

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE LESÃO MUSCULAR POR ESMAGAMENTO
EM MODELO MURINO**

ÂNGELA ROBERTA CONTE MURARO

Porto Alegre, 2012

**DESENVOLVIMENTO DE LESÃO MUSCULAR POR ESMAGAMENTO
EM MODELO MURINO**

ÂNGELA ROBERTA CONTE MURARO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: João Ellera Gomes

Porto Alegre, 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Muraro, Angela Roberta Conte
DESENVOLVIMENTO DE LESÃO MUSCULAR POR ESMAGAMENTO
EM MODELO MURINO / Angela Roberta Conte Muraro. --
2012.
72 f.

Orientador: João Ellera Gomes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. lesão muscular. 2. esmagamento. 3. processo
inflamatório. I. Gomes, João Ellera, orient. II.
Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe que nunca mediu esforços para me proporcionar uma adequada formação profissional, além de toda sua confiança depositada em mim quanto as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a algumas pessoas que foram importantes na minha trajetória:

- ✓ João Ellera Gomes, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Marcelle Reesik Cerski pela imensa generosidade e acolhida nos momentos de dificuldade.
- ✓ Bruno Antunes pela fundamental colaboração e tempo despendido na realização desta pesquisa.
- ✓ Rodrigo Casales pela sua valiosa contribuição na revisão do estudo.
- ✓ Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA e ao PPG - Ciências Cirúrgicas pela atenção e dedicação durante a realização do mestrado.
- ✓ Aos membros da banca pela disponibilidade de participar desta defesa.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Artigo Científico em Português

Figura 1: Aparelho indutor de lesão: (A) pinça, (B) célula de carga, (C) cunha, (D) pinça com músculo gastrocnêmio posicionado para realização do esmagamento...30

Figura. 2. Atividade total de CK em cada período, pré lesão e após a lesão.....33

Figura 3: Fotomicrografia: HE - (A) Infiltrado inflamatório polimorfonuclear grupo 2 dias lesão (60N) (200x) e em (B) aumento de 400x. (C) Infiltrado inflamatório mononuclear grupo 7 dias lesão (60N) (200x) e em (D) aumento de 400x. Picosírius – (E) Área de deposição do colágeno no grupo 14 dias lesão (60N) e (F) Área de deposição do colágeno no grupo 14 dias lesão (130N – 150N).....36

Figura. 4. Quantificação do colágeno por análise morfométrica localizado no sarcoplasma do músculo gastrocnêmio em cada grupo lesão.37

Tabela 1 – Área do colágeno na fáscia e no sarcoplasma nos grupos lesão 14 dias com lesões em diferentes intensidades.....38

Tabela 2 – Área do colágeno na fáscia e no sarcoplasma nos grupos controle e grupo lesão 14 dias (130-150N).....38

Artigo Científico em Inglês

Figure 1: Lesion inducing apparatus (A) clamp, (B) load cell, (C) wedge (D) clamp with gastrocnemius muscle positioned for crushing.....55

Figure. 2: Total activity of CK in each period, pre lesion and after injury.....58

Figure 3: Photomicrograph: HE - (A) polymorphonuclear inflammatory infiltrate lesion group two days (60N) (200x) and (B) 400x magnification. (C) mononuclear inflammatory infiltrate 7 days lesion group (60N) (200x) and (D) 400x magnification. Picrosirius - (E) Field deposition of collagen in the group 14 days lesion (60N) and (F) Field deposition of collagen in the group 14 days lesion (130N - 150N).....61

Figure 4. Quantification by morphometric analysis of collagen located in the sarcoplasm of the gastrocnemius muscle in each injury group62

Table 1 - Area of collagen on the fascia and sarcoplasm groups injury 14 days with lesions in different intensities.....63

Table 2 - Area of collagen on the fascia and sarcoplasm in the control group and injury 14 days (130-150N).....63

LISTA DE ABREVIATURAS

Creatina Quinase	CK
Fator de Crescimento do Endotélio Vascular	VEGF
Fator de Crescimento Fibroblástico Básico	FGF
Fator de Crescimento de Hepatócitos	HGF
Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1	IGF-1
Fator de Necrose Tumoral Alfa	TNF- α
Hematoxilina e eosina	HE
Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura	UNESCO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
REVISÃO DA LITERATURA.....	12
REFERÊNCIAS	16
OBJETIVOS.....	20
Objetivo geral	20
Objetivos Secundários	20
ARTIGO EM PORTUGUES	21
RESUMO	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODO.....	27
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	39
REFERÊNCIAS	43
ARTIGO EM INGLÊS.....	47
ABSTRACT.....	48
INTRODUCTION	49
MATERIALS AND METHODS	52
RESULTS	58
DISCUSSION.....	64
REFERENCES	68

INTRODUÇÃO

As lesões musculares ocorrem através de uma variedade de mecanismos decorrentes de traumas diretos (esmagamento, lacerações, contusões) ou de traumas indiretos (isquemia por disfunção neurológica e estiramento). As fases do processo inflamatório que ocorrem nas estruturas danificadas são semelhantes entre os diversos tipos de músculos estudados (ZACHAZEWSKI, et al., 1996; JÄRVINEN et al., 2000; SATO et al., 2003; RIZZI et al., 2006), mas a recuperação funcional do músculo lesado varia de um tipo para outro. O processo inflamatório pode ser dividido basicamente em três fases: (1) a fase degenerativa, caracterizada por formação de hematoma, necrose de miofibrilas e infiltrado celular polimorfonuclear; (2) a fase de reparo, consiste em fagocitose do tecido necrosado, infiltrado celular mononuclear, regeneração de miofibrilas, produção de tecido conectivo e crescimento de capilares (tecido de granulação); (3) a fase de remodelação, que consiste da maturação das miofibrilas regeneradas, contração e reorganização do tecido cicatricial, e restauração da capacidade funcional (JÄRVINEN et al., 2000; TURNER; BADYLAK, 2011).

Uma complexa união de fatores de crescimento com proteínas extracelulares regem o microambiente da lesão, estimulando e coordenando a reparação musculoesquelética. Esses fatores são secretados principalmente pelas células imunes ativas e pelas próprias células do tecido muscular esquelético. Células endoteliais vasculares, neurônios e células progenitoras também participam neste processo (HAWKE; GARRY 2001; CANTINI et al., 2002). A sequência da liberação dos fatores de crescimento parece ser importante para o controle da reparação muscular. Os principais fatores de crescimento incluem: fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento fibroblástico básico (FGF), fator de

crescimento semelhante à insulina 1 (insulina/IGF-1), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaqueta -AAe-BB. O IGF-1, essencial para crescimento muscular e proliferação de mioblastos e o HGF, regulador primário de proliferação de células satélites, parecem ser os mais relevantes na regulação e reparação do tecido muscular. A interação destes fatores é complexa e as suas funções ainda não estão totalmente caracterizadas (TURNER; BADYLAK, 2011).

Durante o processo de reparo da lesão muscular, podem ocorrer proliferação e ativação excessiva de colágeno com formação de uma cicatriz hipertrófica acarretando uma recuperação funcional incompleta (LEHTO et al., 1985; KASEMKIJWATTANA et al., 1998; MÉNÉTREY et al., 1999; LI et al., 2004; GHALY; MARSH, 2010; BAPTISTA et al., 2011). O uso de algumas modalidades terapêuticas, como as de células-tronco, é uma estratégia para melhorar a regeneração muscular. Porém, os seus efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos (MU et al., 2011). Uma modalidade terapêutica eficiente deve apresentar uma aceleração na recuperação de cada uma das fases do processo inflamatório, de modo que, no final resulte na formação de uma cicatriz adequada e funcional (RIZZI et al., 2006).

Os modelos experimentais de lesão muscular são ferramentas úteis para investigar os mecanismos relacionados à regeneração muscular. A literatura nos apresenta diversos modelos de lesão muscular em animais utilizando variados métodos, produzindo danos em diversos graus e conseqüentemente, processos regenerativos diferentes. Estudos têm utilizado modelos de lesão que incluem aplicação direta de anestésicos (SAITO; NONAKA, 1994) ou miotoxinas no músculo (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004); oclusão de vasos sanguíneos (ULLMAN et al., 1990);

exercício exaustivo (VIHKO et al., 1979); laceração (MENETREY et al., 1999); contusão (KASEMKIJWATTANA et al., 2008; MC BRIER et al., 2009); estiramento (NIKOLAU et al., 1987; JÄRVINEN et al., 2000) e esmagamento do músculo (RUSHTON et al., 1997, 2003; BUNN et al., 2004) entre outros modelos. O modelo escolhido deve ser bem descrito e reproduzir os processos básicos que ocorrem em traumatismos musculares, sobretudo em relação ao dano tecidual e à resposta inflamatória.

Optamos por uma via direta de esmagamento uma vez que nos traumas indiretos não sabemos o momento, o local e a extensão exata da lesão. O modelo de lesão por contusão também não parece adequado devido à lesão abranger a pele acima do músculo lesado de maneira extensa. Desta forma, a lesão não apresentando um padrão constante, impossibilita a comparação e o estudo com diferentes terapias utilizadas.

O modelo por esmagamento muscular, descrito neste estudo tem se mostrado confiável para induzir uma lesão no músculo esquelético. Há uma variedade de equipamentos, força aplicada, tipo de músculos e linhagens de animais eleitos nos estudos. Diversos instrumentos são utilizados para promover a lesão, os mais comuns são pinça e fórceps, normalmente conectados a algum dispositivo para mensurar a força aplicada (BUNN et al., 2004). Utilizamos pinça de compressão acoplada a uma célula de carga para produzir a lesão, o que permite aplicar grande pressão exclusivamente sobre o músculo.

Com o objetivo de garantir que o modelo de lesão desenvolvido em nosso estudo possa ser utilizado em pesquisas posteriores com células-tronco ou em outras terapias, descrevemos cuidadosamente o dano tecidual provocado, as diferentes fases da resposta inflamatória, resposta inflamatória sérica e

quantificamos a área ocupada por tecido fibroso em diferentes momentos após a lesão.

REVISÃO DA LITERATURA

Os processos que ocorrem no músculo lesionado (necrose/degeneração, inflamação, reparo, e formação de tecido cicatricial) estão todos interligados e são tempo-dependente (KASEMKIJWATTANA et al., 1998; HUARD et al., 2002). Basicamente, os processos são divididos em três fases:

A fase degenerativa é caracterizada pela ruptura de músculo quando algum tipo de força excessiva provoca uma lesão do músculo esquelético, rompendo o sarcoplasma e provocando a necrose de miofibras. O rompimento da fibra muscular é refletido pelo aumento dos níveis séricos de proteínas musculares, tais como a creatina quinase (CK), que são normalmente restritas ao citosol da fibra muscular. Em humanos e modelos animais, o aumento sérico da CK é observado pós estresse mecânico (por exemplo, exercícios físicos extenuantes, lesões mecânicas externas) e em doenças músculo esqueléticas degenerativas (por exemplo, distrofia muscular) (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; BRANCACCIO et al., 2007; SARI et al., 2008). Simultaneamente, células inflamatórias acessam o sítio da lesão em decorrência aos vasos sanguíneos lesados. A resposta inflamatória é amplificada pela liberação hormonal das células satélites e miofibrilas necrosadas e pelos macrófagos fibroblastos ativados no local da lesão que produzem sinais quimiotáticos (fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e outros) que atraem células inflamatórias circulantes (JÄRVINEN et al., 2005). No que diz respeito aos fatores de crescimento e citocinas, há evidências de que o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tem um papel fisiológico na regeneração da lesão no músculo esquelético, bem como a inibição da sua atividade poderá resultar num ligeiro déficit na força do músculo em recuperação. Além disso, um grande número de factores de crescimento e citocinas são expressos na lesão músculo esquelética, tais como, fator de crescimento de

hepatócitos (HGF), fator de crescimento fibroblástico básico (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (insulina/IGF-1), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e factor de crescimento derivado de plaqueta -AAe-BB. O IGF-1, essencial para crescimento muscular e proliferação de mioblastos e o HGF, regulador primário de proliferação de células satélites, parecem ser os mais relevantes na regulação e reparação do tecido muscular (JÄRVINEN et al., 2005; BORCELLIA et al., 2009; TURNER; BADYLAK, 2011). Na fase mais aguda após uma lesão musculo esquelética, os leucócitos polimorfonucleares são as células mais abundantes no local da lesão, posteriormente substituídos por monócitos, que são transformados em macrófagos ativamente engajados na proteólise e fagocitose do material (JÄRVINEN et al., 2000; JÄRVINEN et al., 2005)

Alguns dias após a lesão iniciam as fases de reparo e remodelamento que ocorrem concomitantemente uma vez que a fase degenerativa tenha diminuído. Nestas fases, ocorrem os processos de regeneração de fibras musculares lesadas e a formação de uma cicatriz do tecido fibroso que são um pré-requisito para ideal de recuperação da função contrátil do músculo (JÄRVINEN et al., 2000; JÄRVINEN et al., 2005).

A capacidade regenerativa das miofibrilas é garantida pelas células satélite encontradas sob a lâmina basal de cada fibra muscular. Em resposta ao trauma, as células satélites são ativadas, proliferam e diferenciam-se em fibroblastos que se fundem a fibras musculares remanescentes da lesão ou se fundem a células satélites vizinhas para gerar novas fibras musculares (LEFAUCHER; SÉBILLE, 1995; JÄRVINEN et al., 2000; JÄRVINEN et al., 2005; CICILIOT, SCHIAFFINO, 2010).

Os fibroblastos se proliferam no tecido danificado e começam a produzir uma matriz extracelular rica em colágeno que se dá pela proliferação dos fibroblastos para restaurar a estrutura do tecido conjuntivo (LEHTO et al 1985; MÉNÉTREY et al., 1999; LI; HUARD, 2002). A proliferação excessiva e a ativação de fibroblastos pode conduzir a fibrose e extensa formação de tecido de cicatriz densa, o que pode obstruir o músculo no processo regenerativo e resultar em recuperação incompleta. (LEHTO et al., 1985; KASEMKIJWATTANA et al 1998;. MÉNÉTREYET et al., 1999).

Embora as fases degenerativa e regenerativa sejam semelhantes entre os diferentes tipos de músculo lesados, a amplitude e a cinética de cada fase podem variar dependendo da extensão da lesão, do músculo lesado ou do modelo animal escolhido. Para estudar o processo inflamatório no tecido muscular em um ambiente controlado e de forma reprodutível foi necessário desenvolver modelos animais de lesão muscular (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004).

A literatura nos oferece uma série de modelos experimentais, baseados principalmente nos mecanismos de lesão muscular direto e ou indireto. O primeiro pode ser decorrente de contusão, laceração e tensões; enquanto que o segundo, por um alongamento das fibras musculares além da sua capacidade fisiológica, quer por uma contração excêntrica ou concêntrica bruscas, ou ainda, devido à isquemia e disfunção neurológica. As lesões musculares mais comuns ocorrem por contusão ou por estiramento muscular (ZACHAZEWSKI, et al., 1996; JARVINEN et al., 2000).

