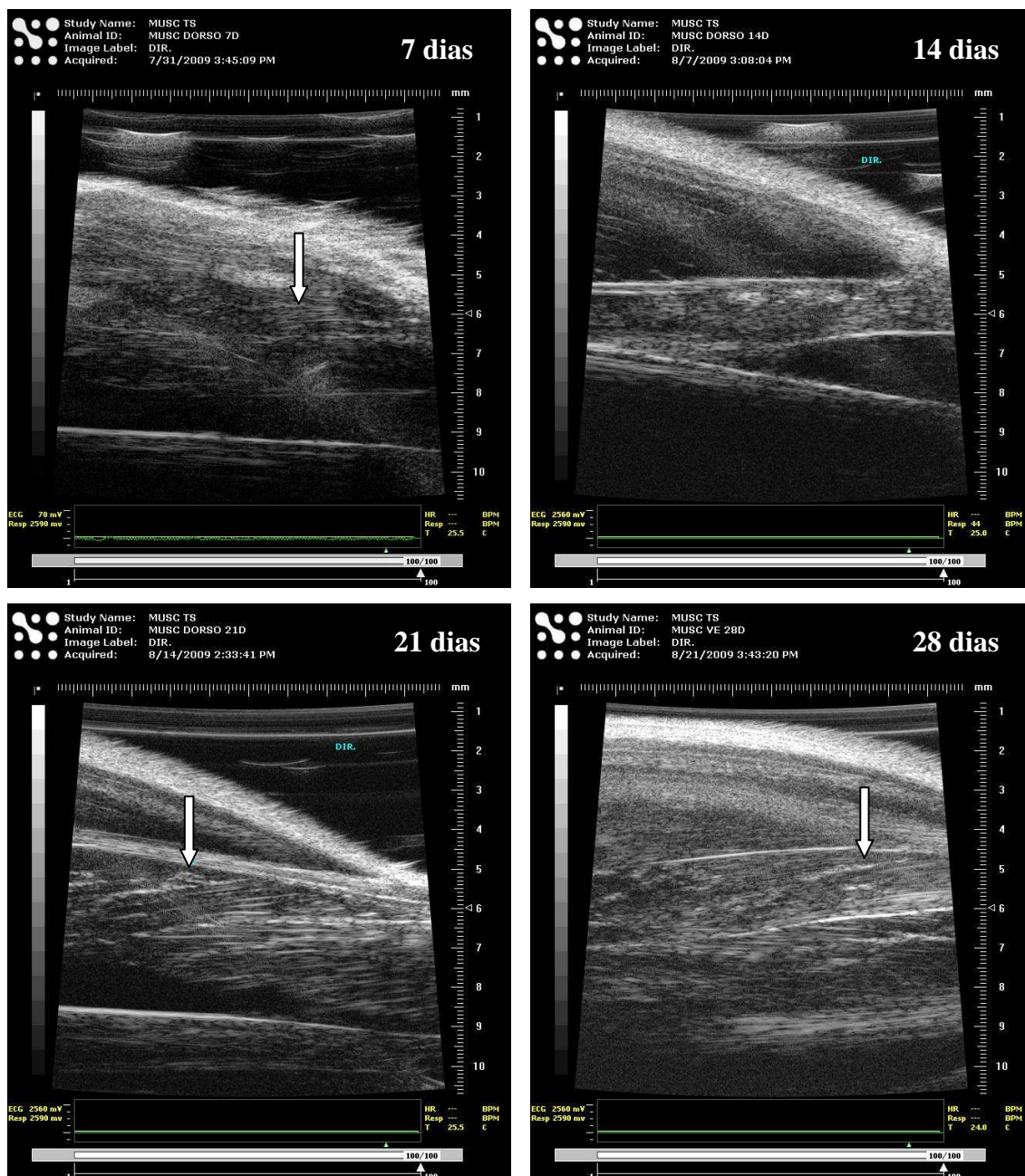


Figura 5.1 - Seqüência de imagens ultrassônicas do SOL da pata direita nos diferentes momentos antes e depois da lesão. Saudável: fascículos e aponeuroses íntegras, permitindo a identificação do ângulo de penação e espessura muscular. 0 dia (imediatamente após a lesão): desorganização tecidual e descontinuidade dos fascículos e aponeuroses, com áreas hipocóicas (seta) correspondentes a hemorragia e edema. 7 dias: desorganização tecidual, fascículos aparentemente frouxos (seta) e sem inserção e aponeurose superficial desorganizada. 14 dias: aponeurose interna reorganizada com descontinuidade dos fascículos o que impede a medição dos parâmetros. 21 e 28 dias: reorganização tecidual incompleta com aparcecimento de feixes hiperecóicos (seta) entre os fascículos associados à cicatriz de tecido conectivo fibroadiposo.



Os testes de aderência revelaram distribuição normal de todos os dados para os três grupos de animais.

## 5.2 GRUPO GV

Não houve diferença significativa dos valores das variáveis entre os ratos e, portanto, os testes seguintes foram realizados agrupando os dados de todos os ratos.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores das variáveis medidos duas vezes em cinco imagens, permitindo a utilização da média para os testes seguintes (Gráfico 5.1), sendo estas médias calculadas com um total de 50 dados (10 medidas para cada um dos cinco ratos).

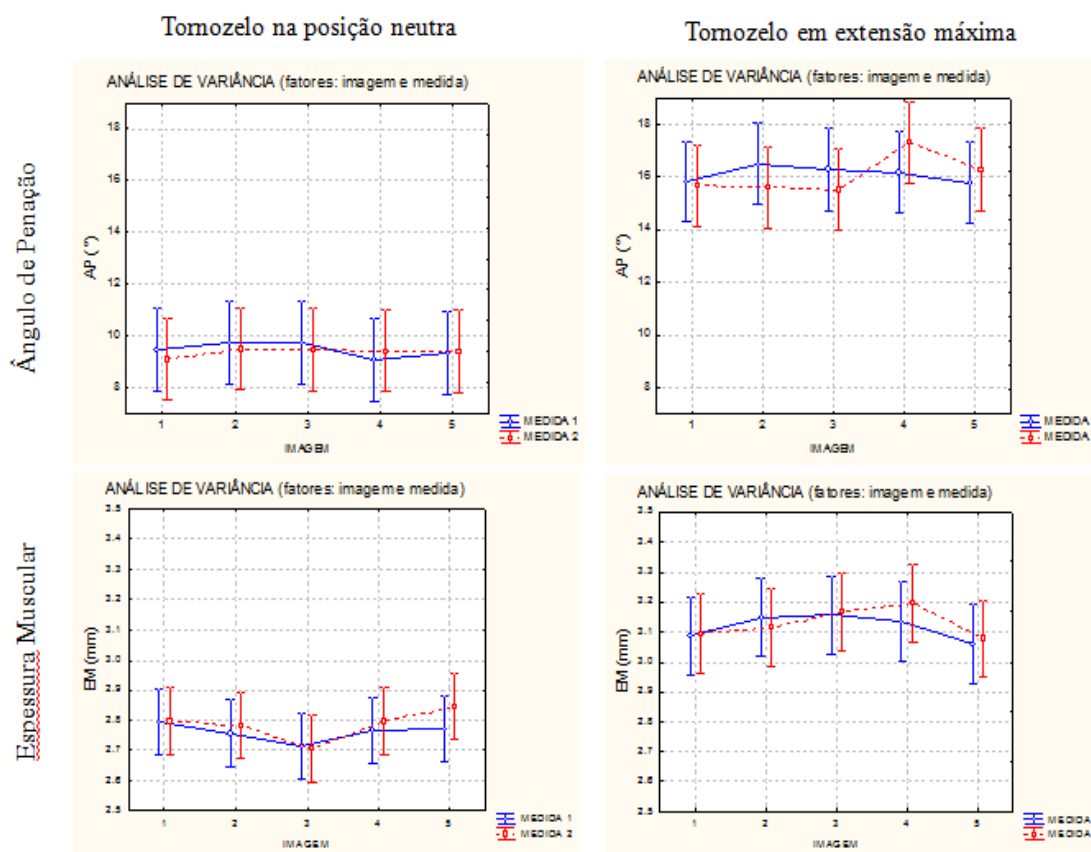


Gráfico 5.1: Valores de AP e EM de acordo com a repetição da medida e com as imagens utilizadas para medição nas duas posições de tornozelo.

Os valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação das medidas do ângulo de penação e espessura muscular do GL dos cinco ratos nas duas posições de tornozelo estão nas tabelas 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1 - Média e desvio-padrão de ângulo de penação e espessura muscular, do GL de cada rato. n (medidas para cada rato) = 10

	TORNOZELO									
	POSIÇÃO NEUTRA					EXTENSÃO MÁXIMA				
RATO	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Média ângulo de penação (°)	9,37	9,83	11,68	7,82	8,46	16,79	16,53	16,89	16,84	13,48
Desvio-padrão (°)	0,64	1,07	1,13	0,88	0,84	1,15	0,90	1,12	0,81	0,88
Média espessura muscular (mm)	2,76	2,73	2,91	2,72	2,73	3,14	3,04	3,05	3,19	3,19
Desvio-padrão (mm)	0,08	0,04	0,08	0,13	0,11	0,11	0,14	0,14	0,16	0,07

Tabela 5.2 - Média, desvio-padrão e coeficiente de variação do ângulo de penação e espessura muscular do GL nas duas posições de tornozelo de todos os dados. n (medidas para cada parâmetro) = 50

	Tornozelo em posição neutra		Tornozelo em extensão máxima	
	Ângulo de penação (°)	Espessura muscular (mm)	Ângulo de penação (°)	Espessura muscular (mm)
Média	9,69	2,79	16,18	3,13
Desvio-padrão	1,49	0,14	1,52	0,12
Coeficiente de Variação(%)	15,41	4,99	9,37	3,97

Não houve diferença significativa entre as médias das variáveis obtidas nos dois dias de protocolos de teste para cada posição de tornozelo, garantindo a reprodutibilidade do mesmo, e permitindo a utilização de todos os dados para os demais testes de hipóteses.

Foi observado um aumento estatisticamente significativo dos dois parâmetros (AP e EM) na posição de extensão máxima de tornozelo em relação à posição neutra, conforme demonstrado no gráfico 5.2, sugerindo a associação dos parâmetros estudados com o ângulo articular.

