

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DA MIOREGENERAÇÃO EM LESÃO EXPERIMENTAL DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATO TRATADO COM TERAPIA ULTRA-SÔNICA

1 Piedade, M. C.; 2 Ferreira, M.A.; 3 Battehner, C. N.; 4 Caldini, E. G.; 5 Toledo, O. M. S.

1, 5 Morfologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo, Brasil; 2, 3, 4 Patologia, Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, Brasil.

OBJETIVO

O uso terapêutico do ultra-som pulsado (USp) é frequente na reabilitação das lesões músculo-esqueléticas. Seu efeito estimulante na deposição de colágeno está demonstrado em lesões de ligamentos e tendões, porém seu efeito na reabilitação muscular ainda possui controvérsias, principalmente nas lesões por laceração. Face ao impacto dessa lesão em acidentes automobilísticos e domésticos, esta pesquisa avaliou a diferenciação mioblastica e a formação de tecido conjuntivo em um modelo de lesão muscular lacerativa.

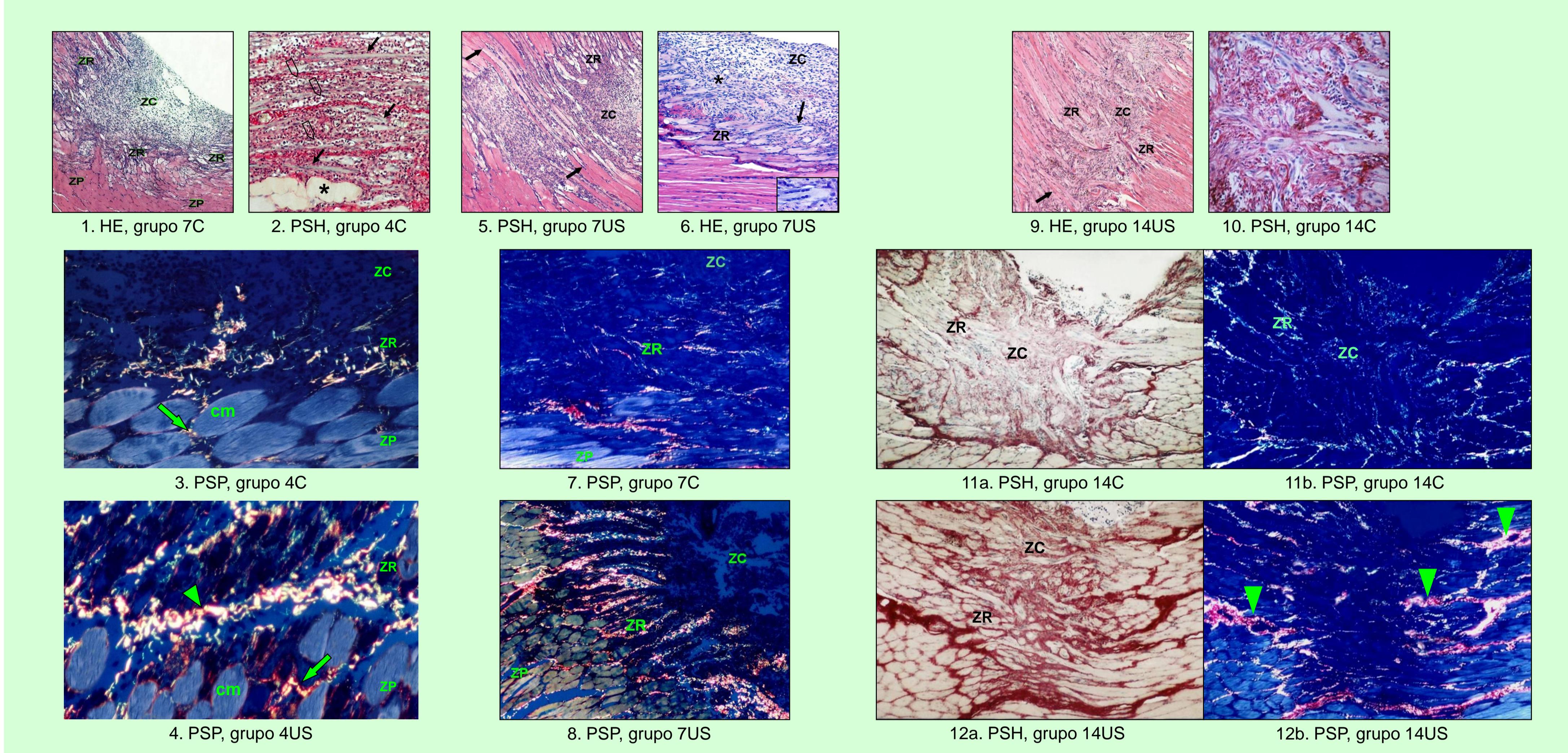
MATERIAL E MÉTODOS

Trinta ratos Wistar (peso=400g) sofreram secção transversal parcial do gastrocnêmio. O grupo tratado recebeu aplicações diárias (5 min.) de USp (50%, 1MHz, $i=0.57W/cm^2$), desde o 2º dia pós-lesão. O grupo controle não recebeu USp. A região de reparo foi analisada aos 4, 7 e 14 dias com HE, picrossírius-hematoxilina sob luz convencional-PSH e polarização-PSP (estudo do colágeno fibrilar) e imunohistoquímica para desmina (identificação de células da linhagem muscular). A área ocupada por miotubos e por fibras colagênicas foi obtida por métodos morfométricos.