O modelo de contusão por impacto, de peso com ponta romba, é utilizado por vários estudos (LEHTO, et al., 1985; CRISCO et al., 1994; KASEMKIJWATTANA et al., 1998; MCBRIER et al., 2009; GHALY; MARSH et al., 2010; SHU et al., 2012). O mecanismo desta lesão é baseado na queda de um objeto de ponta romba a uma

altura pré-definida, o impacto gerado provoca a lesão do músculo desejado juntamente com a pele, pois se trata de modelo não invasivo (CRISCO et al., 1994).

Os estudos experimentais de lesão por estiramento para músculo esquelético apresentam métodos invasivo (NIKOLAOU et al., 1987) e não invasivo, através de movimentos, para estabelecer a lesão miotendínea ou próxima a mesma. O modelo de estiramento invasivo não tem demonstrado ser reproduzível e a lesão produzida quantificável (TOUMI et al., 2006).

O modelo de lesão muscular por esmagamento tem sido descrito como uma lesão reproduzível e de realização fácil (JARVINEN; SORVARI, 1975; BUNN et al., 2004). Férceps arteriais e outros materiais semelhantes a pinças são utilizados para esmagar o músculo de forma segmentar (SCHMALBRUCH, 1976) ou completamente (FINK et al., 2003), O método com uso de férceps para esmagamento têm sido utilizado para observar os efeitos de trauma na células satélites (SCHULTZ et al., 1985), a expressão de células do músculo esquelético precursores (GROUNDS et al., 1992), e para comparar a regeneração ferimentos de diferentes gravidades seguintes (MCGEACHIE; GROUNDS, 1987). A aparência e ação inflamatória no local da lesão também foram investigadas (ROBERTSON et al., 1993; RUSHTON et al., 1997, WINKLER et al., 2011). Porém, o desenvolvimento de fibrose intramuscular ao longo do tempo após trauma por esmagamento não tem sido quantitativamente descrito (WINKLER et al., 2011).

REFERÊNCIAS

BAPTISTA, J.; MARTINS, M. D.; PAVESI, V. C. S.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S. PINTO, D. S.; FERRARI, R. A. M. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.29, n.1, p.11-7, 2011.

BORSELLIA, C.; STORRIEA, H.; BENESCH-LEEC, F.; SHVARTSMANA, D.; CEZARA, C.; LICHTMANE, J. W.; VANDENBURGH, H. H.; MOONEY, D. J.; Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. **PNAS**, Dez.4, 2009.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, M.; LIMONGELLI, F. M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **British Medical Bulletin**, v.81 e 82, p.209–230, 2007.

BUNN, J. R.; CANNING, J.; BURKE, G.; MUSHIPE, M.; MARSH, D. R.; LI, G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle-A biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. **Journal of Orthopaedic Research**, v.22, p.1336-44, 2004.

CANTINI, M.; GIURISATO, E.; RADU, C.; TIOZZO, S.; PAMPINELLA, F., SENIGAGLIA, D.; ZANIOLO, G.; MAZZOLENI, F.; VITIELLO, L. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. **Journal of the Neurological Sciences**, v.23, p.189–94, 2002.

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiological Reviews**, v.84, p.209–38, 2004.

CICILIOT, S.; SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. **Current Pharmaceutical Design**, v.16, p.906-14, 2010.

CRISCO, J. J.; JOKL, P.; HEINEN, G. T.; CONNELL, M. D.; PANJABI, M. M. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. **American Journal of Sports Medicine**, v.22, n.5, p.702-10, Set-Out. 1994.

FINK, E.; FORTIN, D.; SERRURIER, B.; VENTURA-CLAPIER, R.; BIGARD, A. X. Recovery of contractile and metabolic phenotypes in regenerating slow muscle after notexin-induced or crush injury. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**; v.24 n.7, p.421-9, 2003.

GHALY, A.; MARSH, D. R. Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. **International. Journal Experimental. Pathology**, v.91, p.244–55, 2010.

GROUNDS, M. D.; GARRETT, K. L.; L. A. I, M. C.; WRIGHT, W. E.; BEILHARZ, M. W. Identification of skeletal muscle cells in vivo by use of MYOD1 and myogenin probes. **Cell and Tissue Research**, v.267, p. 99-104, 1992.

KASEMKIJWATTANA, C.; MENETREY, J.; SOMOGYI, G.; MORELAND, M. S.; FU, F. H.; BURANAPANITKIT, B.; WATKINS, S.C.; HUARD, J. Desevelopment of approaches to improve the healing following muscle contusion. **Cell Transplantation**, v.7, n.6, p.585-98, 1998.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, v.91, p.534–55, 2001.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F. H. Muscle injuries and repair: Current trends in research. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.84, p.822–32, 2002.

JÄRVINEN, M.; SORVARI, T. Healing of a crush injury in rat striated muscle. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**. v.83, n.2, p.259-65, Mar. 1975.

JÄRVINEN, T. A., H.; KÄÄRIÄINEN, M.; JÄRVINEN, M.; KALIMO, H. Muscle strain injuries. **Current Opinion in Rheumatology**, v.12, p.155–161, 2000.

JÄRVINEN, T. A., H.; JÄRVINEN, T.; KÄÄRIÄINEN, M KALIMO, H. JÄRVINEN, M Muscle Injuries: Biology and Treatment. **American Journal of Sports Medicine**, v.33, p.745–64, 2005.

LEFAUCHEUR, J. P.; SEBILLE, A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. **Neuromuscular Disorders**, v.5. n.6. p.501-09, 1995.

LEHTO, M.; DUACE, V. C.; RESTALL, D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. **The Journal of Bone and Surgery**, 1985.

LI, Y.; HUARD, J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. **American Journal of Pathology**, n.161, v.3, p.895-907, Set. 2002.

LI, Y.; FOSTER, W.; DEASY, B. M.; CHAN, Y.; PRISK, V.; TANG, Y.; Cummins, J.; Huard, J. Transforming Growth Factor-1 Induces the Differentiation of Myogenic Cells into Fibrotic Cells in Injured Skeletal Muscle. **American Journal of Pathology**, v.164, n.3, p.1007-19, Mar. 2004.

MCBRIER, N. M.; NEUBERGER, T.; OKITA,N.; WEBB, A.; SHARKEY, N. Reliability and validity of a novel muscle contusion device. **Journal of Athletic Training**, v.44, n.3, p.275–78, 2009.

MCGEACHIE, J. K.; GROUNDS, M. D. Initiation and duration of muscle precursor replication after mild and severe injury to skeletal muscle of mice. An autoradiographic study. **Cell and Tissue Research**, v. 248, p.125-30, 1987.

MENETREY, J.; KASEMKIJWATTANA, C.; FU, F. H.; MORELAND, M. S.; HUARD, J. Suturing Versus Immobilization of a Muscle Laceration A Morphological and Functional Study in a Mouse Model. **The American Journal of Sports Medicine**, v.27, n.2, p.222-29 1999.

MU, X.; Xiang, G.; Rathbone, C. R.; Pan, H.; Bellayr, I. H.; Walters, T. J.; Li, Y. Slow-Adhering Stem Cells Derived from Injured Skeletal Muscle Have Improved Regenerative Capacity. **The American Journal of Pathology**, v.179, n.2, p.931-41, Ago. 2011.

NYKOLAOU, P. K.; MACDONALD, B. L.; GLISSON, R. R.; SEABER, A.V.; GARRET, W. E. Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury. **American Journal of Sports Medicine**, v.15, n.1, 1987.

RIZZI, C. F.; MAURIZ, J. L.; CORREA, D. S. F.; MOREIRA, A. J.; ZETTLER, C. J.; FILIPPIN, L. I.; MARRONI, N. P.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- κ b signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.38, p.704–13, 2006.

ROBERTSON, T. A.; MALEY, M. A.; GROUNDS, M. D. PAPADIMITRIOU, J. M. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. **Experimental Cell Research**, v.207, p.321-33, 1993.

RUSHTON, J.L.; DAVIES, I.; HORAN, M. A.; MAHON, M.; WILLIAMS, R. Production of consistent crush lesions of murine skeletal muscle in vivo using an electromechanical device. **Journal of Anatomy**, v.190, p.417-22, 1997.

SAITO, Y.; NONAKA, I. Initiation of satellite cell replication in bupivacaine-induced myonecrosis. **Acta Neuropathol**; v.88, n.3, p.252-7, 1994

SARI, Y.; NAKAGAMI, G.; KINOSHITA, A.; HUANG, L.; UEDA, K.; IIZAKA, S.; SANADA, H SUGAMA, J. Changes in serum and exudates creatine phosphokinase concentrations as an indicator of deep tissue injury: a pilot study. **International Wound Journal**, v.5, p.674–80, 2008.

SATO, K.; LI, Y.; FOSTER, W.; FUKUSHIMA, K.; BADLANI, N.; ADACHI, N.; USAS, V.; FU, F. H.; HUARD, J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. **Muscle Nerve**, v.28, p. 365–372, 2003.

SCHMALBRUCH H. The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. **Tissue Cell**; v.8, n. 4, p. 673-92, 1976.

SCHULTZ, E.; JARYSZAK, D. L.; VALLIERE, C. R. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. **Muscle and Nerve**, n.8, p.217–22, 1985.

SHU, B.; YANG, Z.; LI, X.; ZHANG, L. Effect of Different Intensity Pulsed Ultrasound on the Restoration of Rat Skeletal Muscle Contusion. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v.62, p.329–36, 2012.

TOUMI, H.; F'GUYER, S.; BEST, T. M. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. **Journal of Anatomy**, v.208, p.459–70, 2006.

TURNER, N. J.; BADYLAK, S. F. Regeneration of skeletal muscle. **Cell and Tissue Research**, Jun. 2011.

ULLMAN, M.; ULLMAN, A.; SOMMERLAND, H.; SKOTTNER, A.; OLDFORS, A. Effects of growth hormone on muscle regeneration and IGF-I concentration in old rats. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.140, p.521-25, 1990.

VIHKO, V.; SALMINEN, A.; RANTAMÄKI, J. Exhaustive exercise, endurance training, and acid hydrolase activity in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.47, p.43-50, 1979.

WINKLER, T.; VON ROTH, P.; MATZIOLIS, G.; SCHUMANN, M. R.; HAHN, S.; STRUBE, P.; STOLTENBURG-DIDINGER, G.; PERKA, C.; DUDA, G. N.; TOHTZ, S. V. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma. **Acta Orthopaedica**, v.82, n.1, p.102–111, 2011.

ZACHAZEWSKI, J. E.; MAGEE, D. E., QUILLEN, W. S. **Athletic Injuries and Rehabilitation**. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1996.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver e avaliar um modelo murino de lesão muscular por esmagamento no músculo gastrocnêmio.

Objetivos Secundários

- (1) avaliar os resultados de creatina quinase (CK) nos períodos pré-lesão (3 horas) e após (3 horas, 24 horas, 2, 7, 14 e 21 dias, 14 dias) a lesão aplicada com a força de 60N.
- (2) descrever as variáveis histopatológicas (processo inflamatório) em todos os grupos 3 horas, 2, 7, 14 e 21 dias pós-lesão aplicada com a força de 60N, grupo 14 dias pós-lesão aplicada com a força variando entre 130-150N, grupos sham e grupo controle.
- (3) comparar área de colágeno no músculo (região da fáscia e sarcoplasma) dos grupos 3 horas, 2, 7, 14 e 21 dias pós-lesão aplicada com a força de 60N.
- (4) comparar área de colágeno no músculo (região da fáscia e sarcoplasma) dos grupos sham
- (5) comparar área de colágeno no músculo (região da fáscia e sarcoplasma) do grupo lesão 14 dias pós-lesão aplicada com a força de 60N com o grupo lesão 14 dias pós-lesão aplicada com a força variando entre 130-150N.
- (6) comparar área de colágeno no músculo (região da fáscia e sarcoplasma) do grupo controle com o grupo lesão 14 dias pós-lesão aplicada com a força variando entre 130-150N.

ARTIGO EM PORTUGUES

DESENVOLVIMENTO DE UMA LESÃO MUSCULAR POR ESMAGAMENTO EM MODELO MURINO

Ângela Roberta Conte Muraro¹; João Luiz Ellera Gomes^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - RS; ² Serviço de Traumatologia e Ortopedia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre), Porto Alegre – RS, Brasil.

Correspondência: Ângela Roberta Conte Muraro, Rua Ramiro Barcellos 2400, 2º andar, PPG Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS, Brasil, Fone: 555199992652, e-mail: angelamuraro@hotmail.com

Fonte de financiamento: Este estudo foi financiado pela FIPE - HCPA

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflitos de interesse

RESUMO

Introdução: Os modelos experimentais de lesão muscular são ferramentas úteis para investigar os mecanismos relacionados à regeneração muscular. O modelo escolhido deve ser bem descrito e reproduzir os processos básicos que ocorrem em traumatismos musculares em relação ao dano tecidual e à resposta inflamatória.

Objetivo: Desenvolver um modelo murino de lesão muscular por esmagamento no músculo gastrocnêmio e avaliar as diferentes fases da resposta inflamatória tecidual, sérica e quantificar a área de colágeno pré-lesão e em diferentes momentos pós-lesão.

Métodos: Comparamos a atividade de Creatina Quinase (CK) em diferentes períodos de tempo. A avaliação histopatológica para caracterização do processo inflamatório foi realizada e descrita para todos os grupos. A quantificação da área de colágeno na fáscia e no sarcoplasma foi realizada em todos os grupos.

Resultados: Os níveis de CK aumentaram no período pós-lesão em comparação aos níveis pré-lesão. As variáveis histopatológicas evidenciaram caracterização adequada das fases do processo inflamatório. A área do colágeno depositado no sarcoplasma no grupo 7 dias lesão foi maior comparado aos grupos 3 horas e 2 dias. O grupo que sofreu a lesão com maior força apresentou maior área de colágeno comparado ao grupo que sofreu a lesão com menor força e ao grupo controle.

Conclusão: o modelo descrito em nosso estudo será importante para o progresso de novos estudos em abordagens terapêuticas, e também para caracterizar a cinética do processo inflamatório em tecido muscular esquelético.