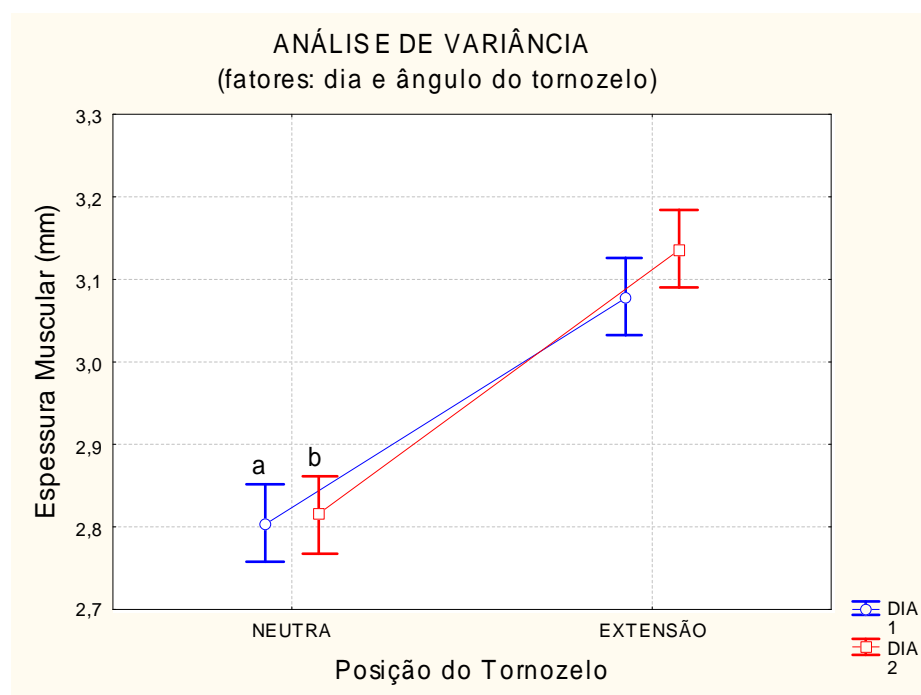
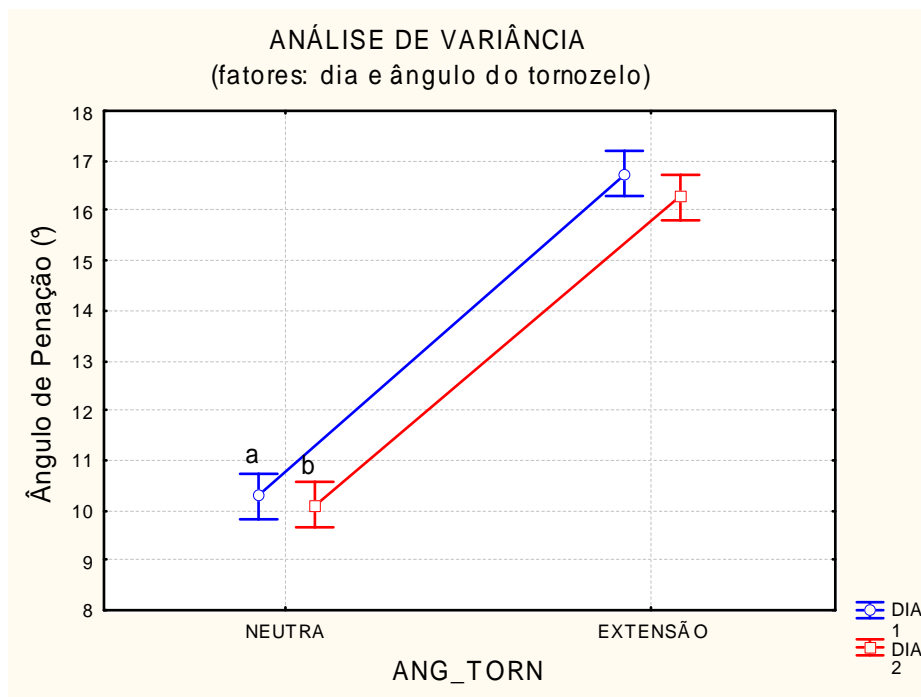


Gráfico 5.2: Valores de AP e EM nas duas posições de tornozelo e nos dois dias diferentes de teste. a, b - diferença estatisticamente significativa entre as posições intradias.

### 5.3 GRUPO GG

Não houve diferença significativa dos valores das variáveis entre os ratos e, portanto, os testes seguintes foram realizados agrupando os dados de todos.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores das variáveis medidos duas vezes em cinco imagens, permitindo a utilização da média para os testes seguintes (gráfico 5.3).

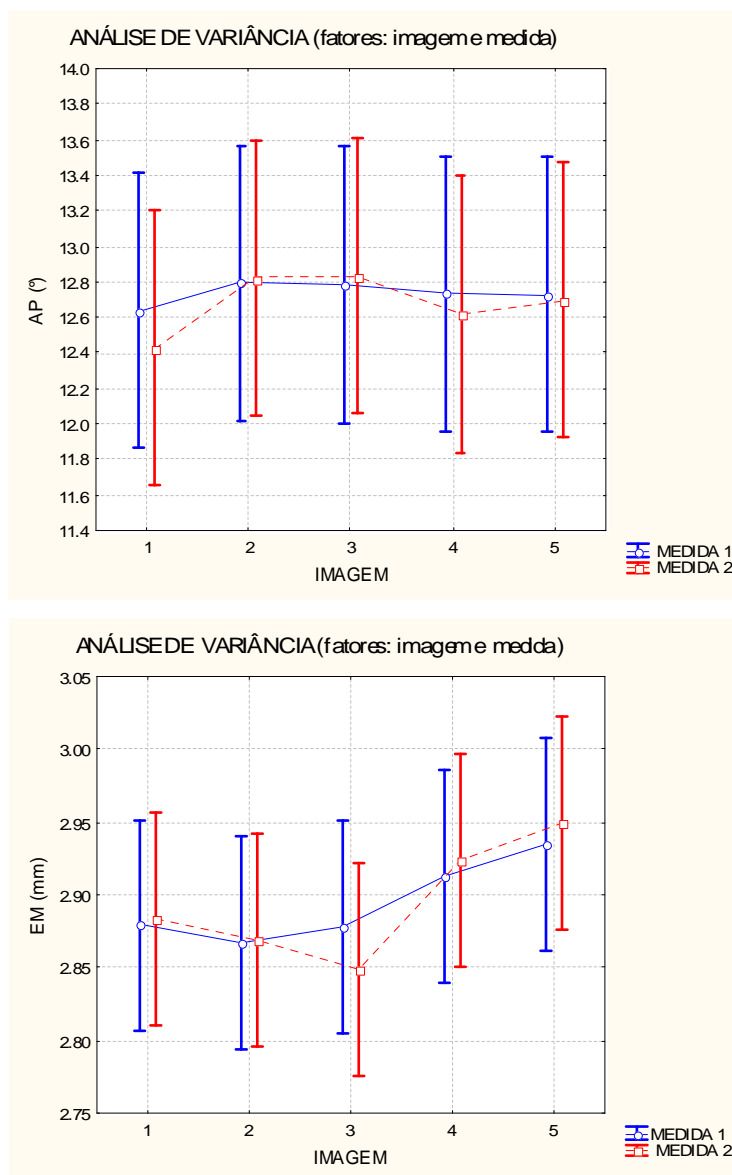


Gráfico 5.3: Variação dos valores de AP e EM de acordo com a repetição da medida e com as imagens utilizadas para medição no músculo GL.

Os valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação das medidas do ângulo de penação e espessura muscular das duas patas nos diferentes momentos associados à lesão estão nas tabelas 5.3, 5.4 e 5.5. Não foi possível realizar a quantificação dos parâmetros nas imagens de pata direita 7 e 14 dias após lesão devido à alterações no padrão de organização das fibras musculares. Portanto, a comparação das variáveis entre as duas patas foi feita somente nos seguintes momentos: saudável, 21 e 28 dias após lesão.

Tabela 5.3: Média e desvio-padrão do AP e EM da pata direita do GL. n (medidas para cada parâmetro) = 60

PATA DIREITA							
ÂNGULO DE PENAÇÃO				ESPESSURA MUSCULAR			
Intervalos (dias)	0-	21	28 dias	Intervalos (dias)	0-	21 dias	28 dias
Média (°)	10,99	10,95	10,83	Média(mm)	2,69	2,83	2,85
Desvio-padrão (°)	0,81	0,62	0,92	Desvio-padrão(mm)	0,34	0,20	0,13
CV (%)	7,38	5,66	8,50	CV (%)	12,57	6,93	4,68

Tabela 5.4: Média e desvio-padrão do ângulo de penação da pata esquerda do GL. n (medidas para cada parâmetro) = 60

ÂNGULO DE PENAÇÃO - PATA ESQUERDA					
Intervalos (dias)	0-	7	14	21	28
Média (°)	10,68	12,65	15,25	13,79	16,53
Desvio-padrão (°)	1,19	1,16	1,89	1,47	1,85
CV %	11,13	9,13	12,38	10,63	11,19

Tabela 5.5: Média e desvio-padrão da espessura muscular da pata esquerda do GL. n (medidas para cada parâmetro) = 60

ESPESSURA MUSCULAR - PATA ESQUERDA					
Intervalos (dias)	0-	7	14	21	28
Média (mm)	2,92	2,94	2,88	2,93	3,13
Desvio-padrão (mm)	0,16	0,22	0,14	0,06	0,20
CV (%)	5,50	7,49	4,88	1,97	6,40

Foi possível observar um aumento progressivo e significativo nos valores de ângulo de penação da pata esquerda ( $p=0,0001$ ) o que não ocorreu com o músculo da pata lesionada que manteve os valores anteriores à lesão, como mostrado no gráfico 5.4. A espessura muscular apresentou tendência de aumento dos valores embora só tenha

sido detectada diferença significativa entre a pata direita saudável e a pata esquerda 28 dias após lesão ( $p=0,008$ ) (gráfico 5.5).