RESULTADOS

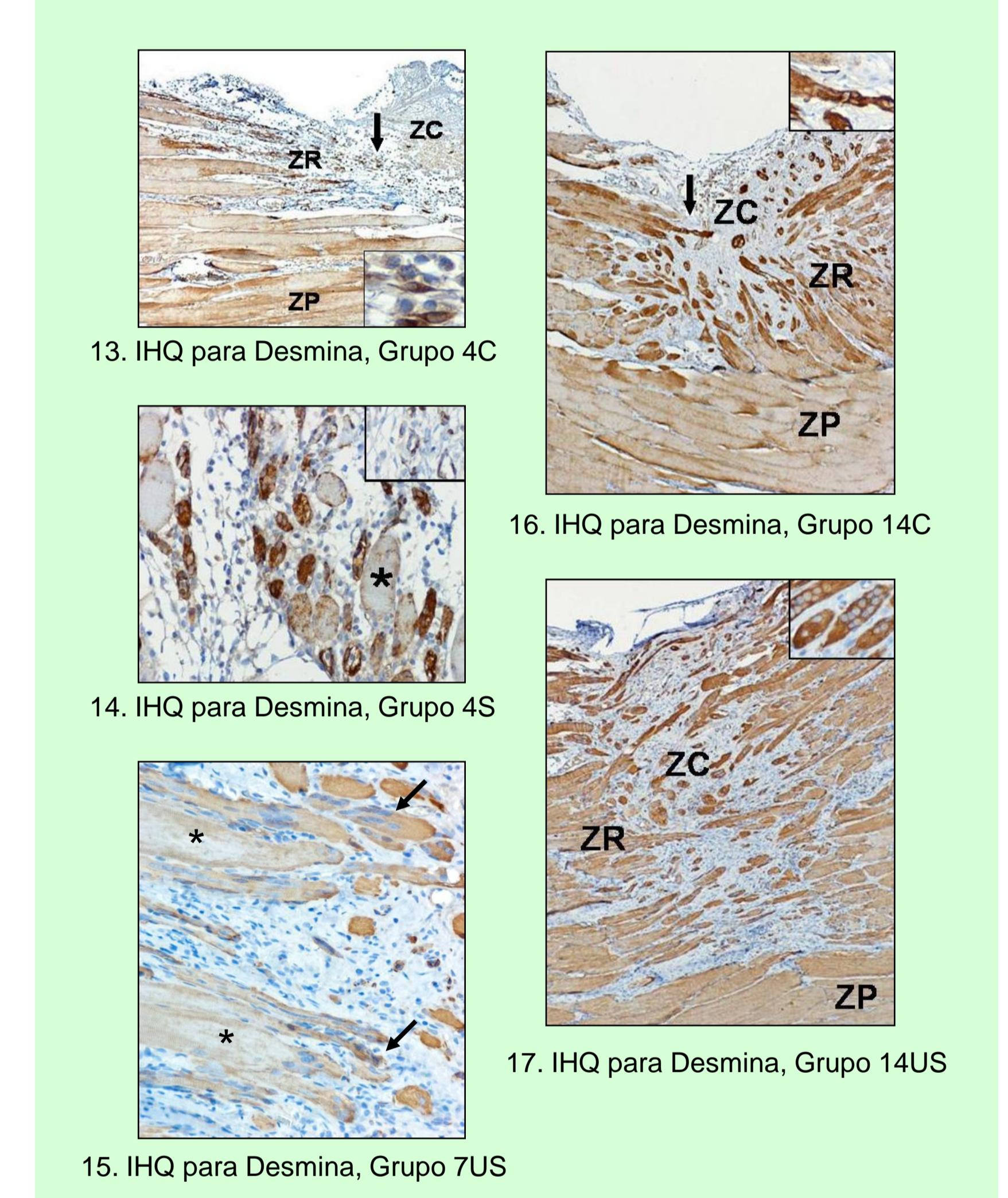
ESTUDO HISTOLÓGICO

ASPECTOS QUALITATIVOS DA ESTRUTURA TECIDUAL



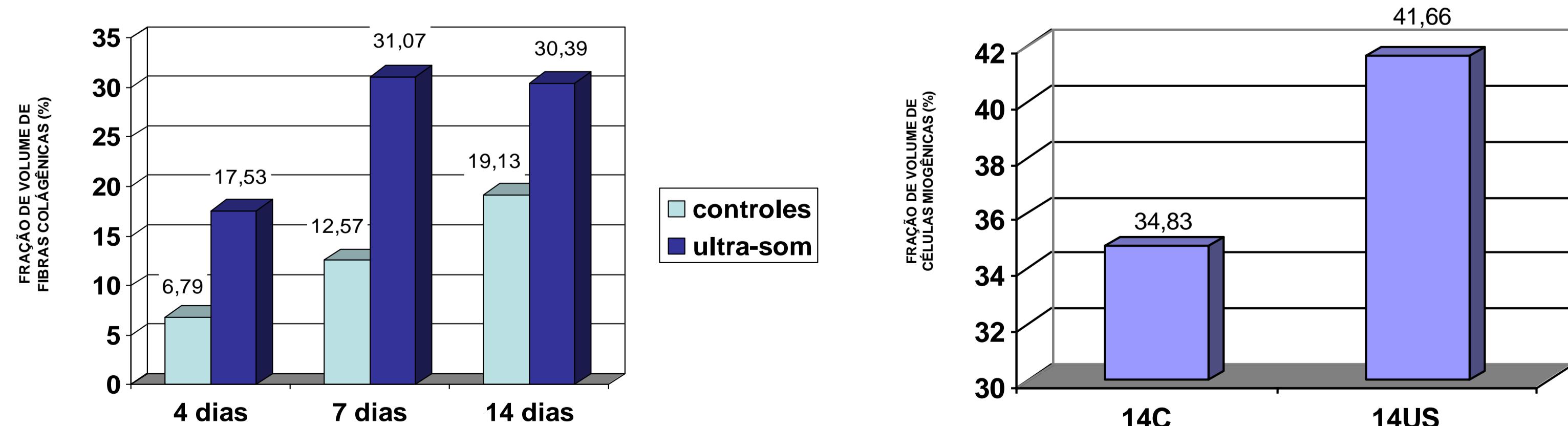
- Regiões do processo de reparo muscular: zona central (ZC), zona de regeneração (ZR) e zona preservada (ZP). 2. Vários miotubos (\rightarrow), célula muscular madura (\star), infiltrado inflamatório (\Rightarrow). Notar as fibras de colágeno (vermelho intenso) paralelas aos miotubos. 3. Células musculares (cm) na ZP, fibras colagênicas finas na ZR e no endomílio (\rightarrow). 4. Células musculares (cm) na ZP, fibras colagênicas grossas na ZR (*) e também no endomílio (\rightarrow).
- Tecido inflamatório na ZC, miotubos pouco corados na ZR, estando alguns em fusão com as células musculares remanescentes (\rightarrow). 6. Tecido conjuntivo muito celularizado (\star) e a seta mostra um miotubo com os núcleos enfileirados (inset). 7. Fibras de colágeno finas brilhando contra o fundo escuro em toda ZR. 8. Muitas fibras colagênicas mais grossas na ZR, próximo à ZP, afinando em direção à ZC, dispostas em paralelo aos miotubos.
- Tecido conjuntivo muito celularizado na ZC com miotubos atravessando a lesão (\rightarrow). 10. Vários miotubos envolvidos por matriz extracelular rica em fibras colagênicas finas (vermelho intenso). 11a. Fibras colagênicas em vermelho intenso e células musculares com citoplasma claro, formando um tecido desorganizado na ZC em contraste com a disposição das células musculares periféricas. 11b. Fibras colagênicas finas acompanhando a disposição das células na ZR. 12a. Grande quantidade de fibras colagênicas, porém o tecido se mostra mais organizado em relação à figura anterior. 12b. Fibras colagênicas mais grossas na ZR (*), afinando na ZC, acompanhando o eixo das células em regeneração.