Palavras-chave: lesão muscular, esmagamento; creatina quinase; processo inflamatório, colágeno

INTRODUÇÃO

As lesões musculares ocorrem através de uma variedade de mecanismos decorrentes de traumas diretos (esmagamento, lacerações, contusões) ou de traumas indiretos (isquemia por disfunção neurológica e estiramento). As fases do processo inflamatório que ocorrem nas estruturas danificadas são semelhantes entre os diversos tipos de músculos estudados (ZACHAZEWSKI, et al., 1996; JÄRVINEN et al., 2000; SATO et al., 2003; RIZZI et al., 2006), mas a recuperação funcional do músculo lesado varia de um tipo para outro. O processo inflamatório pode ser dividido basicamente em três fases: (1) a fase degenerativa, caracterizada por formação de hematoma, necrose de miofibrilas e infiltrado celular polimorfonuclear; (2) a fase de reparo, consiste em fagocitose do tecido necrosado, infiltrado celular mononuclear, regeneração de miofibrilas, produção de tecido conectivo e crescimento de capilares (tecido de granulação); (3) a fase de remodelação, que consiste da maturação das miofibrilas regeneradas, contração e reorganização do tecido cicatricial, e restauração da capacidade funcional (JÄRVINEN et al., 2000; TURNER; BADYLAK, 2011).

Uma complexa união de fatores de crescimento com proteínas extracelulares regem o microambiente da lesão, estimulando e coordenando a reparação musculoesquelética. Esses fatores são secretados principalmente pelas células imunes ativas e pelas próprias células do tecido muscular esquelético. Células endoteliais vasculares, neurônios e células progenitoras também participam neste processo (HAWKE; GARRY 2001; CANTINI et al., 2002). A sequência da liberação dos fatores de crescimento parece ser importante para o controle da reparação muscular. Os principais fatores de crescimento incluem: fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento fibroblástico básico (FGF), fator de

crescimento semelhante à insulina 1 (insulina/IGF-1), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaqueta -AAe-BB. O IGF-1, essencial para crescimento muscular e proliferação de mioblastos e o HGF, regulador primário de proliferação de células satélites, parecem ser os mais relevantes na regulação e reparação do tecido muscular. A interação destes fatores é complexa e as suas funções ainda não estão totalmente caracterizadas (TURNER; BADYLAK, 2011).

Durante o processo de reparo da lesão muscular, podem ocorrer proliferação e ativação excessiva de colágeno com formação de uma cicatriz hipertrófica acarretando uma recuperação funcional incompleta (LEHTO et al., 1985; KASEMKIJWATTANA et al., 1998; MÉNÉTREY et al., 1999; LI et al., 2004; GHALY, MARSH, 2010; BAPTISTA et al., 2011). O uso de algumas modalidades terapêuticas, como as de células-tronco, é uma estratégia para melhorar a regeneração muscular. Porém, os seus efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos (MU et al., 2011). Uma modalidade terapêutica eficiente deve apresentar uma aceleração na recuperação de cada uma das fases do processo inflamatório, de modo que, no final resulte na formação de uma cicatriz adequada e funcional (RIZZI et al., 2006).

Os modelos experimentais de lesão muscular são ferramentas úteis para investigar os mecanismos relacionados à regeneração muscular. A literatura nos apresenta diversos modelos de lesão muscular em animais utilizando variados métodos, produzindo danos em diversos graus e conseqüentemente, processos regenerativos diferentes. Estudos têm utilizado modelos de lesão que incluem aplicação direta de anestésicos (SAITO; NONAKA, 1994) ou miotoxinas no músculo (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004); oclusão de vasos sanguíneos (ULLMAN et al., 1990);

exercício exaustivo (VIHKO et al., 1979); laceração (MENETREY et al., 1999); contusão (KASEMKIJWATTANA et al., 2008; MC BRIER et al., 2009); estiramento (NIKOLAU et al., 1987; JÄRVINEN et al., 2000) e esmagamento do músculo (RUSHTON et al., 1997; UTVAG et al., 2003; BUNN et al., 2004) entre outros modelos. O modelo escolhido deve ser bem descrito e mimetizar a situação clínica da melhor maneira possível. Deve também reproduzir os processos básicos que ocorrem em traumatismos musculares, sobretudo em relação ao dano tecidual e à resposta inflamatória.

Optamos por uma via direta de esmagamento uma vez que nos traumas indiretos não sabemos o momento, o local e a extensão exata da lesão. Desta forma, a lesão não apresentando um padrão constante, impossibilita a comparação e o estudo com diferentes terapias utilizadas.

O modelo por esmagamento muscular, descrito neste estudo tem se mostrado confiável para induzir uma lesão no músculo esquelético. Há uma variedade de equipamentos, força aplicada, tipo de músculos e linhagens de animais eleitos nos estudos. Diversos instrumentos são utilizados para promover a lesão, os mais comuns são pinça e fórceps, normalmente conectados a algum dispositivo para mensurar a força aplicada (BUNN et al., 2004). Utilizamos pinça de compressão acoplada a uma célula de carga para produzir a lesão, o que permite aplicar grande pressão exclusivamente sobre o músculo.

Com o objetivo de garantir que o modelo de lesão desenvolvido em nosso estudo possa ser utilizado em pesquisas posteriores com células-tronco ou em outras terapias, descrevemos cuidadosamente o dano tecidual provocado, as diferentes fases da resposta inflamatória, resposta inflamatória sérica e

quantificamos a área ocupada por tecido fibroso em diferentes momentos após a lesão.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo caracteriza-se por ser quantitativo descritivo, e tem delineamento experimental. A confecção do aparelho indutor da lesão e os procedimentos do estudo foram realizados, em unidades do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e receberam a aprovação da Comissão de Pesquisa em Ética e Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (nº 110444).

Animais

Foram utilizados 75 *Rattus Norvegicus* machos, linhagem *Wistar*, com massa corporal inicial entre 230 e 350g e 12 semanas de vida. Os animais foram alocados em 4 ou 5 por caixa moradia com água e ração *ad libitum*, permanecendo em ciclo claro/escuro de 12 horas à temperatura de 22°C até o dia da eutanásia. Todos os procedimentos *in vivo* foram embasados no *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* - ILAR/EUA (1996). Os experimentos obedeceram às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO-27/01/1978).

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa PEPI (Programs for Epidemiologists) considerando 1,32% de colágeno no grupo lesão 4 dias e no grupo lesão 14 dias de 3,51% (PIE DADE et al., 2008), com 10 animais em cada grupo podemos identificar diferenças de 3,7% como estatisticamente significativas, considerando $\alpha = 0,05$ em um poder de 80%.

Aparelho indutor de lesão

O aparelho é composto de uma pinça (relação 2:1) (Figura 1 – A) acoplada a uma célula de carga (MiniBeam A20 Alfa Instrumentos, São Paulo, Brasil) (Figura 1 – B), que permite aplicar esforços de compressão de 0 a 400 N pelo sistema de alavancas. O comprimento da lesão é fixo, e foi definido em 6mm. O controle da força de compressão é exercido manualmente, através de uma cunha deslizante (Figura 1 - C). O músculo, ao ser comprimido perpendicularmente ao comprimento de suas fibras, estende-se ao longo de uma pastilha de contato medindo 6 x 16mm. Um circuito condicionador excita a ponte resistiva (*strain-gauge*) da célula de carga e conforma o sinal elétrico resultante - proporcional à força aplicada - à entrada analógica do microcontrolador PIC16F88. O PIC efetua a conversão analógico-digital do sinal, em 10 bits, com taxa de 50Hz, e transmite os dados serialmente, através de um cabo RS232-USB, a um computador portátil, onde são monitorados em tempo real. O software de visualização gráfica foi desenvolvido para ambientes Windows®. A tela do computador exibe numérica e graficamente os dados (relação entre Força x Tempo) em tempo real e permite salvá-los em arquivos.

Indução da lesão

Os animais foram randomicamente distribuídos em doze grupos (seis grupos lesão, cinco grupos sham e um grupo controle).

Grupos lesão 60N: receberam eutanásia 3 horas (n=10), 2 dias (n=10), 7 dias (n=10), 14 dias (n=10) e 21 (n=10) dias pós-esmagamento muscular com força de 60 N aplicada durante o procedimento de lesão.

Grupo lesão 130-150N (n=10): receberam eutanásia 14 dias pós-esmagamento muscular com força variando entre 130 e 150 N aplicada durante o procedimento de lesão.

Grupos SHAM: receberam eutanásia 3 horas (n=3), 2 dias (n=3), 7 dias (n=3), 14 dias (n=3) e 21 (n=3) dias após serem submetidos ao procedimento cirúrgico padrão, incluindo posicionamento na aparelho indutor de lesão, porém sem receber esmagamento.

Grupo controle (n=10): foi composto pelo membro inferior contralateral ao da lesão do Grupo lesão 130N-150N.

Os animais foram anestesiados por via inalatória com isoflurano (5%) e receberam analgesia por injeção intramuscular de tramadol (5mg/Kg), após, a região da incisão foi tricotomizada. Em decúbito ventral e sob anestesia geral, a incisão longitudinal na pele da face posterior do segmento distal do membro inferior direito – região proximal ao joelho estendendo-se até o calcâneo - foi realizada para exposição e isolamento do complexo gastrocnêmico. O rato foi posicionado de maneira que a pinça comprimisse o terço médio da porção medial do gastrocnêmio (Figura 1 – D). A pinça foi fechada progressivamente até exercer uma força de 60N ou 130-150N, conforme o grupo, por 10 segundos através do deslocamento da cunha. A força e tempo empregados foram definidos por estudo piloto prévio.

O animal foi retirado do aparelho lesionador e a pele suturada com dois pontos em U. A recuperação ocorreu com um animal em cada caixa. Em seguida, o animal foi levado à sua caixa original novamente, onde permaneceu até o dia da eutanásia. Ao completar 3 horas, 2, 7, 14 ou 21 dias após a realização da lesão (conforme o grupo pertencente), os ratos foram mortos por decapitação em guilhotina.

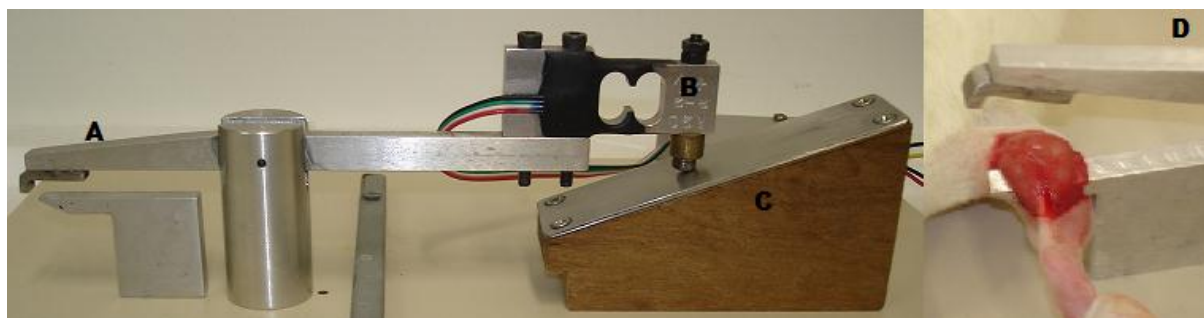


Figura 1: Aparelho indutor de lesão: (A) pinça, (B) célula de carga, (C) cunha, (D) pinça com músculo gastrocnêmio posicionado para realização do esmagamento.

Análise da atividade de creatina quinase

A atividade total de creatina quinase (CK) (U/l) foi medida espectrofotometricamente em amostras de soro (500 μ L) utilizando kit de diagnóstico (CK-NAC, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, USA). As amostras foram coletadas previamente ao procedimento da lesão (pré-lesão), 3h, 24h, 48h após a lesão nos animais que sofreram lesão com força de 60N e os grupos sham. Os animais foram anestesiados com inalação de gás isoflurano (5%) e o sangue coletado do plexo retro-orbital

Histopatologia

O músculo gastrocnêmio foi retirado e o fragmento contendo a lesão (terço médio do músculo) de cada animal foi fixado, sem alongar, em formol tamponado a 10% durante 24h e posteriormente, incluídos em parafina. As três secções de cada amostra foram cortadas em séries de 4 μ m de espessura para serem coradas com hematoxilina e eosina (HE) e picrossírus.

A coloração HE foi utilizada como abordagem para descrever o processo inflamatório do músculo gastrocnêmio após a lesão por esmagamento. Os

espécimes foram estudados no período de 3 horas, 2, 7, 14 e 21 dias após a efetuação da lesão. A avaliação e escolha das variáveis foram realizadas por um patologista experiente em patologia muscular. Cada variável foi analisada e classificada em escores referentes à sua quantidade: (0) ausente, (1) discreta, (2) acentuada. As seguintes variáveis foram analisadas na fáscia: edema, congestão, infiltrado polimorfonuclear, fibrina, necrose celular, infiltrado mono nuclear, tecido de granulação e fibrose. No sarcoplasma, as variáveis analisadas foram: edema, congestão, focos hemorrágicos, infiltrado polimorfonuclear, fibrina, necrose celular, infiltrado mono nuclear, tecido de granulação, fibrose, degeneração de Zenker, *ghost cells* (fibras fantasmas), rarefações sarcoplasmáticas, atrofia muscular multifocal.

Análise morfométrica da imagem

Nas lâminas coradas por picosírius, foram selecionados três campos no corte contendo maior quantidade de colágeno. A captura digital foi efetuada através de uma câmera fotográfica digital (QColor 5, Olympus American Inc, CA), acoplada a um microscópio óptico (BX 51, Olympus American Inc, CA). Todas as imagens foram digitalizadas através do software Q Capture Pro 5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) com objetiva de 40x e armazenadas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*). O software Image J (*Software livre desenvolvido no National Institutes of Health para análise de imagem*) foi utilizado para realizar a mensuração da área do colágeno em milímetros quadrados (mm²).

Análise estatística

Na análise da área morfométrica do colágeno localizado na fáscia e no sarcoplasma dos diferentes grupos foram analisados por análise de variância

(ANOVA) e teste de Kruskal–Wallis, respectivamente, seguido de post hoc de Tukey. Nas comparações de dois grupos foi utilizado Teste T para amostras independentes e Teste U de Mann-Witney. O Modelo Linear Generalizado seguido de post hoc Bonferroni foi utilizado para análise da atividade de creatina quinase total. A análise estatística foi realizada usando o *software* SPSS® versão 18.0 (Statistical Package for the Social Science Inc., Chicago, IL, USA). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$

RESULTADOS

Atividade total creatina quinase

Após 3 horas da lesão, a atividade da CK aumentou significativamente em relação a todos os outros períodos antes e após a lesão por esmagamento. Houve um aumento importante nos níveis de CK no período de 3 horas pós lesão ($816,565 \pm 39,270$) em relação ao momento pré lesão ($560,263 \pm 27,096$ Media \pm EP ($p = 0,001$)). Após 24h ($653,634 \pm 32,261$) a atividade de CK ainda não havia retornado aos valores prévios à lesão. (Figura 2). Nos mesmos períodos de tempo, a análise realizada com os grupos sham não apresentou diferença estatística.

Houve a perda de um espécime do grupo lesão que sofreria eutanásia no 14º dia após lesão (60N) no momento da anestesia de isoflurano (5%) para coleta de sangue para análise de CK.