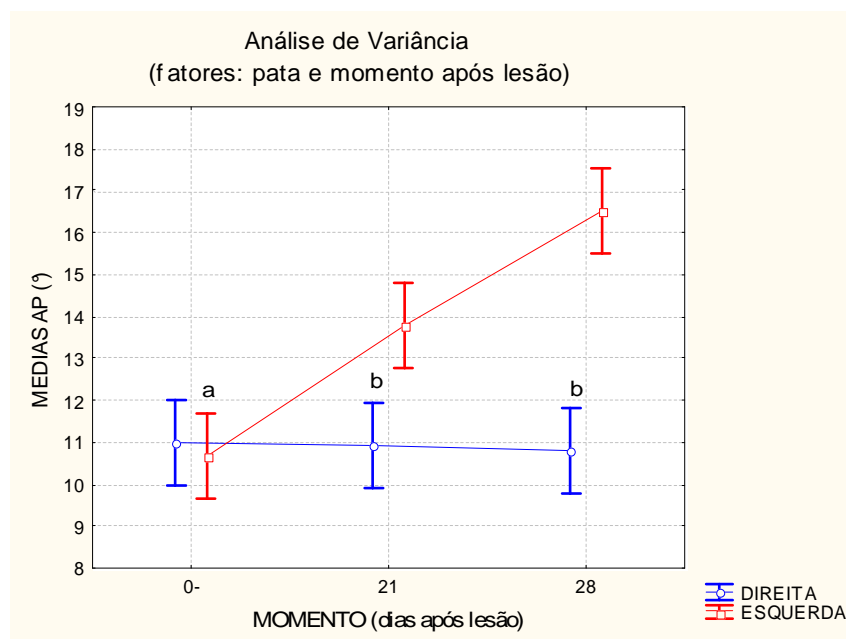


Gráfico 5.4: Valores de ângulo de penação do GL em três momentos após a lesão (0-, 21 e 28 dias após a lesão) e nas duas patas (direita e esquerda). a - diferença estatisticamente significativa intrapatras e interdias. b - diferença estatisticamente significativa intradias e interpatas.

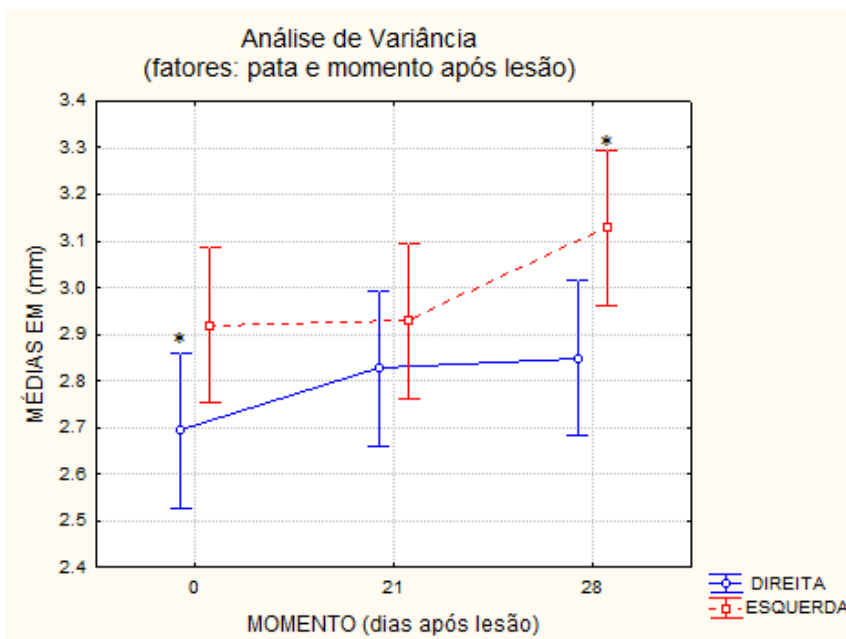


Gráfico 5.5: Valores de espessura muscular do GL em três momentos após a lesão (0-, 21 e 28 dias após a lesão) e nas duas patas (direita e esquerda). \* - diferença estatisticamente significativa.

A análise de variância dos cinco intervalos (saudável, 7, 14, 21 e 28 dias após lesão) da pata esquerda demonstrou o aumento progressivo dos valores de ângulo de penação (10,67, 12,65, 15,24, 13,78 e 16,52°, respectivamente) tendo detectado diferenças significativas entre as condições mostradas nos gráficos 5.6 e 5.7. A espessura muscular não apresentou diferenças embora pareça seguir a mesma tendência de aumento progressivo dos valores.

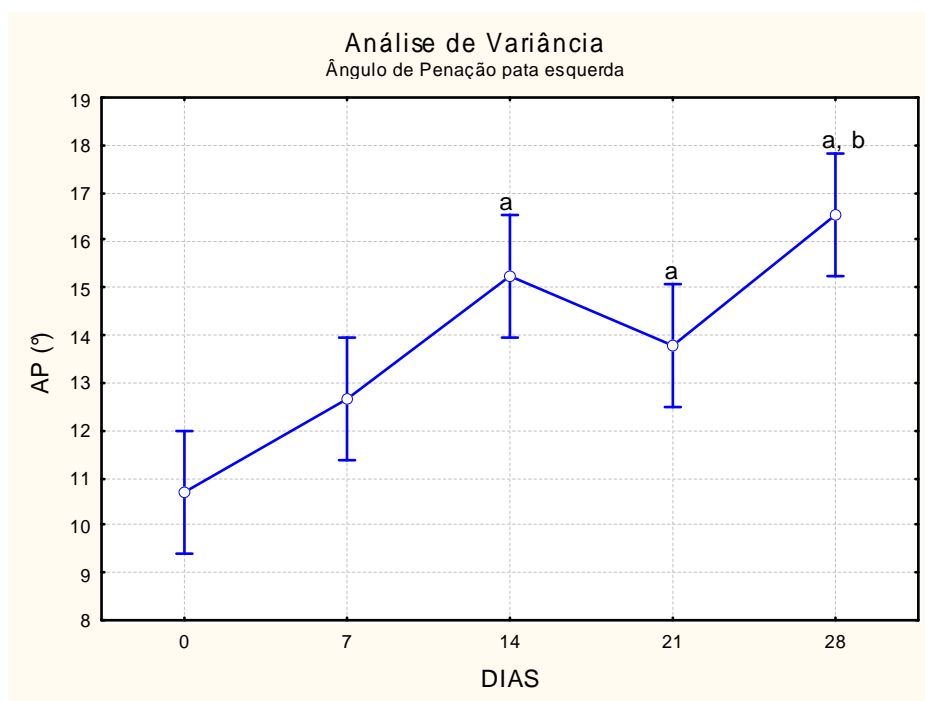


Gráfico 5.6: Valores de ângulo de penação do GL da pata esquerda nas condições saudável, 7, 14, 21 e 28 dias após lesão. a – diferença estatisticamente significativa para a condição saudável. b - diferença estatisticamente significativa para a condição 7 dias após lesão.

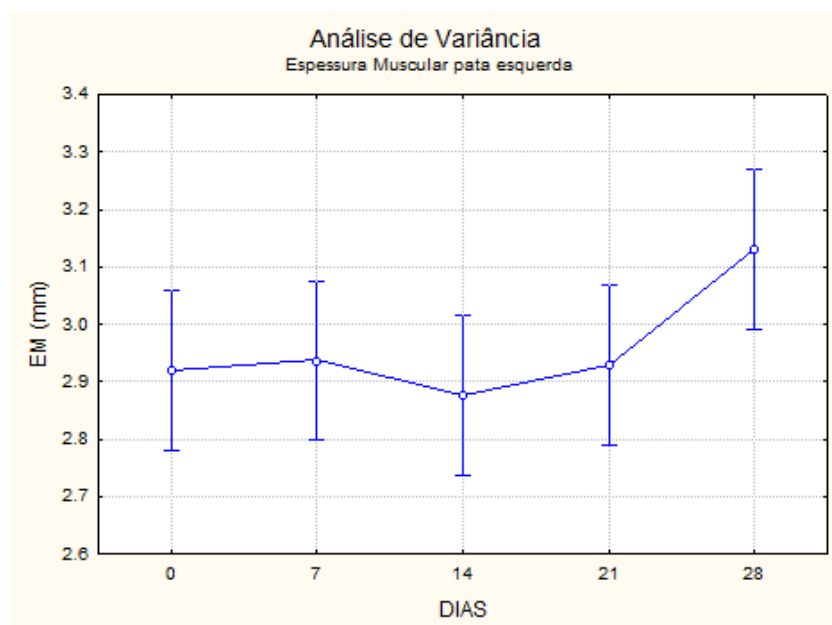


Gráfico 5.7: Valores de espessura muscular do GL da pata esquerda nas condições saudável, 7, 14, 21 e 28 dias após lesão

Os resultados das medidas do ângulo do tornozelo dos ratos do grupo *GG* nos intervalos de 14, 21 e 28 dias após a lesão encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 5.10: Ângulo articular talocrural em diferentes dias de teste.

Intervalo após lesão	Média ângulo (°)	Desvio-padrão (°)	CV (%)
14 dias	143,41	6,23	4,35
21 dias	141,48	5,01	3,54
28 dias	140,54	5,79	4,12

#### 5.4 GRUPO GS

Não houve diferença significativa dos valores das variáveis entre os ratos para o ângulo de penação, mas houve diferença para a espessura muscular como mostra o gráfico 5.8. Portanto, os testes seguintes foram realizados agrupando os dados dos ratos de acordo com a igualdade de distribuição.



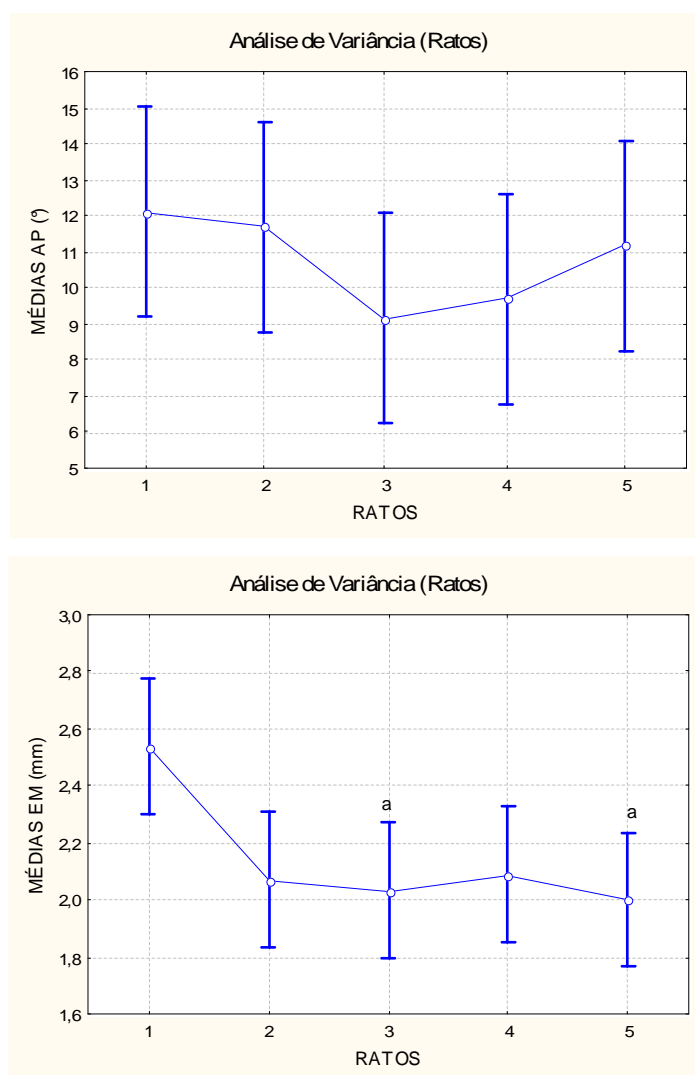


Gráfico 5.8: Valores de AP e EM dos cinco ratos do GS. a - diferença estatisticamente significativa para o rato 1.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores das variáveis medidos duas vezes em cinco imagens, permitindo a utilização da média para os testes seguintes (gráfico 5.9).