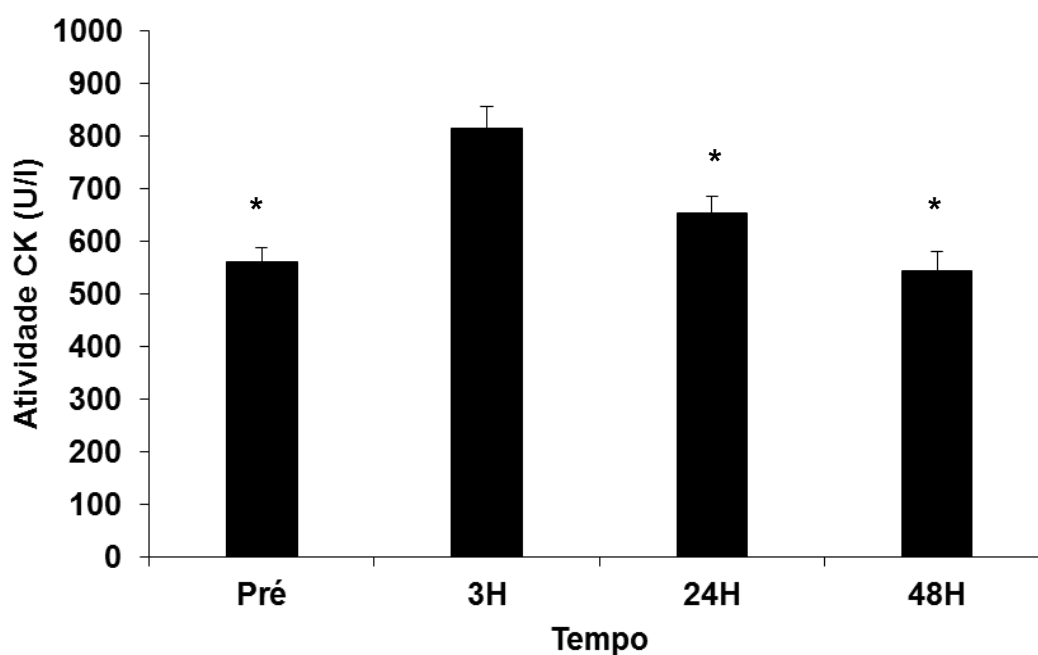


Figura 2. Atividade total de CK em cada período, pré lesão e após a lesão. * $P < 0,05$ vs. período 3 horas pós lesão.

Análise Histopatológica

A área lesada foi localizada próxima à superfície medial do músculo gastrocnêmio subjacente e adjacente ao local pinçado abrangendo a fáscia e o sarcoplasma em todos os espécimes dos grupos lesão.

A coloração HE revelou na fáscia lesada do grupo 3h lesão (60N) (n = 10), discreto a moderado infiltrado polimorfonuclear, focos hemorrágicos, congestão e edema em todos os espécimes (100%). A presença de fibrina foi observada em 90% das amostras. No sarcoplasma, 100% das amostras apresentaram degeneração de Zenker, *ghost cells* e rarefações sarcoplasmáticas além de discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear.

No grupo 2 dias lesão (60N) (n = 10), a região da fáscia apresentou abundante infiltrado polimorfonuclear e necrose tecidual em todas as amostras (100%) atingindo seu pico. Em comparação ao período imediato após a lesão (3 horas), observamos aumento na quantidade de fibrina, diminuição nos focos hemorrágicos e persistência de congestão e edema. No sarcoplasma, o infiltrado polimorfonuclear, degeneração de Zenker, *ghost cells* também atinge seu pico em 100% das amostras. Houve diminuição nas rarefações em comparação com o grupo 3 horas pós-lesão (Figura 3 - A e B).

O grupo 7 dias lesão (60N) (n = 10) apresentou, na fáscia, abundante infiltrado inflamatório mononuclear e formação de tecido fibrótico em todas as amostras (100%). Tecido de granulação foi observado em 70% das amostras. No sarcoplasma, observamos fibrose focal e atrofia multifocal em todos os espécimes (100%); discreto infiltrado inflamatório presente em 50% das amostras; a degeneração de Zenker também apresentou redução em apenas 30% das amostras. (Figura 3 - C e D)

No grupo 14 dias lesão (60N) (n = 10) foi observado, na fáscia, tecido fibrótico abundante, diminuição do infiltrado mononuclear em todas as amostras examinadas. Ausência de tecido de granulação praticamente. No sarcoplasma, observamos início da regeneração e discreto infiltrado mononuclear em todas as amostras examinadas (100%). Ausência de degeneração de Zenker. Na comparação com o grupo 7 dias lesão, ocorreu diminuição da fibrose e da atrofia multifocal.

Todos os espécimes do grupo 14 dias lesão (130-150N) (n = 10), apresentaram abundante infiltrado mononuclear, tecido fibrótico e, aumento no tecido de granulação em comparação ao grupo 14 dias lesão (60N). No sarcoplasma observamos maior quantidade de infiltrado mononuclear, fibrose, atrofia focal, degeneração e regeneração em comparação ao 14^o dia após a lesão. Ausência de degeneração de Zenker, 40% das amostras ainda apresentaram tecido de granulação.

No grupo 21 dias lesão (60N) houve regeneração na área lesada na fáscia e do sarcoplasma. Na fáscia, encontramos discreto infiltrado inflamatório em apenas 30% das amostras. Houve redução do tecido fibrótico em comparação ao 14^o dia após a lesão. No sarcoplasma, o tecido fibrótico persistiu em apenas 30% das amostras, houve diminuição das alterações regenerativas em comparação ao grupo 14 dias lesão.

Os grupos sham apresentaram resposta inflamatória mais discreta na fáscia para as variáveis estudadas. Não foram observadas alterações histopatológicas sarcoplasmáticas significativas nestes grupos.

No grupo controle, membro contralateral do grupo lesão 14 dias (130-150N), não foram detectados alterações histopatológicas relevantes.

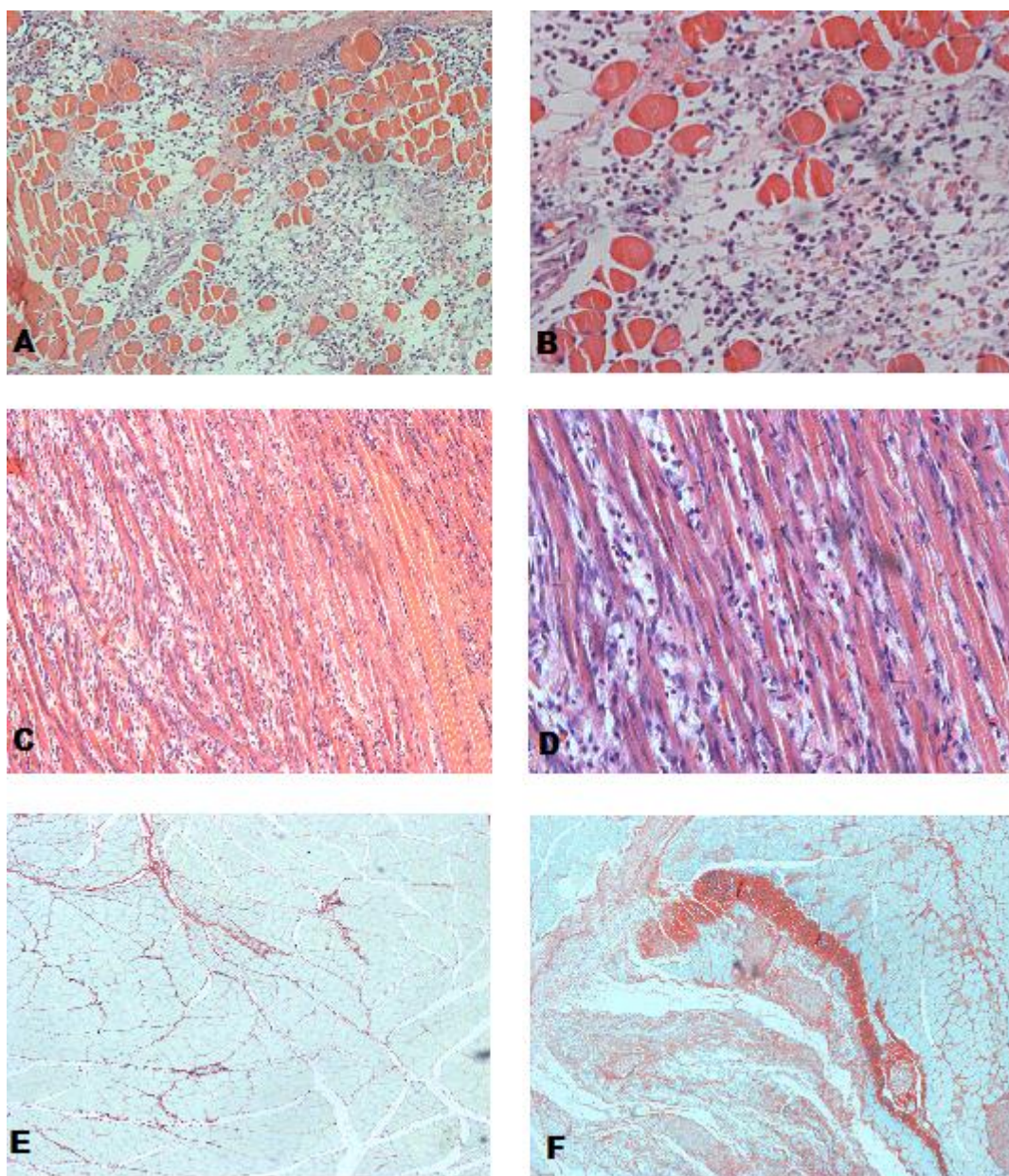


Figura 3: Fotomicrografia: HE - (A) Infiltrado inflamatório polimorfonuclear grupo 2 dias lesão (60N) (200x) e em (B) aumento de 400x. (C) Infiltrado inflamatório mononuclear grupo 7 dias lesão (60N) (200x) e em (D) aumento de 400x. Picosírius – (E) Área de deposição do colágeno no grupo 14 dias lesão (60N) e (F) Área de deposição do colágeno no grupo 14 dias lesão (130N – 150N).

Área do Colágeno

. Na comparação da área colágeno depositado no sarcoplasma lesado para os grupos 3 horas, 2 dias, 7 dias, 14 dias, 21 dias, observamos menor área de colágeno no grupo 2 dias ($0,009 \pm 0,002$) em comparação com os grupos 7 dias ($0,040 \pm 0,016$, Media \pm DP) ($p=0,001$), 14 dias ($0,023 \pm 0,011$) ($p = 0,015$) e 21 dias ($0,0195 \pm 0,004$) ($p = 0,032$). O grupo 7 dias ($0,023 \pm 0,016$) apresentou maior área de colágeno depositado comparado ao grupo 3 horas lesão ($0,014 \pm 0,004$) ($p=0,001$) (Figura 4). Os grupos anteriores, não apresentaram diferença significativa na comparação da área do colágeno depositado na fáscia.

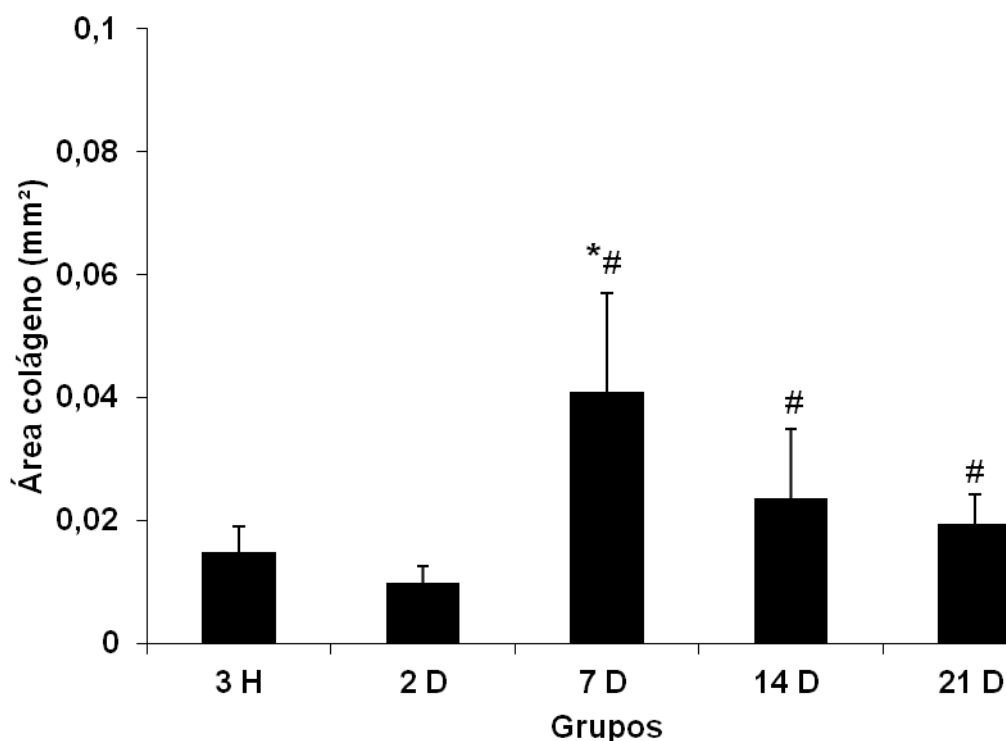


Fig. 4. Quantificação do colágeno por análise morfométrica localizado no sarcoplasma do músculo gastrocnêmio em cada grupo lesão; Os valores representam media \pm DP; ANOVA *one-way*: * $P < 0,05$ vs. grupo lesão 3 horas; # $P < 0,05$ vs grupo lesão 2 dias apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Na comparação dos grupos lesão 14 dias (60N) (fáscia: $0,051 \pm 0,011$, Média \pm DP e sarcoplasma: $0,023$ (0,016)), Mediana (IQR)) e lesão 14 dias (130-150N) (fáscia: $0,076 \pm 0,020$ e sarcoplasma $0,041$ (0,041)), o segundo grupo apresentou maior área de colágeno na fáscia ($p=0,005$) e no sarcoplasma ($p = 0,003$) (Tabela 1) (Figura 3 - E e F).

O grupo lesão 14 dias (130-150N) (fáscia $0,009 \pm 0,002$; sarcoplasma $0,041$ (0,005)) apresentou maior área de colágeno na fáscia ($p=0,001$) e no sarcoplasma ($p=0,001$) comparado ao grupo controle (fáscia $0,077 \pm 0,020$; sarcoplasma $0,005$ (0,005)) (Tabela 2).

Tabela 1 – Área do colágeno na fáscia e no sarcoplasma nos grupos lesão 14 dias com lesões em diferentes intensidades.

Grupos			
Colágeno	14 dias (60N) (n=10)	14 dias (130-150N) (n=10)	p
Fáscia ^a	$0,051 \pm 0,011$	$0,077 \pm 0,020$	0,005*
Sarcoplasma ^b	$0,023$ (0,016)	$0,041$ (0,041)	0,003**

^aValores expressos em média \pm desvio padrão. ^bValores expressos em mediana (amplitude interquartil). *Teste T independente **Teste U de Mann Whitney

Tabela 2 – Área do colágeno na fáscia e no sarcoplasma nos grupos controle e grupo lesão 14 dias (130-150N).

Grupos			
Colágeno	Controle (n=10)	14 dias (130-150N) (n=10)	p
Fáscia ^a	$0,009 \pm 0,002$	$0,077 \pm 0,020$	0,001*
Sarcoplasma ^b	$0,005$ (0,005)	$0,041$ (0,005)	0,001**

^aValores expressos em média \pm desvio padrão. ^bValores expressos em mediana (amplitude interquartil). *Teste T independente **Teste U de Mann Whitney

DISCUSSÃO

Este estudo experimental apresentou o desenvolvimento de um modelo de lesão muscular por esmagamento controlada por uma célula de carga. A ação do dispositivo de pinça atua para simular um trauma por esmagamento, em vez de produzir uma lesão por contusão promovida por impacto brusco na superfície do músculo como a maioria dos indutores de trauma descritos na literatura (JARVINEN; SORVARI, 1975; FISHER et al., 1990; CRISCO et al., 1994; KASEMKIJWATTANA et al., 1998; MARKERT et al., 2005; MCBRIER et al., 2009). O modelo por contusão não era o mais adequado para os objetivos deste estudo, pois objetivávamos uma área mais extensa e um maior grau de lesão, necessários para promover um receptáculo natural (WINET, 2003; KARANDE et al., 2004; PANOSKALTSIS et al., 2005), que deve conter predominantemente matriz extramiofibrilar. O uso de um objeto de peso maior para a contusão oferece o risco de produzir lesões nos tecidos adjacentes à musculatura originalmente proposta, como uma fratura óssea. Outra desvantagem desse método é a lesão conjunta de músculo e pele, impedindo de avaliar separadamente os efeitos da lesão, pois a lesão na pele pode influenciar, via fatores inflamatórios, a regeneração muscular e o comportamento de células-tronco (TOLOSA et al., 2005; NAKAMURA et al., 2005; SHEN et al., 2005).

Outro modelo de lesão é o de incisão transversal estudado pelo autor Menetrey et al. (1999); que envolve a sutura das extremidades, sendo tecnicamente difícil quando nos referimos a fibras musculares, acrescido da dificuldade de se obter lesões com dimensões semelhantes. Além disso, esse modelo não formaria um receptáculo natural para as células-tronco, pois destruiria a continuidade da arquitetura em nível de matriz extramiofibrilar (JÄRVINEN et al., 2005).

No modelo de esmagamento proposto por este estudo, o trauma não interrompe totalmente a continuidade longitudinal do músculo, sendo importante para o nicho de aposição de células - tronco em estudos posteriores (WINET, 2003; KARANDE et al., 2004; PANOSKALTSIS et al., 2005; POTIER; PETITE, 2005). Permitindo a variação de 0 a 400N da força empregada na lesão sem necessidade de alterações de equipamentos e com mensuração em tempo real da intensidade de força aplicada pelo tempo necessário.

O dano causado no nosso modelo atingiu as fáscias e o sarcoplasma de maneira centralizada na porção posterior (no terço médio) da cabeça medial do gastrocnêmio, proporcionando fácil identificação da área da lesão quando realizada macroscopia e divisão nas seções transversais, facilitando identificação das variáveis histopatológicas selecionadas.

Para avaliar o dano tecidual nós realizamos análise de CK que é o marcador do estado funcional do tecido muscular. Em condições normais, a enzima CK está presente principalmente no esqueleto muscular e é liberada no sangue em níveis baixos. Quando o dano muscular ocorre, a CK extravaza para o espaço extracelular, resultando em aumento de seu nível no sangue (BRANCACCIO et al., 2007; SARI et al., 2008). Em nosso estudo a atividade séria de CK aumentou significativamente três horas após a lesão em comparação ao nível pré-lesão e, diminuiu 24 h mais tarde, mas permaneceu superior ao nível pré-lesão, indicando que o modelo de lesão é bem sucedido.

O pico de atividade de CK após 3 horas da lesão coincide com os achados histopatológicos (intenso infiltrado polimorfonuclear, focos hemorrágicos, congestão e edema) característicos de inflamação aguda.

O modelo descrito apresentou a cinética do processo inflamatório conforme encontrado na literatura (JÄRVINEN et al., 2000; JÄRVINEN et al., 2005; BORCELLIA et al., 2009; TURNER; BADYLAK, 2011), caracterizando bem as suas 3 fases. As amostras de cada grupo apresentaram achados histopatológicos bastante homogêneos para as variáveis estudadas. Comparando com outros modelos de lesão muscular imediatamente após a lesão (3 horas) as amostras apresentaram marcado edema observado também por Crisco et al., 1994 No grupo 2 dias (60N) observamos presença de ativa reação inflamatória observado também por Hurme et al. (1991); Crisco et al. (1994) e Menetrey et al. (1999). O grupo 7 dias (60N) apresentou diminuição da resposta inflamatória aguda polimorfonuclear, ausência de edema e grande quantidade de células mononucleares também descritos por Hurme et al. (1991); Crisco et al. (1994) e Menetrey et al. (1999). Os grupos 14 dias (60N) e 14 dias (130-150N) foram caracterizados pela presença abundante de colágeno e miofibrilas em regeneração descritos também por Hurme et al. (1991) e Menetrey et al. (1999). Aos 21 dias (60N), os achados são semelhantes aos dos 14 dias com menor deposição de colágeno descritos também por Hurme et al. (1991) e Menetrey et al. (1999). Em outro estudo, utilizando o modelo de contusão Crisco et al. (1994), aos 21 dias a lesão já estava com processo regenerativo completo e os espécimes iguais aos dos grupo controle, sugerindo uma lesão mais leve do que apresentada neste estudo.

O aparelho de lesão descrito por nosso estudo foi eficaz ao produzir um trauma no músculo e esse trauma promoveu respostas de diferentes tamanhos dependendo da força empregada no momento da lesão conforme os resultados encontrados na análise morfométrica de colágeno. O grupo 14 dias (130-150N) apresentou maior área de colágeno na região da fáscia ($p=0,005$) e do sarcoplasma

($p=0,003$) comparado ao grupo 14 dias (60N). Também encontramos uma diferença importante referente à área do colágeno na comparação do grupo controle com o grupo 14 dias (130-150N) (fáscia: $p=0,001$ e sarcoplasma: $p=0,001$) reforçando a eficácia do modelo. O grupo 7 dias lesão (60N) apresentou maior na área de colágeno no sarcoplasma em comparação ao grupo imediato pós-lesão($p=0,001$), semelhante ao encontrado por Rizzi et al. (2006).

Não encontramos diferenças significativas no cálculo morfométrico do colágeno da fáscia na comparação dos grupos que sofreram lesão com força aplicada de 60N, possivelmente a força empregada na realização não foi suficiente para provocar uma resposta inflamatória significativa.

Os grupos sham apresentaram alterações histopatológicas e deposição de colágeno principalmente na fáscia, possivelmente devido à manipulação para descolamento do músculo sóleo e posicionamento na pinça de compressão, porém sem danos nas miofibrilas semelhante ao encontrado por Rushton (1997).

O modelo descrito em nosso estudo será importante para o progresso de novos estudos em abordagens terapêuticas, como células-tronco e também para caracterizar a cinética do processo inflamatório em tecido muscular esquelético

Nossos achados demonstram um modelo de lesão por esmagamento simples, facilmente reproduzível que caracteriza bem todas as fases do processo inflamatório.

Conforme descrito pelos achados histopatológicos, cálculo morfométrico do colágeno e a análise da atividade de CK.

A quantidade de tecido fibroso é dependente da força aplicada no momento do dano tecidual.

REFERÊNCIAS

BAPTISTA, J.; MARTINS, M. D.; PAVESI, V. C. S.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S. PINTO, D. S.; FERRARI, R. A. M. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.29, n.1, p.11-7, 2011.

BORSELLIA, C.; STORRIEA, H.; BENESCH-LEEC, F.; SHVARTSMANA, D.; CEZARA, C.; LICHTMANE, J. W.; VANDENBURGH, H. H.; MOONEY, D. J.; Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. **PNAS**, Dec. 4, 2009.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, M.; LIMONGELLI, F. M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **British Medical Bulletin**; v.81 e 82: 209–230, 2007.

BUNN, J. R.; CANNING, J.; BURKE, G.; MUSHIPE, M.; MARSH, D. R.; LI, G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle—A biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. **Journal of Orthopaedic Research**, v.22, p. 1336-44, 2004.

CANTINI, M.; GIURISATO, E.; RADU, C.; TIOZZO, S.; PAMPINELLA, F., SENIGAGLIA, D.; ZANIOLO, G.; MAZZOLENI, F.; VITIELLO, L. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. **Journal of the Neurological Sciences**, v.23, p. 189–94, 2002

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiological Reviews**, v.84, p.209–38, 2004.

CRISCO, J. J.; JOKL, P.; HEINEN, G. T.; CONNELL, M. D.; PANJABI, M. M. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. **American Journal of Sports Medicine**, v.22, n.5, p.702-10, Set-Out. 1994.

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

GHALY, A.; MARSH, D. R. Ischaemia–reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. **International. Journal Experimental. Pathology**, v.91, p. 244–55, 2010.

KARANDE, T. S.; ONG J. L.; AGRAWAL, C. M. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. **Annals of Biomedical Engineering**, v.32, n.12, p.1728-43, Dez. 2004.

KASEMKIJWATTANA, C.; MENETREY, J.; SOMOGYI, G.; MORELAND, M. S.; FU, F. H.; BURANAPANITKIT, B.; WATKINS, S. C.; HUARD, J. Desevelopment of

approaches to improve the healing following muscle contusion. **Cell Transplantation**, v.7, n.6, p.585-98, 1998.

HAWKE, T.J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*, v. 91, p.534–55, 2001.

HURME, T.; KALIMO, H.; SANDERBERG, M.; LEHTO, M.; VUORIO, E.; Localization of type I and III collagen and fibronectin formation of injured gastrocnemius muscle. **Laboratory Investigation**, v.64, n.1, p. 71-84, 1991.

ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources). **Guide for the Care and Use for Laboratory Animals**. National Academy Press: Washington, DC, USA, 1996.

JÄRVINEN, M.; SORVARI, T. Healing of a crush injury in rat striated muscle. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**. v.83, n.2, p.259-65, Mar. 1975.

JÄRVINEN, T., A., H.; KÄÄRIÄINEN, M.; JÄRVINEN, M.; KALIMO, H. Muscle strain injuries. **Current Opinion in Rheumatology**, v.12, p.155–161, 2000.

JÄRVINEN, T. A., H.; JÄRVINEN, T.; KÄÄRIÄINEN, M KALIMO, H. JÄRVINEN, M Muscle Injuries: Biology and Treatment. **American Journal of Sports Medicine**, v.33, p.745–64, 2005.

LEHTO, M.; DUACE, V. C.; RESTALL, D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. **The Journal of Bone and Surgery**, 1985.

LI, Y.; FOSTER, W.; DEASY, B. M.; CHAN, Y.; PRISK, V.; TANG, Y.; Cummins, J.; Huard, J. Transforming Growth Factor-1 Induces the Differentiation of Myogenic Cells into Fibrotic Cells in Injured Skeletal Muscle. **American Journal of Pathology**, v.164, n.3, p.1007-19, Mar. 2004.

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

MCBRIER, N. M.; NEUBERGER, T.; OKITA,N.; WEBB, A.; SHARKEY, N. Reliability and validity of a novel muscle contusion device. **Journal of Athletic Training**, v.44, n.3, p.275–78, 2009.

MENETREY, J.; KASEMKIJWATTANA, C.; FU, F. H.; MORELAND, M. S.; HUARD, J. Suturing Versus Immobilization of a Muscle Laceration A Morphological and Functional Study in a Mouse Model. **The American Journal of Sports Medicine**, v.27, n.2, p.222-29 1999.

NAKAMURA, M.; OKADA, S.; TOYAMA, Y.; OKANO, H. Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v.28, n.3, p.197-204, Jun. 2005.

NYKOLAOU, P. K.; MACDONALD, B. L.; GLISSON, R. R.; SEABER, A.V.; GARRET, W. E. Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury. **American Journal of Sports Medicine**, v.15, n.1, 1987.

PANOSKALTSIS, N.; MANTALARIS, A.; WU, J. H. Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.1, p.28-35, Jul. 2005.

PIEADADE, M. C. B.; GALHARDO, M. S.; BATTLEHNER, C. N.; FERREIRA, M. A.; CALDINI, E. G.; DE TOLEDO, O. M. S. Effect of ultrasound therapy on the repair of Gastrocnemius muscle injury in rats. **Ultrasonics**, v.48, p.403–411, Mar 2008.

POTIER E, PETITE H. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in orthopaedics. **Pathologie Biologie (Paris)**, v.53, n.3, p.142-8, Abr. 2005.

RIZZI, C. F.; MAURIZ, J. L.; CORREA, D. S. F.; MOREIRA, A. J.; ZETTLER, C. J.; FILIPPIN, L. I.; MARRONI, N. P.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- κ b signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.38, p.704–13, 2006.

RUSHTON, J.L.; DAVIES, I.; HORAN, M. A.; MAHON, M.; WILLIAMS, R. Production of consistent crush lesions of murine skeletal muscle in vivo using an electromechanical device. **Journal of Anatomy**, v.190, p.417-22, 1997.

SAITO, Y.; NONAKA, I. Initiation of satellite cell replication in bupivacaine-induced myonecrosis. **Acta Neuropathologica**; v.88, n.3, p.252-7, 1994.

SARI. Y.; NAKAGAMI, G.; KINOSHITA, A.; HUANG, L.; UEDA, K.; IIZAKA, S.; SANADA, H SUGAMA, J. Changes in serum and exudates creatine phosphokinase concentrations as an indicator of deep tissue injury: a pilot study. **International Wound Journal**, v.5, p.674–80, 2008.

SATO, K.; LI, Y.; FOSTER, W.; FUKUSHIMA, K.; BADLANI, N.; ADACHI, N.; USAS, V.; FU, F. H.; HUARD, J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. **Muscle Nerve**, v.28, p. 365–372, 2003.

SHEN, W.; LI, Y.; TANG, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. **The American Journal of Pathology**, v.167, n.4, p.1105-17, Oct. 2005.

TOLOSA, L.; MORLÁ, M.; IGLESIAS, A.; BUSQUETS, X.; LLADÓ, J.; OLMOS, G. IFN- γ prevents TNF- α -induced apoptosis in C2C12 myotubes through down-regulation of TNF-R2 and increased NF- κ B activity. **Cellular Signalling**, v.17, n.11, p.1333-1342, Nov. 2005.