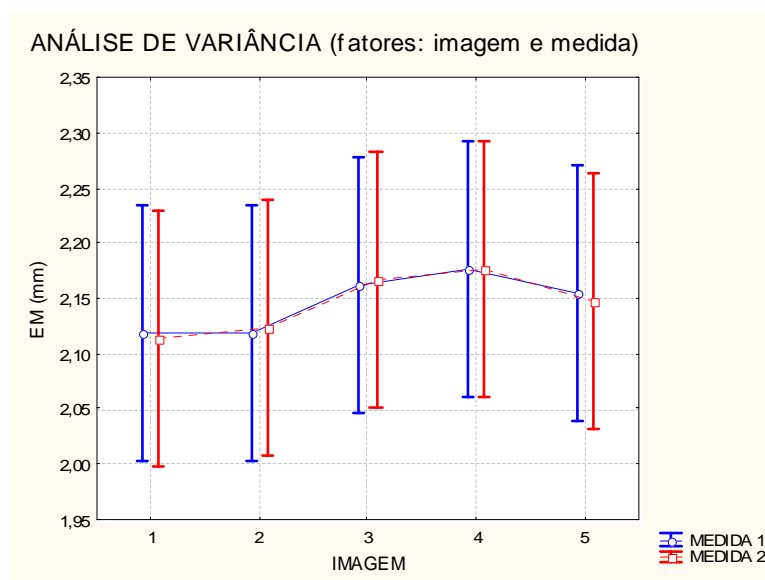
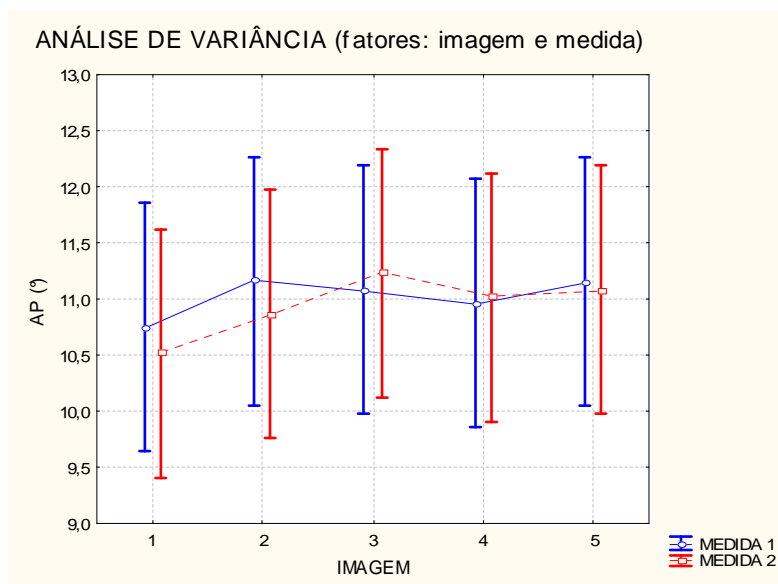


Gráfico 5.9: Variação dos valores de AP e EM de acordo com a repetição da medida e com as imagens utilizadas para medição no músculo SOL.

Os valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação das medidas do ângulo de penação e espessura muscular das duas patas nos diferentes momentos associados à lesão estão nas tabelas 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9. Não foi possível realizar a quantificação dos parâmetros nas imagens de pata direita 7 e 14 dias após lesão, devido à alterações no padrão de organização das fibras musculares. Portanto, a comparação das variáveis entre as duas patas obedeceu à disponibilidade dos dados.

Tabela 5.6: Média e desvio-padrão do ângulo de penação da pata direita do SOL. n (medidas para cada parâmetro) = 50

ÂNGULO DE PENAÇÃO - PATA DIREITA			
Intervalo (dias)	0-	21	28
Média (°)	8,22	10,92	7,64
Desvio-padrão (°)	2,45	2,47	3,87
CV (%)	29,89	22,6	50,73

Tabela 5.7: Média e desvio-padrão da espessura muscular da pata direita do SOL. n(medidas para cada parâmetro) = 50

ESPESSURA MUSCULAR - PATA DIREITA			
Intervalo (dias)	0-	21	28
Média (mm)	2,25	2,075	2,082
Desvio-padrão (mm)	0,27	0,305	0,48
CV (%)	12,34	14,71	23,14

Tabela 5.8: Média e desvio-padrão do ângulo de penação da pata esquerda do SOL. n (medidas para cada parâmetro) = 50

ÂNGULO DE PENAÇÃO - PATA ESQUERDA					
Intervalo (dias)	0-	7	14	21	28
Média (°)	9,65	12,04	11,15	14,10	14,06
Desvio-padrão (°)	0,96	2,03	4,045	1,40	2,29
CV (%)	9,95	16,90	36,26	9,96	16,28

Tabela 5.9: Média e desvio-padrão da espessura muscular da pata esquerda do SOL. n (medidas para cada parâmetro) = 50

ESPESSURA MUSCULAR - PATA ESQUERDA					
Intervalo (dias)	0-	7	14	21	28
Média (mm)	2,12	2,14	2,40	1,87	2,35
Desvio-padrão (mm)	0,23	0,36	0,25	0,42	0,46
CV (%)	10,94	16,99	10,80	22,85	19,52

Assim como no gastrocnêmio, houve aumento gradual dos valores de ângulo de penação no decorrer do tempo após lesão com diferença estatisticamente significativa entre as duas patas ( $p < 0,001$ ) em diferentes momentos após lesão, como mostrado nos gráficos 5.10 e 5.11. A espessura muscular não apresentou diferenças significativas.

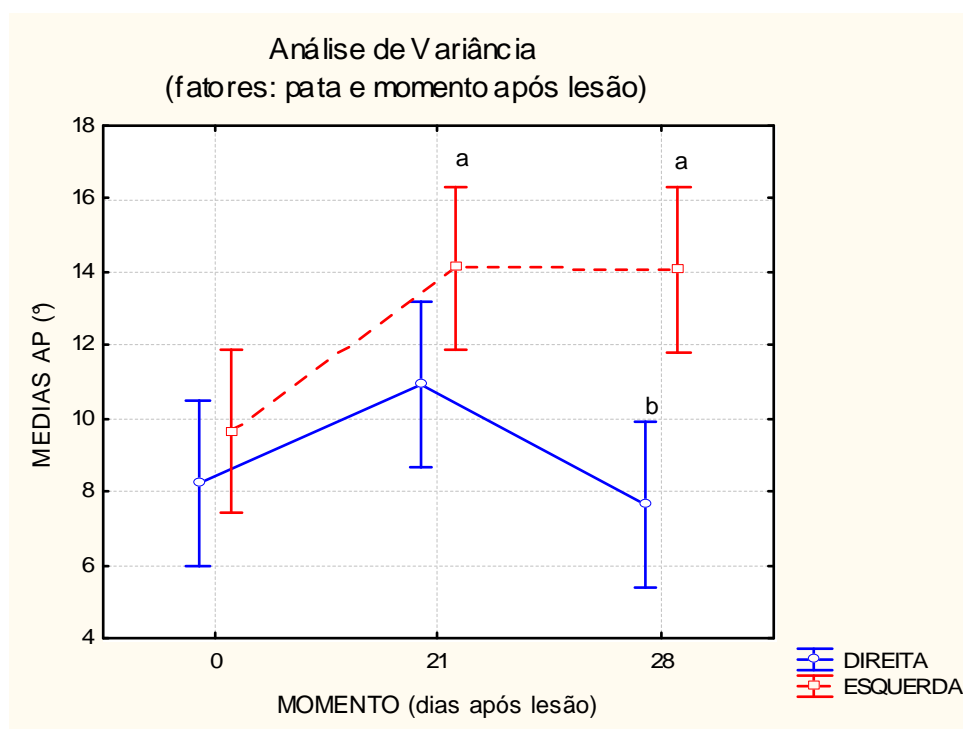


Gráfico 5.10: Valores de ângulo de penação do SOL em três momentos após a lesão (saúdável, 21 e 28 dias após a lesão) e nas duas patas (direita e esquerda). a - diferença estatisticamente significativa para a pata direita saúdável. b - diferença estatisticamente significativa intradias e interpatas.

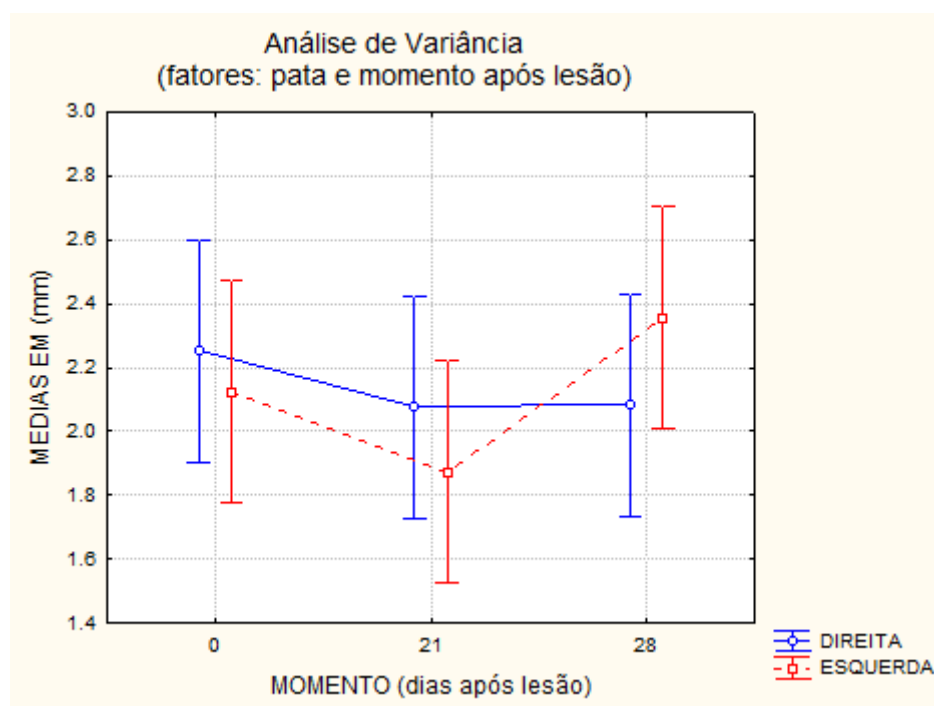


Gráfico 5.11: Valores de espessura muscular do SOL em três momentos após a lesão (saúdável, 21 e 28 dias após a lesão) e nas duas patas (direita e esquerda).

A análise de variância dos parâmetros medidos em todos os momentos do SOL da pata esquerda pode ser visualizada no gráfico 5.12 sugerindo a mesma tendência de aumento dos valores observada para o GL, embora sem diferença significativa para a espessura muscular e com valores-p marginais para o ângulo de penação (entre a condição saudável e os momentos 21 e 28 dias após a lesão –  $p=0,054$ ).

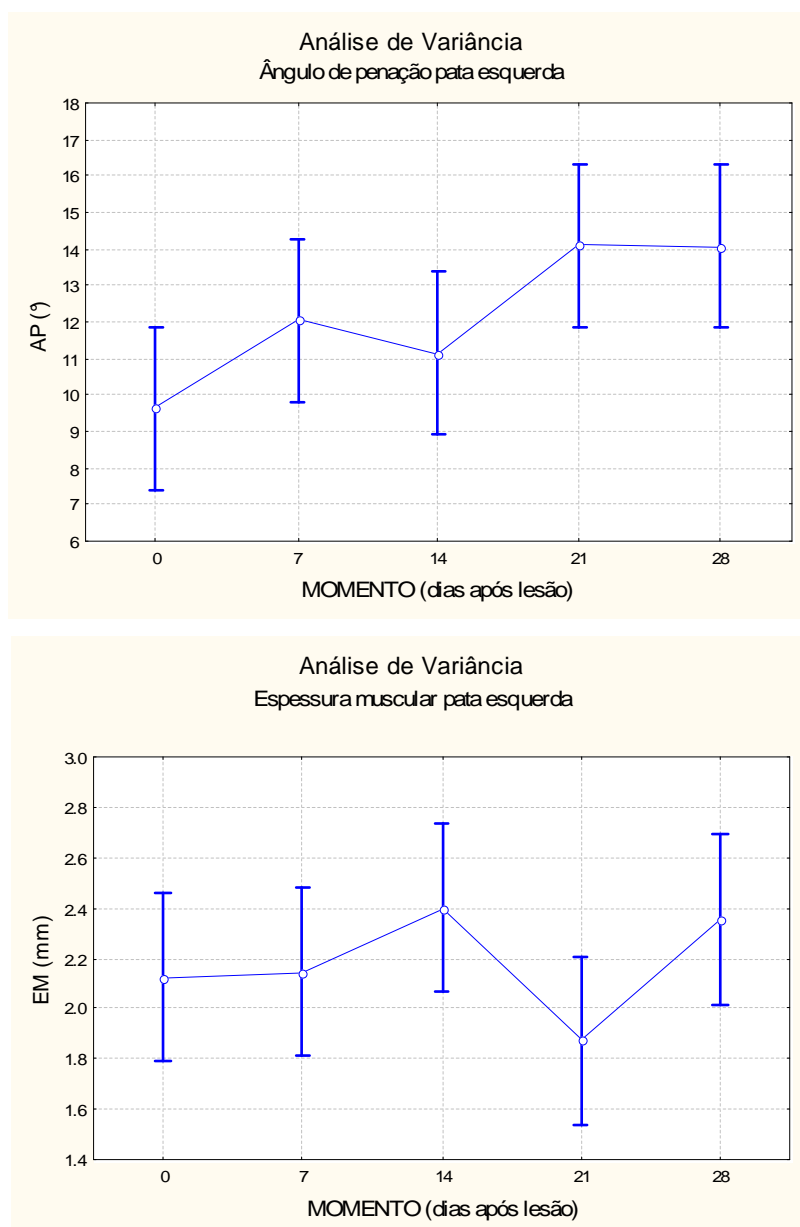


Gráfico 5.12: Valores de ângulo de penação e espessura muscular do SOL da pata esquerda nas condições saudável, 7, 14, 21 e 28 dias após lesão

## CAPÍTULO 6

### DISCUSSÃO

As pesquisas em arquitetura muscular, realizadas através de imagens, demonstraram que seus parâmetros são altamente mutáveis [12, 14, 39, 40, 43, 61, 92] e a compreensão de como diferentes regimes de treinamento ou sobrecarga muscular afetam a geometria muscular permitirá intervenções diretas para o aumento do potencial de produção de força. Já estão disponíveis resultados de estudos que examinam a plasticidade da arquitetura muscular ou comparam populações submetidas a diferentes tipos de treino em humanos [12, 14, 39, 40, 43, 61]. O desenho experimental com cobaias permite o acompanhamento longitudinal do mesmo indivíduo e das alterações provocadas por um processo de degeneração-regeneração induzido por doenças, traumas, tratamentos e condições diferenciadas de uso e desuso. A BMU surge como uma ferramenta que permite este acompanhamento, *in vivo*, em pesquisas básicas com animais e direcionadas para o avanço no estudo de doenças, lesões e diferentes tipos de tratamento, medicações e intervenções cirúrgicas, cujos resultados podem ser aproveitados e cautelosamente extrapolados para humanos.

Estudos realizados em humanos e coelhos saudáveis e com lesão, com equipamentos de ultrassom convencional de frequências mais baixas (entre 5 e 7,5MHz), mostram imagens similares às encontradas para os ratos na presente pesquisa [10, 22, 23, 36, 51, 93]. As imagens do tecido muscular dos animais lesionados, obtidas 7 e 14 dias após a lesão (Figuras 5.1 e 5.2) mostram grandes diferenças qualitativas daquelas obtidas para o músculo saudável e estão de acordo com a literatura para estudos ultrassonográficos (frequências de 5 a 7,5MHz) de lesões em humanos e coelhos [9, 22, 23, 36, 51, 93]. É possível destacar as seguintes diferenças: reflexão acentuada na interface da pele, com redução considerável do nível do sinal de eco na área constituída previamente de tecido muscular, o que corresponde ao aparecimento de áreas hipocóicas sem estruturas de fibras distinguíveis como visualizados nas demais imagens. Isso pode se justificar pelo fato de que a lesão provoca o aparecimento de cavidade hemorrágica, hematoma e edema durante o processo de regeneração muscular que, de acordo com Peetrons *et al.* [22], responsáveis por uma investigação ultrassonográfica de lesões em humanos, acarretam em uma hipocogenicidade difusa nas imagens de ultra-som com deslocamento dos fascículos de fibras. Estes autores relatam que lesões mais graves envolvendo um número grande de fibras musculares, como na lesão por laceração, exibirão hematomas hipocóicos ou até mesmo anecóicos,

que podem permanecer localizados ou estenderem-se por uma maior área muscular ao longo dos fascículos. De acordo com Menetrey *et al.* [71], em um músculo lacerado, o espaço lesionado é sempre preenchido com hematoma, tecido granular proliferativo, e cicatriz de tecido conectivo, elementos que tornam o reparo complexo e podem inibir a regeneração completa.

Nos intervalos de 21 e 28 dias após a lesão (Figuras 5.1 e 5.2), já é possível a visualização de fibras e tecido conectivo fibroadiposo embora de forma não tão organizada quanto aquela vista nas imagens dos músculos saudáveis. Sugere-se que nesses intervalos esteja ocorrendo a fase de amadurecimento do tecido muscular durante a regeneração com o aparecimento de feixes hiperecóticos, que podem corresponder à cicatriz fibrótica responsável por permitir a transmissão de carga no membro lesionado antes da conclusão do processo reparador [9, 22, 23, 36, 51, 93]. A quantificação do ângulo de penação e da espessura muscular não é possível nos intervalos de 7 e 14 dias após a lesão devido à desorganização da estrutura interna muscular, como pode ser visto na Figura 5.1. Após 21 e 28 dias a quantificação já é possível.

O ângulo de penação da pata esquerda (não-lesionada) do grupo de lesão no gastrocnêmio (GG) aumentou de 10,68 para 16,53°, o que corresponde a um aumento de 54,77%, valor muito maior do que o coeficiente de variação de AP obtidas no estudo da variabilidade desta medida. Ou seja, é possível sugerir que há incremento significativo do AP da pata saudável durante o período de regeneração muscular da pata contralateral tanto estatística quanto fisiologicamente. O mesmo pode ser observado para a variação do AP do grupo de lesão no solear (GS), no qual o aumento percentual foi de 45,69% (9,65 para 14,06°). A espessura muscular dos grupos GG e GS variaram de 2,92 para 3,13mm (7,56%), e de 2,12 para 2,35mm (10,84%), respectivamente, valores também acima do coeficiente de variação do GV para EM (3,97%).

O aumento progressivo do ângulo de penação e a tendência de aumento da espessura muscular da pata esquerda (não-lesionada) observados neste estudo sugerem uma resposta hipertrófica compensatória do membro contralateral saudável, que atuou com sobrecarga aumentada durante o período em que a produção de força pelo membro lesionado poderia provocar nova ruptura do tecido muscular. Como descrito na literatura clássica em biomecânica muscular, para uma área de seção transversal fisiológica e volume conhecidos, um ângulo de penação aumentado pode, em muitos casos, resultar em redução do comprimento da fibra, comprometendo a velocidade de encurtamento e a amplitude de variação do comprimento, mas também permite que uma

maior quantidade de material contrátil seja disposta em paralelo, aumentando a capacidade de produção de força, e a força máxima [94, 95].