TURNER, N. J.; BADYLAK, S. F. Regeneration of skeletal muscle. **Cell and Tissue Research**, Jun. 2011.

ULLMAN, M.; ULLMAN, A.; SOMMERLAND, H.; SKOTTNER, A.; OLDFORS, A. Effects of growth hormone on muscle regeneration and IGF-I concentration in old rats. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.140, p.521-25, 1990.

UTVÅG, S. E.; GRUNDNES, O.; RINDAL, D. B.; REIKERÅS, O. influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. **Journal of Orthopaedic Trauma** v. 17, n.6, p.430–35, 2003.

VIHKO, V.; SALMINEN, A.; RANTAMÄKI, J. Exhaustive exercise, endurance training, and acid hydrolase activity in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.47, n.43-50, 1979.

WINET, H. A bone fluid flow hypothesis for muscle pump-driven capillary filtration: II. Proposed role for exercise in erodible scaffold implant incorporation. **European Cells & Materials**, v.1, n.6, p.1-10; discussion 10-1, Oct. 2003.

ZACHAZEWSKI, J. E.; MAGEE, D. E., QUILLEN, W. S. **Athletic Injuries and Rehabilitation**. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1996.

ARTIGO EM INGLÊS**DEVELOPMENT OF A MUSCLE LESION BY CRUSHING IN A
MURINE MODEL**

Ângela Roberta Conte Muraro¹; João Luiz Ellera Gomes^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - RS; ² Serviço de Traumatologia e Ortopedia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre), Porto Alegre – RS, Brasil.

Corresponding author: Ângela Roberta Conte Muraro, Rua Ramiro Barcellos 2400, 2º andar, PPG Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS, Brasil, Fone: 555199992652, e-mail: angelamuraro@hotmail.com

Funding: This study was supported by FIPE - HCPA

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest

ABSTRACT

Introduction: Experimental models of muscle injury are useful tools to investigate the mechanisms related to muscle regeneration. The model chosen should be well described and reproduce the basic processes that occur in muscle injury compared to tissue damage and inflammatory response. **Objective:** To develop a murine model of muscle damage by crushing in the gastrocnemius muscle and evaluate the different phases of the tissue inflammatory response, serum and quantify the area of collagen pre-injury and at different times after injury. **Methods:** We compared the activity of creatine kinase (CK) in different time periods. The histopathological evaluation to characterization of the inflammatory process was performed and described for all groups. The quantification of collagen area on the fascia and sarcoplasm was performed in all groups. **Results:** The levels of CK increased in the post-injury compared to pre-injury. The histopathological variables showed adequate characterization of the phases of the inflammatory process. The area of collagen deposited in the sarcoplasm of group in 7 days lesion was higher compared to group 3 hours to 2 days. The group that suffered the injury with greater strenght showed higher collagen area compared to the group who suffered the injury with less strenght and the control group. **Conclusion:** The model described in this study will be important for the progress of new studies in therapeutic approaches, and also to characterize the kinetics of the inflammatory process in skeletal muscle tissue.

Keywords: muscle injury, crush; creatine kinase; inflammatory process, collagen

INTRODUCTION

Muscle lesions occur through a variety of mechanisms resulting from direct trauma (crushing, lacerations and contusions) or indirect trauma (ischemia by neurological dysfunction and stretching). The phases of the inflammatory process that occurs in damaged structures are similar among the different types of muscle studied (ZACHAZEWSKI, et al., 1996; JÄRVINEN et al., 2000; SATO et al., 2003; RIZZI et al., 2006), but the functional recovery of the injured muscle varies from one type to another. The inflammatory process can be divided basically into three phases: (1) the degenerative phase, characterized by hematoma, necrosis of myofibrils and polymorphonuclear cell infiltrate; (2) the repair phase, consisting of phagocytosis of necrotic tissue, mononuclear cell infiltrate, regeneration of myofibrils, production of connective tissue, and capillary growth (granulation tissue); (3) the remodeling phase, consisting of maturation of regenerated myofibrils, contraction and reorganization of scar tissue, and restoration of functional capacity (JÄRVINEN et al., 2000; TURNER & BADYLAK, 2011).

A complex union of growth factors with extracellular proteins governs the microenvironment of the lesion, stimulating and coordinating the musculoskeletal repair. These factors are mainly secreted by the activated immune cells and by the skeletal muscle tissue cells themselves. Vascular endothelial cells, neurons and progenitor cells also participate in this process (HAWKE & GARRY 2001; CANTINI et al., 2002). The release sequence of the growth factors appears to be important for the control of muscle repair. The main growth factors include: hepatocyte growth factor (HGF), basic fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor 1 (insulin/IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF). IGF-1 is essential for muscle growth and myoblast and HGF

proliferation. It is a primary regulator of satellite cell proliferation and seems to be the most relevant for the regulation and repair of muscle tissue. The interaction of these factors is complex and their functions are not yet fully defined (TURNER & BADYLAK, 2011).

Excessive proliferation and activation of collagen may occur during the repair process for a muscle injury, which can lead to the formation of a hypertrophic scar and result in an incomplete functional recovery (LEHTO et al., 1985; KASEMKIJWATTANA et al., 1998; MÉNÉTREY et al., 1999; LI et al., 2004; GHALY & MARSH, 2010; BAPTISTA et al., 2011). Strategies to improve muscle regeneration include the use of some therapeutic modalities, such as stem cells. Their effects, however, are not yet fully understood (MU et al., 2011). An effective therapeutic modality should present an accelerated recovery for each phase of the inflammatory process, such that the end result is the formation of an adequate and functional scar (RIZZI et al., 2006).

Experimental models of muscle lesions are useful tools for investigating the mechanisms related to muscle regeneration. The literature presents several models of muscle lesion in animals using a range of methods, producing damage to varying degrees and consequently, different regenerative processes. Studies have used lesion models that include the direct application of anesthetics (SAITO & NONAKA, 1994) or myotoxins in the muscle (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004); occlusion of blood vessels (ULLMAN et al., 1990); exhaustive exercise (VIHKO et al., 1979); laceration (MENÉTREY et al., 1999); contusion (KASEMKIJWATTANA et al., 2008; MC BRIER et al., 2009); stretching (NIKOLAU et al., 1987; JÄRVINEN et al., 2000) and crushing of the muscle (RUSHTON et al., 1997; UTVAG et al., 2003; BUNN et al., 2004), amongst others. The model chosen should be well described and correspond to the

clinical situation as closely as possible. It must also reproduce the basic processes that occur in muscle traumas, especially in relation to tissue damage and inflammatory response.

We chose a model with a direct route of crushing, as with indirect traumas the exact timing, site and extent of injury are unknown. Therefore, the lesion does not present a consistent standard, which prevents the comparison and study of the different therapies used.

The muscle crush lesion model described in this study has proven to be reliable for inducing an injury in skeletal muscle. A variety of different equipments, applied forces, muscle types and animal breeds have been used in studies. Various instruments can be used to produce the lesion, the most common being clamps and forceps, that are generally connected to a device for measuring the force applied (BUNN et al., 2004). We used a compression clamp coupled to a load cell for producing the lesion, which allows the application of heavy pressure exclusively over the muscle.

Care was taken to fully describe the tissue damage caused, the different inflammatory response phases, serum inflammatory response and the quantification of the area occupied by fibrous tissue at different moments after the injury, all with the aim of ensuring that the lesion model developed in our study can be used in future research with stem cells or other therapies.

MATERIALS AND METHODS

A quantitative descriptive study of an experimental design was conducted. The preparation of the lesion inducing apparatus and the study procedures were performed in units of the Experimental Research Center of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, and these were approved by the Research Ethics Committee and the Health Research and Graduate Studies Group of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (nº 110444).

Animals

A total of 75 *Wistar* male rats (*Rattus Norvergicus*), 12 weeks old and with an initial body weight between 230g and 350g were used. The animals were kept 4 or 5 to a housing box, with access to water and food *ad libitum* and remaining in a light/dark cycle of 12 hours at a temperature of 22°C until the day of euthanasia. All *in vivo* procedures were based on the Guide for the Care and Use for Laboratory Animals - ILAR/EUA (1996). The experiments conformed to the rules proposed by the Universal Declaration of Animal Rights (UNESCO-27/01/1978).

The calculation of sample size was performed in program PEPI (Programs for Epidemiologists) whereas 1.32% of collagen in the lesion group 4 days and 14 days of injury group 3.51% (PIE DADE et al., 2008), with 10 animals in each group can identify differences of 3.7% as statistically significant, considering $\alpha = 0.05$ at a power of 80%.

Lesion inducing apparatus

The apparatus is comprised of a clamp (ratio 2:1) (Figure 1 - A) coupled to a load cell (MiniBeam A20 Alfa Instrumentos, São Paulo, Brasil) (Figure 1 - B) that allows the application of compressive forces from 0-400N by the lever system. The lesion length is fixed and set to 6mm. The control of the compression force is exerted manually by means of a sliding wedge (Figure 1 - C). The muscle, to be compressed perpendicular to the length of its fibers, extends along a contact pad measuring 6mm x 16mm. A conditioning circuit excites the strain-gauge of the load cell and converts the resultant electrical signal, proportionally to the force applied, for the analog input of the microcontroller PIC16F88. The PIC performs an analog-digital signal conversion at 10 bits with a 50Hz rate, and transmits the data serially via an RS232-USB cable to a laptop, where it is monitored in real-time. The graphics visualization software was developed for Windows®. The computer screen displays the data graphically and numerically (relationship between Force x Time) in real-time and allows data to be saved to files.

Lesion Induction

The animals were randomly distributed into twelve groups (six lesion, five sham and one control group).

The 60N lesion groups were euthanized 3h (n=10), 2 days (n=10), 7 days (n=10), 14 days (n=10) and 21 days (n=10) after receiving a muscle crush injury applied during the lesion procedure with a force of 60N.

The 130N-150N lesion group (n=10) were euthanized 14 days after receiving a muscle crush injury applied during the lesion procedure with a force ranging between 130N and 150N.

The SHAM group were euthanized 3h (n=3), 2 days (n=3), 7 days (n=3), 14 days (n=3) and 21 days (n=3) after being submitted to the standard surgical procedure, including the positioning of the lesion inducing apparatus, however without receiving a crush injury.

The control group (n=10) was composed of the 130N-150N lesion group but using the unaffected lower limb contralateral to the limb with a lesion.

The animals were anesthetized by isoflurane (5%) inhalation and an intramuscular injection of Tramadol (5mg/Kg), after which the incision area was shaved. In the prone position and under general anesthesia, a longitudinal incision was made in the skin of the posterior surface of the distal segment of the right lower limb, in the region proximal to the knee and extending to the calcaneus, to expose and isolate the gastrocnemius complex. The rat was positioned so that the clamp compressed the middle third of the medial portion of the gastrocnemius (Figure 1 - D). The clamp was progressively closed until exerting a force of 60N or 130N-150N, depending on the group, for 10 seconds through displacement of the wedge. The force and time employed were defined by a previous pilot study.

The animal was removed from the lesion inducing apparatus and the skin sutured with two U-sutures. Recovery from anesthesia took place with one animal per housing unit. The animal was subsequently placed back in its original box where it remained until the day of euthanasia. Upon completing the 3h, 2, 7, 14 or 21 days after the lesion (according to respective group), the rats were euthanized by decapitation using a small animal guillotine.

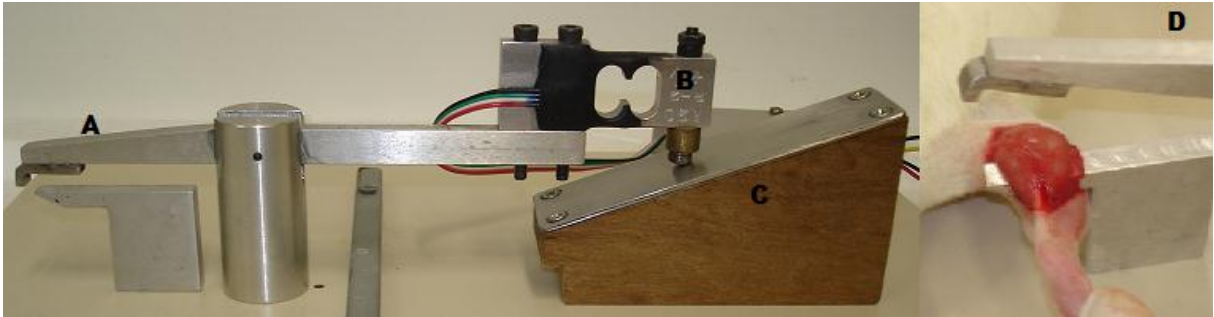


Figure 1: Lesion inducing apparatus (A) clamp, (B) load cell, (C) wedge (D) clamp with gastrocnemius muscle positioned for crushing.

Analysis of creatine kinase activity

The total activity of creatine kinase (CK) was spectrophotometrically measured in serum samples (500 μ L) using a diagnostic kit (CK-NAC, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, USA). Samples were collected prior to the lesion procedure (pre-lesion), 3h, 24h, 48h post-lesion for those animals from the 60N lesion group and the sham group. The animals were anesthetized by isoflurane gas (5%) inhalation and the blood collected from the retro-orbital plexus.

Histopathology

The gastrocnemius muscle was removed from each animal and the fragment containing the lesion (middle third of the muscle) was fixed, without stretching, in 10% buffered formalin for 24h and subsequently embedded in paraffin. Three sections of each sample were serial-cut at 4 μ m thickness for staining with hematoxylin and eosin (HE), and picosirius.

HE staining was used to assess the inflammatory process of the gastrocnemius muscle after the crush lesion. The specimens were studied 3h, 2, 7, 14 and 21 days after the lesion occurred. The evaluation and choice of variables were performed by an experienced pathologist in muscle pathology. Each variable

was analyzed and classified into scores related to its quantity: (0) absent, (1) moderate (2) pronounced. The following variables were analyzed in the fascia: edema, congestion, polymorphonuclear infiltrate, fibrin, cellular necrosis, mononuclear infiltrate, granulation tissue and fibrosis. The variables analyzed in the sarcoplasm were: edema, congestion, hemorrhagic foci, polymorphonuclear infiltrate, fibrin, cellular necrosis, mononuclear infiltrate, granulation tissue, fibrosis, Zenker degeneration, ghost cells, sarcoplasmic rarefactions and multifocal muscular atrophy.

Morphometric analysis of images

On the slides stained with picosirius, three fields were selected in the cut containing the greater quantity of collagen. The digital capture was carried out using a digital camera (QColor 5, Olympus American Inc, Canada) coupled to an optical microscope (BX 51, Olympus American Inc, Canada). All images were digitalized through the Q Capture Pro 5.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) with a 40x lens and stored in TIFF (Tagged Image File Format). The ImageJ software (public domain image analysis software developed by the National Institutes of Health) was used for the measurement of collagen area in square millimeters (mm²).

Statistical analysis

Analysis of the morphometric area of collagen found in the fascia and sarcoplasm of the different groups was performed by analysis of variance (ANOVA) and the Kruskal-Wallis test, respectively, followed by Tukey's post hoc. The independent samples t-test and Mann-Whitney U test were used for the comparison of the two groups. The generalized linear model followed by Bonferroni post hoc test was used to analyze the total creatine kinase activity. Statistical analysis was

performed using the *software* SPSS® version 18.0 (Statistical Package for the Social Science Inc., Chicago, IL,USA). The level of significance adopted was $p < 0.05$

RESULTS

Total creatine kinase activity

At 3h post-lesion, the CK activity increased significantly in relation to all other pre- and post-crush injury time periods. There was a significant increase in CK levels in the 3h post-lesion (816.565 ± 39.270) (Mean \pm SEM) period in comparison to the pre-lesion (5603.263 ± 27.096) ($p=0.001$) period. The CK activity at 24h post-lesion (653.634 ± 32.261) had still not returned to the pre-lesion values (Figure 2). The analysis carried out for the same time periods with the sham groups showed no statistical differences.

One specimen from the 60N lesion group that was due to be euthanized at 14 days post-lesion was lost at the moment of anesthesia with isoflurane (5%) for collection of a blood for the CK analysis.

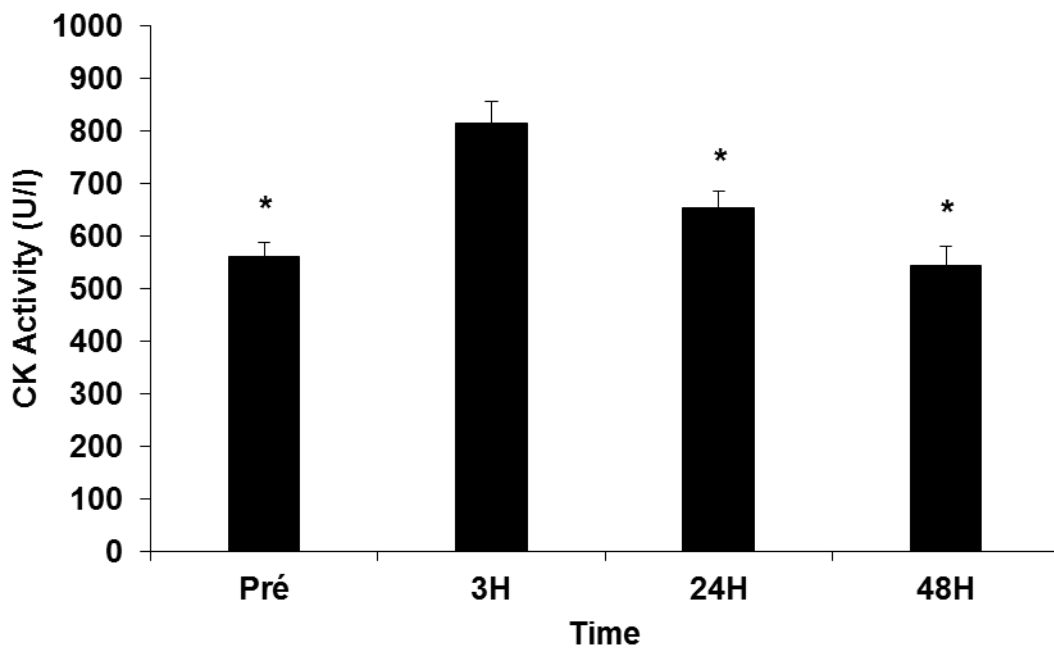


Figure. 2: Total activity of CK in each period, pre lesion and after injury. * $P < 0.05$ vs. period 3 hours post injury.

Histopathology analysis

The injured area was located close to the medial surface of the gastrocnemius muscle, beneath and adjacent to the clamped site covering the muscle connective tissue wrappings (perimysium and endomysium) and the sarcoplasm in all the specimens from the lesion groups

The HE staining revealed the injured fascia of the 3h lesion group (60N) (n=10), with mild to moderate polymorphonuclear infiltrate, hemorrhagic foci, congestion and edema in all specimens (100%). The presence of fibrin was observed in 90% of samples. In the sarcoplasm, 100% of the samples presented Zenker degeneration, ghost cells and sarcoplasmic rarefactions, besides moderate inflammatory polymorphonuclear infiltrate.

In the 2-day lesion group (60N) (n=10), the region of the fascia presented pronounced polymorphonuclear infiltrate and necrosis tissue in all samples (100%), reaching its peak. When compared to the period immediately after the injury (3h), we observed an increase in the quantity of fibrin, a decrease in hemorrhagic foci, and persistence of congestion and edema. In the sarcoplasm, the polymorphonuclear infiltrate, Zenker degeneration and ghost cells also reached their peak in 100% of the samples, whilst there was a decrease in rarefactions when compared to the 3h post-lesion group (Figure 3 - A e B).

The 7-day lesion group (60N) (n=10).presented pronounced mononuclear inflammatory infiltrate in the fascia, as well as formation of fibrotic tissue in all samples (100%). Granulation tissue was observed in 70% of the samples. In the

sarcoplasm, we observed focal fibrosis and multifocal atrophy in all specimens (100%); moderate inflammatory infiltrate present in 50% of samples; Zenker degeneration also presented a reduction in just 30% of samples (Figure 3 - C e D)

In the 14-day lesion group (60N) (n=10), pronounced fibrous tissue was observed in the fascia and a reduction of mononuclear infiltrate in all the samples examined. Virtually no granulation tissue was found. In the sarcoplasm, we observed the beginning of regeneration and moderate mononuclear infiltrate in all the samples examined (100%). Zenker degeneration was absent. When compared with the 7-day lesion group, there was a decrease of fibrosis and multifocal atrophy.

In the 14-day lesion group (130N-150N), all specimens showed pronounced mononuclear infiltrate and fibrous tissue, and increased granulation tissue in comparison with the 14-day lesion group (60N). In the sarcoplasm, we observed a greater quantity of mononuclear infiltrate, fibrosis, focal atrophy, degeneration and regeneration in comparison with the 14-day lesion group (60N). There was an absence of Zenker degeneration and 40% of samples still presented granulation tissue.

In the 21-day lesion group (60N) there was regeneration in the damaged area of the fascia and sarcoplasm. In the fascia, we found moderate inflammatory infiltrate in only 30% of the samples, and there was a reduction of fibrotic tissue when compared to the 14th day after lesion.

The sham groups presented a milder inflammatory response in the fascia for the variables studied. No significant histopathology alterations were observed in the sarcoplasm for these groups.

No relevant histopathology alterations were detected in the control group, which considered the uninjured contralateral limb of the 14-day lesion group (130N-150N).

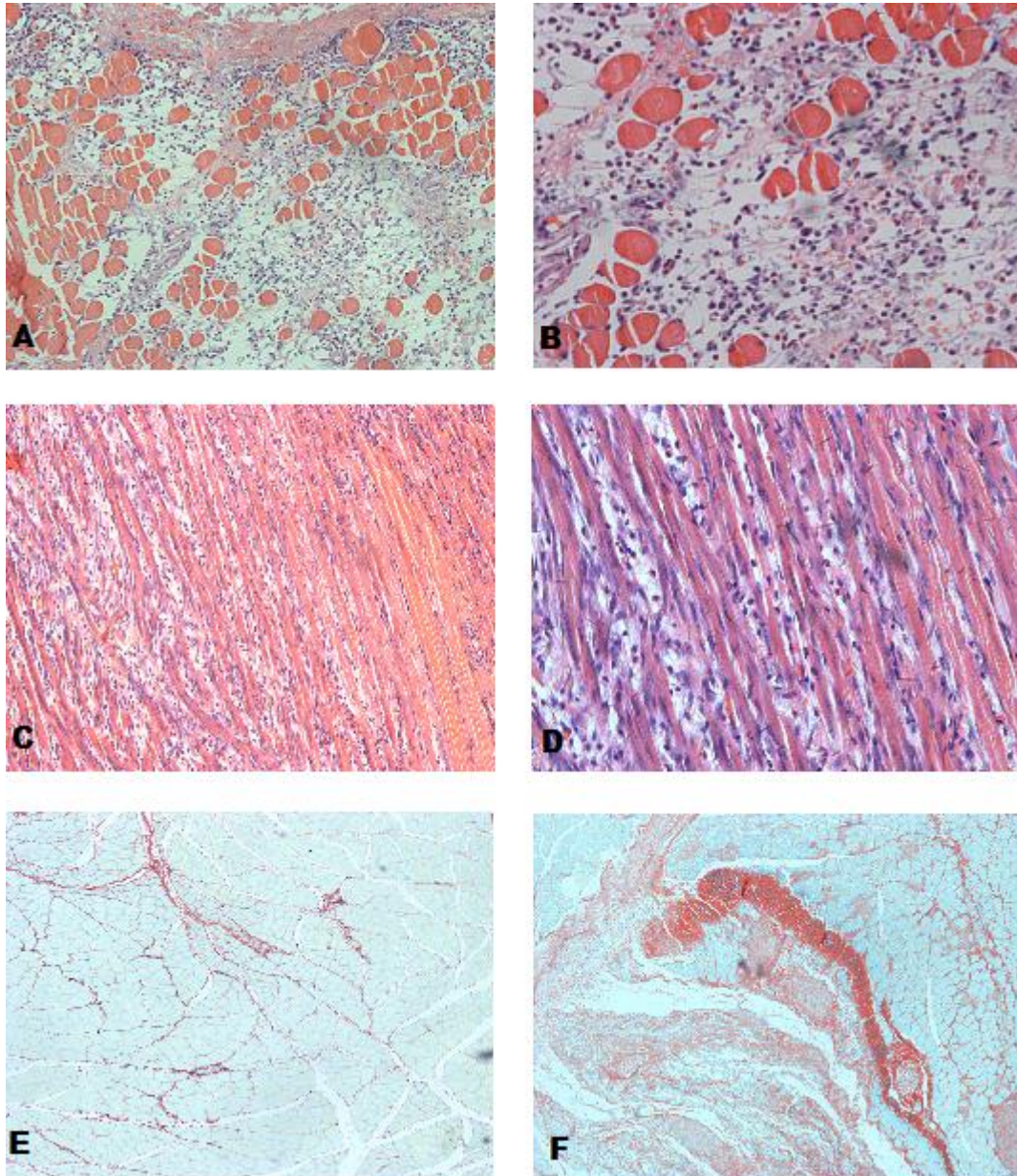


Figure 3: Photomicrograph: HE - (A) polymorphonuclear inflammatory infiltrate lesion group two days (60N) (200x) and (B) 400x magnification. (C) mononuclear inflammatory infiltrate 7 days lesion group (60N) (200x) and (D) 400x magnification. Picrosirius - (E) Field deposition of collagen in the group 14 days lesion (60N) and (F) Field deposition of collagen in the group 14 days lesion (130N - 150N)

Collagen area

In a comparison of the collagen area deposited in the sarcoplasm for these same groups, we observed a smaller area of collagen in the 2-day group (0.009 ± 0.007), 7-day (0.04 ± 0.003) ($p=0.001$), 14-day (0.023 ± 0.003) ($p=0.015$) and 21-day (0.0195 ± 0.003) ($p=0.032$). The 3-hour group (0.014 ± 0.004) ($p=0.001$) (Figure 4). The above mentioned groups showed no significant difference in a comparison of the collagen area deposited in the fascia.

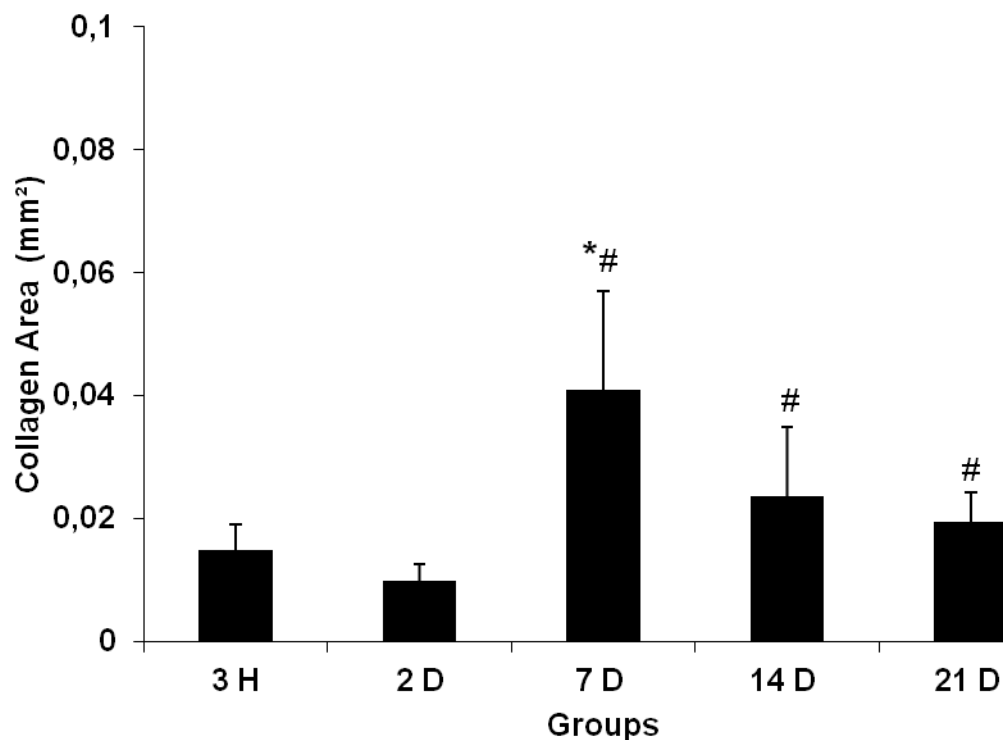


Figure. 4. Quantification by morphometric analysis of collagen located in the sarcoplasm of the gastrocnemius muscle in each injury group. Values represent mean \pm SD, one-way ANOVA: * $P < 0.05$ vs. injury group 3 hours; # $P < 0.05$ vs. injury group 2 days showed statistically significant differences

In a comparison of the 14-day lesion group (60N) (fascia: 0.051 ± 0.011 , and sarcoplasm: $0.023 - 0.016$, Median (IQR)) and the 14-day lesion group (130N-150N) (fascia: 0.076 ± 0.02 , and sarcoplasm $0.041 - 0.041$), the second group presented a greater area of collagen in the fascia ($p=0.005$) and in the sarcoplasm ($p=0.003$) (Table 1) (Figure 3 – E and F).

The 14-day lesion group (130N-150N) (fascia 0.009 ± 0.002 ; sarcoplasm $0.041-0.005$) presented a greater area of collagen in the fascia ($p=0.001$) and in the sarcoplasm ($p=0.001$), when compared to the control group (fascia 0.077 ± 0.02 ; sarcoplasm $0.005-0.005$) (Table 2).