Estudos em humanos que investigaram as alterações da arquitetura muscular provocadas por treinamento de força mostram que em resposta a um treinamento deste tipo as fibras musculares hipertrofiam e que, conseqüentemente, há um aumento do tamanho do músculo [39, 96]. Estes estudos medem o tamanho do músculo através de estimativas indiretas utilizando sua espessura. Em relação ao ângulo de penação, as pesquisas sugerem que há diferenças intermusculares nas respostas induzidas pelo treinamento na arquitetura da fibra, mas que o aumento neste parâmetro é uma conseqüência geral de músculos penados hipertrofiados [39, 97].

Koryak *et al.*[13] avaliaram as propriedades mecânicas do tríceps sural de humanos saudáveis e com desordens locomotoras funcionais através de imagens de ultrassom convencional. Os pacientes com desordem executam poucos movimentos rápidos e vigorosos na sua rotina diária, e, a hipotrofia associada ao desuso foi, durante muito tempo, medida pela redução da massa muscular, e da massa das fibras (especialmente tipo II). Os autores sugerem que a hipotrofia seja considerada sob o ponto de vista das mudanças de organização muscular interna, já que os músculos esqueléticos são, em sua maioria, penados. Sua pesquisa revelou diferenças substanciais na arquitetura muscular entre os indivíduos saudáveis e aqueles com deficiência de locomoção, os quais apresentaram uma redução no comprimento da fibra e no ângulo de penação. Narici e Cerretelli [97] detectaram valores menores de área de seção transversa anatômica ( $23,1 \pm 2,8\%$ ), volume (V), comprimento da fibra ( $12,7 \pm 1,9\%$ ) e ângulo de penação ( $16,42 \pm 2,9\%$ ) do gastrocnêmio medial para a perna lesionada em relação à saudável em indivíduos com atrofia unilateral. Estes resultados mostram similaridades com o do presente estudo, pois mesmo com diferenças no tipo de lesão e sendo realizado em humanos, são detectadas alterações nas características biomecânicas entre as condições saudável e de sobrecarga reduzida por disfunções. O presente estudo sugere que a diferença entre os membros seja devida a um aumento dos valores dos parâmetros no membro saudável e não a uma redução dos valores do membro lesionado.

Blazevich *et al.* [61], em um artigo de revisão sobre os efeitos de treinamento, destreino, imobilização, crescimento e envelhecimento na geometria muscular humana, concluíram que o treinamento de força de alta intensidade está sempre associado ao aumento do ângulo de penação e que o destreino e o envelhecimento estão relacionados à redução deste ângulo e/ou do comprimento da fibra, embora possa haver diferenças intermusculares.



Estudos com animais, reportados na literatura, realizaram análises histológicas e técnicas *in vitro* para avaliação muscular em diferentes condições. Filho *et al.* [98] estudaram histologicamente a resposta das fibras musculares do músculo sóleo de ratos submetidos ao treinamento em esteira e descreveram aumentos significativos nos diâmetros das mesmas. Além disso, estes autores detectaram, por análises histológicas e histoquímicas, eventos que se acentuaram com o tempo de execução do treinamento de força, como polimorfismo, fibras atroficas e angulosas, fibras arredondadas, aumento da atividade enzimática em algumas fibras e ausência quase total de atividade em outras, sugerindo a hipertrofia muscular, embora dependente do tempo de aplicação do exercício. Estes resultados corroboram com a resposta hipertrófica compensatória no membro saudável sobrecarregado encontrado nos testes realizados.

A variação de certos parâmetros biomecânicos com o ângulo articular foi estudada em humanos, sendo sugerida uma correlação alta com o ângulo de penetração e comprimento da fibra. Maganaris *et al.* [19] relataram que para uma variação do ângulo de tornozelo de 75 a 120°, o ângulo de penetração do gastrocnêmio medial aumentou de 6 para 12° em repouso e de 9 para 16° em contração voluntária máxima, enquanto a espessura muscular não apresentou diferenças significativas entre as posições de tornozelo. Narici *et al.* [20] relataram um aumento do ângulo de penetração do GM de 15,8 para 27,7°, quando a angulação do tornozelo variava de 90 a 150° sem atividade elétrica muscular. Os autores concluíram que a arquitetura do GM é significativamente afetada por mudanças no ângulo articular para o músculo em repouso, e pela intensidade da contração isométrica.

A existência desta associação foi verificada para os ratos do grupo de variabilidade e os resultados encontrados demonstram uma variação do ângulo de penetração do GL de  $9,69 \pm 1,49$  para  $16,17 \pm 1,52^\circ$  ( $p < 0,05$ ) e da espessura muscular de  $2,79 \pm 0,14$  para  $3,13 \pm 0,12\text{mm}$  ( $p < 0,05$ ) para o ângulo articular do tornozelo variando de  $104,86 \pm 3,13$  para  $151,8 \pm 2,60^\circ$ , embora seja sugerido um número amostral maior para estudo da correlação destes dados. A partir destes dados, foi escolhida a posição de extensão máxima para os testes dos grupos GS e GG, e a variabilidade do ângulo talocrural nesta posição foi analisada em termos do coeficiente de variação das medidas feitas nos intervalos de 14, 21 e 28 dias do GG (4,35, 3,54 e 4,12%, respectivamente). Considerou-se a variação muito pequena para influenciar os dados de AP obtidos.

Eng *et al.* [60] em estudo recente avaliaram parâmetros da arquitetura muscular dos músculos dos membros inferiores de ratos através de técnicas *in vitro* com o objetivo de analisar a especialização funcional de diferentes grupamentos e a expressão

desta especialização nas características biomecânicas. Os autores quantificaram o ângulo de penação com goniômetro em três regiões distintas de cada músculo, considerando o ângulo formado entre as fibras e o tendão distal e encontraram para o GL e o SOL  $14,2\pm 3,6$  e  $3,9\pm 2,4^\circ$ , respectivamente. As diferenças entre estes valores e a quantificação *in vivo* realizada no presente estudo podem ser explicadas por diversos fatores, incluindo aqueles que distinguem os dois tipos de pesquisa (*in vivo* e *in vitro*): o estado de *rigor mortis*, em que há uma contração lenta das fibras musculares; a contração do tecido conectivo e/ou redução do comprimento muscular devido aos fixadores utilizados; e a posição em que os músculos são armazenados para avaliação *in vitro* [44]. Eng *et al.* [60] utilizaram o tornozelo na posição neutra e o posicionamento das articulações envolvidas comprovadamente alteram o ângulo de penação.

O presente estudo apresentou algumas limitações. O protocolo de lesão, embora realizado como descrito na literatura e sempre pelo mesmo pesquisador, não eliminou completamente as diferenças entre as características da lesão em cada rato (tamanho, posição, profundidade).

Um dos ratos do grupo GS apresentou diferença estatística nos parâmetros em relação aos outros. Sua massa corporal (315g) era 42% maior do que a média do grupo (255,4g), e a diferença estatística da EM pode ser parcialmente justificada pela diferença do tamanho entre os animais. Heslinga *et al.*[99] demonstraram que o aumento do tamanho da tíbia possui uma relação linear com a massa corporal, e que o ângulo de penação aumenta com o crescimento do rato. Esta relação pode explicar a diferença.

A impossibilidade de medição dos parâmetros arquitetônicos na pata lesionada nos intervalos de 7 e 14 dias após a lesão não permitiu a comparação direta entre os dois membros, embora as imagens tenham demonstrado nitidamente a diferença qualitativa entre as condições saudável e lesionado, como o desaparecimento da estrutura organizacional interna das fibras musculares e o surgimento de áreas hipoecóicas, além de descontinuidade dos fascículos e das aponeuroses.

É necessário ainda aprimorar a metodologia de fixação da pata do animal no momento da aquisição das imagens, com a medição do ângulo articular, assegurando variações mínimas da geometria muscular associadas à posição do tornozelo.

Uma maior compreensão das adaptações geométricas dos fascículos musculares pode influenciar e direcionar programas de treinamento de alto nível e reabilitação, assim como permitir o desenvolvimento de modelos matemáticos preditores do desempenho muscular e das mudanças após intervenções de treinamento e

destreinamento. Estudos comparativos da arquitetura muscular em condições saudáveis e de diferentes tipos de lesão ou desordem são importantes e a técnica de BMU se mostrou como ferramenta para tais pesquisas em animais.

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSÃO

Esta pesquisa foi projetada para avaliar a utilização do método de biomicroscopia ultrassônica em tempo-real para aquisição de imagens do músculo esquelético de ratos objetivando obter dados quantitativos de suas características biomecânicas durante um período de regeneração muscular.

Os resultados obtidos *in vivo* indicam que a BMU permite a discriminação qualitativa e quantitativa entre o músculo saudável e lesionado, pois mostraram que é possível a aquisição de imagens com resolução suficiente para o detalhamento dos parâmetros arquitetônicos dos músculos constituintes do tríceps sural de ratos saudáveis e em diferentes intervalos após lesão por laceração com um ângulo articular pré-determinado.

O protocolo de aquisição de imagens e quantificação dos parâmetros mostrou-se confiável e permitiu medir o ângulo de penação e a espessura muscular do SOL e do GL com coeficientes de variação da pata saudável de 9,37 (AP) e 3,97% (EM) para o grupo de variabilidade, 7,38 (AP) e 12,57% (EM) para o grupo de lesão no gastrocnêmio (GG) e 9,95 (AP) e 10,94% (EM) para o grupo de lesão no solear (GS). Os testes estatísticos para avaliação da reprodutibilidade das medidas indicaram que os dados obtidos em imagens aleatórias e medições repetidas não apresentavam diferenças estatisticamente significativas (para nenhum dos grupos), reforçando a confiabilidade do protocolo de medição dos parâmetros AP e EM através das imagens de BMU.

O aumento do AP da pata esquerda (não-lesionada) no grupo GG de 10,68 para 16,53° (54,77% de aumento), juntamente com a variação da EM nos grupos GG (2,92 para 3,13mm = 7,56%) e GS (2,12 para 2,35mm = 10,84%), sugere uma resposta hipertrófica compensatória do membro contralateral saudável adaptativa à condição de sobrecarga aumentada durante o período em que a produção de força pelo membro lesionado poderia provocar nova ruptura do tecido muscular.

Os estudos realizados com humanos não permitiram até agora a avaliação anteriormente à lesão para comparação, o que é possível em pesquisas com animais com o uso da técnica de BMU, cujo potencial de aplicação para análise de tecido muscular esquelético foi estudado neste trabalho.

### Referências Bibliográficas

- [1] O. Aristizábal, D. Christopher, F. Foster, and D. Turnbull, "40-MHz echocardiography scanner for cardiovascular assessment of mouse embryos," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 24, 1998, pp. 1407–1417.
- [2] F. Foster, "Advances in ultrasound biomicroscopy," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 26, 2000, pp. 1-27.
- [3] F.S. Foster, "In Vivo Imaging of Embryonic Development in the Mouse Eye by Ultrasound Biomicroscopy," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 44, 2003, pp. 2361-2366.
- [4] M. Olsson, K. Campbell, and D.H. Turnbull, "Specification of Mouse Telencephalic and Mid-Hindbrain Progenitors Following Heterotopic Ultrasound-Guided Embryonic Transplantation," *Neuron*, vol. 19, 1997, pp. 761-772.
- [5] C.K. Phoon, "Imaging tools for the developmental biologist: ultrasound biomicroscopy of mouse embryonic development.," *Pediatric research*, vol. 60, 2006, pp. 14-21.
- [6] S.B. Chargé and M.A. Rudnicki, "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration.," *Physiological Reviews*, vol. 84, 2004, pp. 209-38.
- [7] T.A. Järvinen, T.L. Järvinen, M. Kääriäinen, H. Kalimo, and M. Järvinen, "Muscle injuries: biology and treatment.," *The American Journal of Sports medicine*, vol. 33, 2005, pp. 745-64.
- [8] M. Grounds, "Towards understanding skeletal muscle regeneration," *Pathology, Research and Practice*, vol. 187, 1991, pp. 1-22.
- [9] M. Lehto and A. Alanen, "Healing of a muscle trauma. Correlation of sonographical and histological findings in an experimental study in rats," *Journal of Ultrasound in Medicine*, vol. 6, 1987, pp. 425-429.
- [10] S.W. Middleton and J.E. Smith, "Muscle injuries," *Trauma*, vol. 9, 2007, pp. 5-11.
- [11] T. Jarvinen, M. Kaariainen, M. Jarvinen, and H. Kalimo, "Muscle strain injuries," *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 12, 2000, pp. 155-161.
- [12] R. Lieber and S. Bodine-Fowler, "Skeletal muscle mechanics: implications for rehabilitation," *Physical Therapy*, vol. 73, 1993, pp. 844-856.
- [13] Y.A. Koryak, "Functional and clinical significance of the architecture of human skeletal muscles," *Human Physiology*, vol. 34, 2008, pp. 482-492.
- [14] Y. Kawakami, T. Abe, H. Kanehisa, and T. Fukunaga, "Human skeletal muscle size and architecture: variability and interdependence," *American Journal of Human Biology*, vol. 18, 2006, pp. 845–848.
- [15] M. Narici, "Human skeletal muscle architecture studied in vivo by non-invasive imaging techniques: functional significance and applications," *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 9, 1999, pp. 97-103.

- [16] T. Fukunaga, Y. Kawakami, S. Kuno, K. Funato, and S. Fukashiro, "Muscle architecture and function in humans," *Journal of Biomechanics*, vol. 30, 1997, pp. 457–463.
- [17] R. Woittiez, P. Huijing, and R. Rozendal, "Influence of muscle architecture on the length-force diagram of mammalian muscle," *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 399, 1983, pp. 275–279.
- [18] Y. Kawakami, Y. Ichinose, and T. Fukunaga, "Architectural and functional features of human triceps surae muscles during contraction," *Journal of Applied Physiology*, vol. 85, 1998, pp. 398.
- [19] C.N. Maganaris, V. Baltzopoulos, and A.J. Sargeant, "In vivo measurements of the triceps surae complex architecture in man: implications for muscle function," *Journal of Physiology*, vol. 512, 1998, pp. 603-614.
- [20] M.V. Narici, T. Binzoni, E. Hiltbrand, J. Fasel, F. Terrier, and P. Cerretelli, "In vivo human gastrocnemius architecture with changing joint angle at rest and during graded isometric contraction," *Journal of Physiology*, vol. 496, 1996, pp. 287–297.
- [21] R.D. Herbert and S.C. Gandevia, "Changes in pennation with joint angle and muscle torque: in vivo measurements in human brachialis muscle," *Journal of Physiology*, vol. 484, 1995, pp. 523-532.
- [22] P. Peetrons, "Ultrasound of muscles.," *European Radiology*, vol. 12, 2002, pp. 35-43.
- [23] H. Harcke, L. Grissom, and M. Finkelstein, "Evaluation of the musculoskeletal system with sonography," *American Journal of Roentgenology*, vol. 150, 1988, pp. 1253-1261.
- [24] R. Boutin, R. Fritz, and L. Steinbach, "Imaging of sports-related muscle injuries," *Radiologic Clinics of North America*, vol. 40, 2002, pp. 333–362.
- [25] J. Jacobson, "Ultrasound in sports medicine," *Radiologic Clinics of North America*, vol. 40, 2002, pp. 363–386.
- [26] M. Van Holsbeeck, T. Marnix, and J.A. Jacobson, "Musculoskeletal ultrasonography.," *Orthopedics Clinics of North America*, vol. 29, 1998, pp. 135-167.
- [27] S.J. Sokolov, "Ultrasonics oscillations and their applications," *Technical Physics USSR*, vol. 2, 1935, pp. 1-23.
- [28] L. Kessler, A. Korpel, and P. Palermo, "Simultaneous acoustic and optical microscopy," *Nature*, vol. 239, 1972, pp. 111-112.
- [29] L. Lemons and C.F. Quate, "Acoustic microscopy:scanning version," *Applied Physics Letters*, vol. 24, 1974, pp. 163-165.
- [30] C.J. Pavlin, M.D. Sherar, and F.S. Foster, "Subsurface imaging of the eye by ultrasound biomicroscopy.," *Ophthalmology*, vol. 97, 1990, pp. 244-250.

- [31] G. Lockwood, D. Turnbull, D. Christopher, and F. Foster, "Beyond 30MHz: Applications of High Frequency Ultrasound," *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 1996, pp. 60-71.
- [32] F.S. Foster, P.N. Burns, D.H. Simpson, S.R. Wilson, D.A. Christopher, D.E. Goertz, and M. Imaging, "Ultrasound for the visualization and quantification of tumor microcirculation," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 19, 2000, pp. 131-138.
- [33] D.H. Turnbull, "In utero ultrasound backscatter microscopy of early stage mouse embryos," *Computerized Medical Imaging and Graphics*, vol. 23, 1999, pp. 25-31.
- [34] A. Liu, A.L. Joyner, and D.H. Turnbull, "Alteration of Limb and Brain Patterning in Early Mouse Embryos by Ultrasound Guided Injection of Shh-expressing cells,," *Mechanisms of Development*, vol. 75, 1998, pp. 107-115.
- [35] D.H. Turnbull, T.S. Bloomfield, H.S. Baldwin, F.S. Foster, and A.L. Joyner, "Ultrasound backscatter microscope analysis of early mouse embryonic brain development," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 92, 1995, pp. 2239–2243.
- [36] Y.Q. Zhou, L. Davidson, and R.M. Henkelman, "Ultrasound-Guided Left-Ventricular Catheterization: a Novel Method of Whole Mouse Perfusion for Microimaging," *Laboratory Investigation*, vol. 84, 2004, pp. 385-389.
- [37] R. Witte, D. Dow, R. Olafsson, Y. Shi, and M. O'Donnell, "High resolution ultrasound imaging of skeletal muscle dynamics and effects of fatigue," *IEEE International Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control Joint 50th Anniversary Conference*, Montréal: IEEE Ultrasonics Symposium, 2004, pp. 764-767.
- [38] H. Kim, K. Ryu, D. Shung, and Y. Park, "Correlation between sonographic and pathologic findings in muscle injury: experimental study in the rabbit,," *Journal of Ultrasound in Medicine*, vol. 21, 2002, pp. 1113-1119.
- [39] Y. Kawakami, "The effects of strength training on muscle architecture in humans," *International Journal of Sport and Health Science*, vol. 3, 2005, pp. 208–217.
- [40] A.J. Blazevich, N.D. Gill, N. Deans, and S. Zhou, "Lack of human muscle architectural adaptation after short-term strength training,," *Muscle & nerve*, vol. 35, 2007, pp. 78-86.
- [41] C.N. Maganaris, "A predictive model of moment-angle characteristics in human skeletal muscle: application and validation in muscles across the ankle joint,," *Journal of theoretical biology*, vol. 230, 2004, pp. 89-98.
- [42] S.W. Miller and R.G. Dennis, "A parametric model of muscle moment arm as a function of joint angle: application to the dorsiflexor muscle group in mice," *Journal of Biomechanics*, vol. 29, 1996, pp. 1621-1624.
- [43] J. Friederich and R. Brand, "Muscle fiber architecture in the human lower limb," *Journal of Biomechanics*, vol. 23, 1990, pp. 91-95.