Table 1 - Area of collagen on the fascia and sarcoplasm groups injury 14 days with lesions in different intensities.

Groups			
Collagen	14 day (60N) (n=10)	14 day (130-150N) (n=10)	p
Fascia ^a	$0,051 \pm 0,011$	$0,077 \pm 0,020$	0,005*
Sarcoplasm ^b	0,023 (0,016)	0,041 (0,041)	0,003**

^a Values expressed as mean \pm SD. ^bValues expressed as median (interquartil range). * Student's t-test **Mann Whitney-U Test

Table 2 - Area of collagen on the fascia and sarcoplasm in the control group and injury 14 days (130-150N).

Groups			
Collagen	Control (n=10)	14 day (130-150N) (n=10)	p
Fascia ^a	$0,009 \pm 0,002$	$0,077 \pm 0,020$	0,001*
Sarcoplasm ^b	0,005(0,005)	0,041 (0,005)	0,001**

^a Values expressed as mean \pm SD. ^bValues expressed as median (interquartil range). * Student's t-test **Mann Whitney-U Test

DISCUSSION

This experimental study presented the development of a muscle lesion model by crushing controlled by a load cell. The action of the clamp simulates a crushing trauma, instead of producing a contusion injury through an abrupt impact on the muscle surface, as is described in the majority of the literature for induced trauma (JARVINEM; SORVARI, 1975; FISHER et al., 1990; CRISCO et al., 1994; KASEMKIJWATTANA et al., 1998; MARKERT et al., 2005; MCBRIER et al., 2009). The contusion model was not appropriate for the objectives of this study as we wanted a more extensive area and greater degree of lesion necessary to promote a natural space (WINET, 2003; KARANDE & AGRAWAL, 2004; PANOSKALTSIS et al., 2005), which should predominantly contain extramyocyte matrix. The use of a heavy object to produce the contusion offers a risk of causing injuries in the tissues around the musculature that is being studied, such as a bone fracture. Another disadvantage of this method is that it causes a concomitant lesion of the muscle and skin, thereby impairing the separate evaluation of the effects of the injury as the skin lesion may influence through inflammatory factors, muscle regeneration and the behavior of stem cells (TOLOSA et al., 2005; NAKAMURA et al., 2005; SHEN et al., 2005).

Another lesion model is the transverse incision studied by the authors Menetrey et al. (1999); that involves the suturing of the extremities, which is technically difficult when considering muscle fibers. Additionally, it is hard to obtain lesions with similar dimensions. This model would also not form a natural receptacle for stem cells because it would destroy the architecture continuity at the level of the extramyocyte matrix (JARVIN & SORVARI, 1975).

In the crush model proposed by this study, the trauma does not completely interrupt the longitudinal continuity of the muscle, which is important for the apposition niche of stem cells in future studies. Furthermore, it allows variations of 0 to 400N in the force used in the lesion without the need for changing equipment, and with real-time measurement of the intensity of the applied force for the required time.

The damage caused in our model affected the fascia and the sarcoplasm in a central position (middle third) and at the posterior section of the medial head of the gastrocnemius. This provided easy identification of the lesion area when macroscopic examination was carried out and division into the cross-sections, facilitating the identification of the selected histopathology variables.

We performed an analysis of CK, which is the marker of the functional state of muscle tissue, in order to evaluate the tissue damage. Under normal conditions the CK enzyme is present primarily in skeletal muscle and is released into the blood at low levels. When muscle damage occurs, the CK goes beyond into the extracellular space and results in increased levels in the blood. (BRANCACCIO et al., 2007, SARI et al., 2008). There was a significant increase in CK serum activity in our study at 3h post-lesion when compared to the levels prior to the injury. This activity decreased by 24h post-lesion but still remained higher than the pre-lesion level, indicating that the lesion model is successful.

The peak in CK activity 3h after the lesion coincides with the histopathology findings (pronounced polymorphonuclear infiltrate, hemorrhagic foci, congestion and edema) and is characteristic of acute inflammation.

The model described showed the kinetics of the inflammatory process as found in the literature and featured clearly its 3 phases. Samples from each of the groups presented quite homogeneous histopathology findings in terms of the

variables studied. In a comparison with studies involving other muscle lesion models it was found that the 3h post-lesion samples showed marked edema, which was also observed by Crisco et al., (1994). The presence of active inflammatory reaction was observed in the 2-day group (60N), which is in agreement with findings by Hurme et al. (1991); Crisco et al. (1994) and Menetrey et al. (1999). The 7-day group (60N) exhibited a reduction of polymorphonuclear acute inflammatory response, absence of edema and a large quantity of mononuclear cells, as also described by Hurme et al. (1991); Crisco et al. (1994) and Menetrey et al. (1999). The 14-day groups (60N and 130N-150N) were characterized by the pronounced presence of collagen and myofibrils in a regeneration also reported by Hurme et al. (1991) and Menetrey et al. (1999). At 21 days (60N) the findings are similar to those of 14 days with less collagen deposition, also found by Hurme et al. (1991) and Menetrey et al. (1999). In another study using the contusion model of Crisco et al. (1994), the lesion at 21 days was already with a complete regenerative process and the specimens equal to those of the control group, suggesting a less aggressive lesion than presented in this study.

The apparatus for inducing a lesion described by our study was effective in producing a muscle trauma and this trauma produced different sized responses, depending on the force used at the time of injury, in accordance with the results found in the morphometric analysis of collagen. The 14-day group (130N-150N) showed a greater area of collagen in the fascia region ($p=0.005$) and the sarcoplasm ($p=0.003$) when compared to the 14-day group (60N). We also found a significant difference relating to the area of collagen in a comparison of the control group with the 14-day group (130N-150N) (fascia: $p=0.001$ and sarcoplasm: $p=0.001$), reinforcing the effectiveness of the model.

We found no significant difference in the morphometric calculation of the fascia collagen in a comparison of the lesion groups with a force applied of 60N, suggesting that the force used to produce the injury was possibly not enough to cause a significant inflammatory response.

The sham group presented histopathology alterations and deposits of collagen mainly in the fascia, possibly due to the manipulation for displacement of the soleus muscle and positioning the compression clamp, but without damage to the myofibrils, similar to that found by Rushton (1997).

We believe that the model described in this study will be important for the progress of future studies in therapeutic approaches, like stem cells, and also for defining the kinetics of the inflammatory process in skeletal muscle tissue

Our findings demonstrate a simple crush lesion model that is easily reproducible and distinguishes well the inflammatory process phases, as confirmed by the histopathological findings, the morphometric collagen calculations and the CK activity analysis. The quantity of fibrous tissue is dependent on the force applied at the moment of tissue damage.

REFERENCES

BAPTISTA, J.; MARTINS, M. D.; PAVESI, V. C. S.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S. PINTO, D. S.; FERRARI, R. A. M. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.29, n.1, p.11-7, 2011.

BORSELLIA, C.; STORRIEA, H.; BENESCH-LEEC, F.; SHVARTSMANA, D.; CEZARA, C.; LICHTMANE, J. W.; VANDENBURGH, H. H.; MOONEY, D. J.; Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. **PNAS**, Dec. 4, 2009.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, M.; LIMONGELLI, F. M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **British Medical Bulletin**; v.81 and 82: 209–230, 2007.

BUNN, J. R.; CANNING, J.; BURKE, G.; MUSHIPE, M.; MARSH, D. R.; LI, G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle—A biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. **Journal of Orthopaedic Research**, v.22, p. 1336-44, 2004.

CANTINI, M.; GIURISATO, E.; RADU, C.; TIOZZO, S.; PAMPINELLA, F., SENIGAGLIA, D.; ZANIOLO, G.; MAZZOLENI, F.; VITIELLO, L. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. **Journal of the Neurological Sciences**, v.23, p. 189–94, 2002

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiological Reviews**, v.84, p.209–38, 2004.

CRISCO, J. J.; JOKL, P.; HEINEN, G. T.; CONNELL, M. D.; PANJABI, M. M. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. **American Journal of Sports Medicine**, v.22, n.5, p.702-10, Sep-Oct. 1994.

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

GHALY, A.; MARSH, D. R. Ischaemia–reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. **International. Journal Experimental. Pathology**, v.91, p. 244–55, 2010.

KARANDE, T. S.; ONG J. L.; AGRAWAL, C. M. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. **Annals of Biomedical Engineering**, v.32, n.12, p.1728-43, Dec. 2004.

KASEMKIJWATTANA, C.; MENETREY, J.; SOMOGYI, G.; MORELAND, M. S.; FU, F. H.; BURANAPANITKIT, B.; WATKINS, S.C.; HUARD, J. Desevelopment of

approaches to improve the healing following muscle contusion. **Cell Transplantation**, v.7, n.6, p.585-98, 1998.

HAWKE, T.J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*, v. 91, p.534–55, 2001

HURME, T.; KALIMO, H.; SANDERBERG, M.; LEHTO, M.; VUORIO, E.; Localization of type I and III collagen and fibronectin formation of injured gastrocnemius muscle. **Laboratory Investigation**, v. 64, n. 1, p. 71-84, 1991.

ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources). **Guide for the Care and Use for Laboratory Animals**. National Academy Press: Washington, DC, USA, 1996.

JÄRVINEN, M.; SORVARI, T. Healing of a crush injury in rat striated muscle. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**. v.83, n.2, p.259-65, Mar. 1975.

JÄRVINEN, T., A., H.; KÄÄRIÄINEN, M.; JÄRVINEN, M.; KALIMO, H. Muscle strain injuries. **Current Opinion in Rheumatology**, v.12, p.155–161, 2000.

JÄRVINEN, T. A., H.; JÄRVINEN, T.; KÄÄRIÄINEN, M KALIMO, H. JÄRVINEN, M Muscle Injuries: Biology and Treatment. **American Journal of Sports Medicine**, v. 33, p.745–64, 2005.

LEHTO, M.; DUACE, V. C.; RESTALL, D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. **The Journal of Bone and Surgery**, 1985.

LI, Y.; FOSTER, W.; DEASY, B. M.; CHAN, Y.; PRISK, V.; TANG, Y.; Cummins, J.; Huard, J. Transforming Growth Factor-1 Induces the Differentiation of Myogenic Cells into Fibrotic Cells in Injured Skeletal Muscle. **American Journal of Pathology**, v.164, n.3, p.1007-19, Mar. 2004.

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

MCBRIER, N. M.; NEUBERGER, T.; OKITA,N.; WEBB, A.; SHARKEY, N. Reliability and validity of a novel muscle contusion device. **Journal of Athletic Training**, v.44, n.3, p.275–78, 2009.

MENETREY, J.; KASEMKIJWATTANA, C.; FU, F. H.; MORELAND, M. S.; HUARD, J. Suturing Versus Immobilization of a Muscle Laceration A Morphological and Functional Study in a Mouse Model. **The American Journal of Sports Medicine**, v.27, n.2, p.222-29 1999.

NAKAMURA, M.; OKADA, S.; TOYAMA, Y.; OKANO, H. Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v.28, n.3, p197-204, Jun. 2005.

NYKOLAOU, P. K.; MACDONALD, B. L.; GLISSON, R. R.; SEABER, A.V.; GARRET, W. E. Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury. **American Journal of Sports Medicine**, v.15, n.1, 1987.

PANOSKALTSIS, N.; MANTALARIS, A.; WU, J. H. Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.1, p.28-35, Jul. 2005.

PIECADE, M. C. B.; GALHARDO, M. S.; BATTLEHNER, C. N.; FERREIRA, M. A.; CALDINI, E. G.; DE TOLEDO, O. M. S. Effect of ultrasound therapy on the repair of Gastrocnemius muscle injury in rats. **Ultrasonics**, v.48, p.403–411, Mar 2008.

RIZZI, C. F.; MAURIZ, J. L.; CORREA, D. S. F.; MOREIRA, A. J.; ZETTLER, C. J.; FILIPPIN, L. I.; MARRONI, N. P.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- κ b signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.38, p.704–13, 2006.

RUSHTON, J.L.; DAVIES, I.; HORAN, M. A.; MAHON, M.; WILLIAMS, R. Production of consistent crush lesions of murine skeletal muscle in vivo using an electromechanical device. **Journal of Anatomy**, v.190, p.417-22, 1997.

SAITO, Y.; NONAKA, I. Initiation of satellite cell replication in bupivacaine-induced myonecrosis. **Acta Neuropathologica**; v.88, n.3, p.252-7, 1994.

SARI, Y.; NAKAGAMI, G.; KINOSHITA, A.; HUANG, L.; UEDA, K.; IIZAKA, S.; SANADA, H. SUGAMA, J. Changes in serum and exudates creatine phosphokinase concentrations as an indicator of deep tissue injury: a pilot study. **International Wound Journal**, v.5, p.674–80, 2008.

SATO, K.; LI, Y.; FOSTER, W.; FUKUSHIMA, K.; BADLANI, N.; ADACHI, N.; USAS, V.; FU, F. H.; HUARD, J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. **Muscle Nerve**, v. 28, p. 365–372, 2003.

SHEN, W.; LI, Y.; TANG, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. **The American Journal of Pathology**, v.167, n.4, p.1105-17, Oct. 2005.

TOLOSA, L.; MORLÁ, M.; IGLESIAS, A.; BUSQUETS, X.; LLADÓ, J.; OLMOS, G. IFN- γ prevents TNF- α -induced apoptosis in C2C12 myotubes through down-regulation of TNF-R2 and increased NF- κ B activity. **Cellular Signalling**, v.17, n.11, p.1333-1342, Nov. 2005.

TURNER, N. J.; BADYLAK, S. F. Regeneration of skeletal muscle. **Cell and Tissue Research**, Jun. 2011.

ULLMAN, M.; ULLMAN, A.; SOMMERLAND, H.; SKOTTNER, A.; OLDFORS, A. Effects of growth hormone on muscle regeneration and IGF-I concentration in old rats. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.140, p.521-25, 1990.

UTVÅG, S. E.; GRUNDNES, O.; RINDAL, D. B.; REIKERÅS, O. influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. **Journal of Orthopaedic Trauma** v. 17, n.6, p.430–35, 2003.

VIHKO, V.; SALMINEN, A.; RANTAMÄKI, J. Exhaustive exercise, endurance training, and acid hydrolase activity in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.47, n.43-50, 1979.

WINET, H. A bone fluid flow hypothesis for muscle pump-driven capillary filtration: II. Proposed role for exercise in erodible scaffold implant incorporation. **European Cells & Materials**, v.1, n.6, p.1-10; discussion 10-1, Oct. 2003.

ZACHAZEWSKI, J. E.; MAGEE, D. E., QUILLEN, W. S. **Athletic Injuries and Rehabilitation**. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1996.

BAPTISTA, J.; MARTINS, M. D.; PAVESI, V. C. S.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S. PINTO, D. S.; FERRARI, R. A. M. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.29, n.1, p.11-7, 2011.