- [44] D.C. Martin, M.K. Medri, R.S. Chow, V. Oxorn, R.N. Leekam, A.M. Agur, and N.H. McKee, "Comparing human skeletal muscle architectural parameters of cadavers with in vivo ultrasonographic measurements.," *Journal of Anatomy*, vol. 199, 2001, pp. 429-34.
- [45] M. Ito, Y. Kawakami, Y. Ichinose, S. Fukashiro, and T. Fukunaga, "Nonisometric behavior of fascicles during isometric contractions of a human muscle," *Journal of Applied Physiology*, vol. 85, 1998, pp. 1230-1235.
- [46] T. Fukunaga, K. Kubo, Y. Kawakami, S. Fukashiro, H. Kanehisa, and C.N. Maganaris, "In vivo behaviour of human muscle tendon during walking.," *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, vol. 268, 2001, pp. 229-33.
- [47] T. Fukunaga, Y. Ichinose, M. Ito, Y. Kawakami, and S. Fukashiro, "Determination of fascicle length and pennation in a contracting human muscle in vivo," *Journal of Applied Physiology*, vol. 82, 1997, pp. 354.
- [48] A. Megliola, F. Eutropi, A. Scorzelli, D. Gambacorta, A. De Marchi, M. De Filippo, C. Faletti, and F.S. Ferrari, "Ultrasound and magnetic resonance imaging in sports-related muscle injuries.," *La Radiologia medica*, vol. 111, 2006, pp. 836-45.
- [49] J. Lee and J. Healy, "Sonography of lower limb muscle injury," *American Journal of Roentgenology*, vol. 182, 2004, pp. 341-351.
- [50] J. Lin, D. Fessell, J.A. Jacobson, W.J. Weadock, and C.W. Hayes, "An Illustrated Tutorial of Musculoskeletal Sonography: Part 1, Introduction and General Principles," *American Journal of Roentgenology*, vol. 175, 2000, pp. 637-645.
- [51] R. Leekam, A. Agur, and N. McKee, "Using sonography to diagnose injury of plantaris muscles and tendons," *American Journal of Roentgenology*, vol. 172, 1999, pp. 185-190.
- [52] B. Hashimoto, D. Kramer, and L. Wiitala, "Applications of musculoskeletal sonography," *Journal of Clinical Ultrasound*, vol. 27, 1999, pp. 293-318.
- [53] P. Popesko, V. Rajtova, and J. Horak, *A Colour Atlas of ANATOMY OF SMALL LABORATORY ANIMALS , VOLUME TWO: RAT, MOUSE, HAMSTER*, Philadelphia: Saunders/Elsevier Ltda, 2002.
- [54] S. Rosager, P. Aagaard, P. Dyhre-Poulsen, K. Neergaard, M. Kjaer, and S.P. Magnusson, "Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners.," *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 12, 2002, pp. 90-8.
- [55] K. Kubo, H. Kanehisa, M. Ito, and T. Fukunaga, "Effects of isometric training on the elasticity of human tendon structures in vivo.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 91, 2001, pp. 26-32.
- [56] S. Kurokawa, T. Fukunaga, and S. Fukashiro, "Behavior of fascicles and tendinous structures of human gastrocnemius during vertical jumping.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 90, 2001, pp. 1349-58.



- [57] G. El-Khoury, E. Brandser, M. Kathol, D. Tearse, and J. Callaghan, "Imaging of muscle injuries," *Skeletal Radiology*, vol. 25, 1996, pp. 3–11.
- [58] S.A. Spector, P.F. Gardiner, R.F. Zernicke, R.R. Roy, and V.R. Edgerton, "Muscle architecture and force velocity of cat soleus and medial gastrocnemius: implications for motor control," *Journal of Neurophysiology*, vol. 44, 1980, pp. 951-960.
- [59] H. van Bavel, M.R. Drost, J.D. Wielders, J.M. Huyghe, A. Huson, and J.D. Janssen, "Strain distribution on rats medial gastrocnemius during passive stretch," *Journal of Biomechanics*, vol. 29, 1996, pp. 1069-1074.
- [60] C.M. Eng, L.H. Smallwood, M.P. Rainiero, M. Lahey, S.R. Ward, and R.L. Lieber, "Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb.," *The Journal of Experimental Biology*, vol. 211, 2008, pp. 2336-45.
- [61] A.J. Blazevich, "Effects of Physical Training and Detraining, Immobilisation, Growth and Aging on Human Fascicle Geometry," *Sports Medicine*, vol. 36, 2006, pp. 1003-1017.
- [62] P. Aagaard, J. Andersen, P. Dyhre-Poulsen, A. Leffers, A. Wagner, and S. Magnusson, "A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture," *Journal of Physiology*, vol. 534, 2001, pp. 613-623.
- [63] J.C. Tabary, C. Tabary, C. Tardieu, G. Tardieu, and G. Goldspink, "Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts," *Journal of Physiology*, vol. 224, 1972, pp. 231-244.
- [64] S. Shah, D. Peters, K. Jordan, D. Milner, J. Fridén, Y. Capetanaki, and R. Lieber, "Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle," *Journal of Experimental Biology*, vol. 204, 2001, pp. 1703.
- [65] P.E. Williams and G. Goldspink, "Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle," *Journal of Anatomy*, vol. 127, 1978, pp. 459-468.
- [66] P.E. Williams, "Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle," *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1990, pp. 316-317.
- [67] R. Lynn, J.A. Talbot, and D.L. Morgan, "Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running," *Journal of Applied Physiology*, vol. 85, 1998, pp. 98-104.
- [68] C. Kasemkijwattana, J. Menetrey, G. Somogyi, M. Moreland, F. Fu, B. Buranapanitkit, S. Watkins, and J. Huard, "Development approaches to improve the healing following muscle contusion," *Cell Transplantation*, vol. 7, 1998, pp. 585-598.
- [69] J. Orchard and T. Best, "The management of muscle strain injuries: an early return versus the risk of recurrence," *Clinical Journal of Sports Medicine*, vol. 12, 2002, pp. 3-5.

- [70] Y. Chan, Y. Li, W. Foster, T. Horaguchi, G. Somogyi, F.H. Fu, and J. Huard, "Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration.," *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 95, 2003, pp. 771-80.
- [71] J. Menetrey, C. Kasemkijwattana, F. Fu, M. Moreland, and J. Huard, "Suturing versus immobilization of a muscle laceration," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 27, 1999, pp. 222-229.
- [72] J.G. Tidball, "Inflammatory processes in muscle injury and repair.," *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 288, 2005, pp. 345-353.
- [73] J. Ehrhardt and J. Morgan, "Regenerative capacity of skeletal muscle," *Current opinion in neurology*, vol. 18, 2005, pp. 548.
- [74] K. Fukushima, N. Badlani, A. Usas, F. Riano, F. Fu, and J. Huard, "The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 29, 2001, pp. 394.
- [75] J.H. Hwang, Y. Ra, K.M. Lee, J.Y. Lee, and S.H. Ghil, "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*, vol. 87, 2006, pp. 20-6.
- [76] Y. Chan, Y. Li, W. Foster, T. Horaguchi, G. Somogyi, F.H. Fu, and J. Huard, "Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration.," *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 95, 2003, pp. 771-80.
- [77] J. Huard, Y. Li, and F.H. Fu, "Muscle Injuries and Repair : Current Trends in Research," *The Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 84, 2002, pp. 822-832.
- [78] J.G. Tidball, "Inflammatory processes in muscle injury and repair.," *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 288, 2005, pp. 345-353.
- [79] B. Chazaud, C. Sonnet, and P. Lafuste, "Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth.," *Journal of Cell Biology*, vol. 163, 2003, pp. 1133-1143.
- [80] S. Grefte, A. Kuijpers-Jagtman, R. Torensma, and J. Von Den Hoff, "Skeletal muscle development and regeneration," *Stem Cells and Development*, vol. 16, 2007, pp. 857-868.
- [81] T. Hurme, H. Kalimo, M. Lehto, and M. Järvinen, "Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study.," *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 23, 1991, pp. 801-810.
- [82] M. Lehto, V.C. Duance, and D. Restall, "Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury," *The Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 67B, 1985, pp. 820-828.
- [83] W.T. Stauber and C.A. Smoth, "Cellular responses in exertion-induced skeletal muscle injury.," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 179, 1998, pp. 189-196.

- [84] M. Järvinen and M.U. Lehto, "The effect of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries.," *Sports Medicine*, vol. 15, 1993, pp. 78-89.
- [85] J. Karnes, "Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats," *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 83, 2002, pp. 1-4.
- [86] C. Markert, M. Merrick, T. Kirby, and S. Devor, "Nonthermal Ultrasound and Exercise in Skeletal Muscle Regeneration," *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 86, 2005, pp. 1304-1310.
- [87] J. Menetrey, C. Kasemkijwattana, C.S. Day, P. Bosch, M. Vogt, F.H. Fu, M.S. Moreland, and J. Huard, "Growth factors improve muscle healing in vivo," *Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 82, 2000, pp. 131-137.
- [88] S. Negishi, Y. Li, A. Usas, F.H. Fu, and J. Huard, "The effect of relaxin treatment on skeletal muscle injuries.," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 33, 2005, pp. 1816-24.
- [89] W.T. Stauber, C.A. Smith, G.R. Miller, and F.D. Stauber, "Recovery from 6 weeks of repeated strain injury to rat soleus muscles.," *Muscle & Nerve*, vol. 23, 2000, pp. 1819-25.
- [90] A. Vignaud, C. Hourdé, S. Torres, J.P. Caruelle, I. Martelly, A. Keller, and A. Ferry, "Functional, cellular and molecular aspects of skeletal muscle recovery after injury induced by snake venom from *Notechis scutatus scutatus*.," *Toxicicon : official journal of the International Society on Toxicology*, vol. 45, 2005, pp. 789-801.
- [91] F. Foster, M. Zhang, Y. Zhou, G. Liu, J. Mehi, E. Cherin, K. Harasiewicz, B. Starkoski, L. Zan, D. Knapik, and others, "A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice," *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 28, 2002, pp. 1165-1172.
- [92] O. Boonyarom and K. Inui, "Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects.," *Acta Physiologica (Oxford, England)*, vol. 188, 2006, pp. 77-89.
- [93] K. Kullmer, K. Sievers, J. Rompe, M. Nagele, and U. Harland, "Sonography and MRI of experimental muscle injuries," *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, vol. 116, 1997, pp. 357-361.
- [94] C. Gans, "Fibre architecture and muscle function.," *Exercise and Sport Sciences Reviews*, vol. 10, 1982, pp. 160-207.
- [95] C. Gans and W.J. Bock, "(1965). The functional significance of muscle architecture: a theoretical analysis," *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, vol. 38, 1965, pp. 115-142.
- [96] Y. Kawakami, T. Abe, K. S-y, and T. Fukunaga, "Training-induced changes in muscle architecture and specific tension," *European Journal of Applied Physiology*, vol. 72, 1995, pp. 37-43.

- [97] M. Narici and P. Cerretelli, "Changes in human muscle architecture in disuse-atrophy evaluated by ultrasound imaging.," *Journal of Gravitational Physiology*, vol. 5, 1998, pp. 73-74.
- [98] J.C. Filho, L.C. Vanderlei, R.C. Camargo, D.A. Oliveira, S.A. Junior, V. Dal Pai, and W.D. Belangero, "Análise histológica, histoquímica e morfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante," *Arquivos da Ciência e Saúde*, vol. 12, 2006, pp. 196-199.
- [99] J.W. Heslinga and P.A. Huijing, "Effects of growth on architecture and functional characteristics of adult rat gastrocnemius muscle," *Journal of Morphology*, vol. 206, 1990, pp. 119-132.