ASPECTOS QUALITATIVOS DA REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DESMINA



- Células musculares marcadas em marrom na ZP, leve marcação na ZR e menor marcação na ZC, onde a seta indica células fusiformes, unicelulares, desmina-positivas caracterizando-se como mioblastos (inset).
- Vários miotubos jovens fortemente marcados, células musculares maduras (\star); notar paredes de vasos positivas para desmina (inset).
- Miotubos em vários graus de desenvolvimento (\rightarrow) e células musculares em processo de regeneração (*).
- Miotubos cortados em várias direções sugerindo desorganização tecidual; a seta indica a fusão de um miotubo a uma célula muscular sobrevenida (inset).
- ZC menor em relação à imagem anterior com vários miotubos atravessando-a com aspecto mais organizado. O inseto mostra miotubos jovens indicando diferenciação celular presente aos 14 dias de pós-lesão.

ANÁLISE MORFOMÉTRICA



CONCLUSÕES

- A aplicação do USp não comprometeu o processo natural de reparo do músculo estriado lacerado.
- A deposição de fibras colagênicas foi estimulada pelo USp sem comprometer a regeneração das células musculares, a qual também foi estimulada pelo USp.
- A orientação das fibras colagênicas e das células musculares em regeneração seguiu um padrão de distribuição mais parecido ao tecido normal adulto nas lesões tratadas com USp.
- Os métodos de identificação e morfométricos utilizados neste estudo permitiram a descrição quantitativa do processo de reparo muscular.

ABSTRACT

HISTOLOGICAL EVALUATION OF THE REPAIRING PROCESS OF AN EXPERIMENTAL LACERATIVE INJURY OF THE GASTROCNEMIUS MUSCLE IN RATS, AFTER PULSED ULTRASOUND THERAPY

The effect of the pulsed ultrasound therapy (PUT) in stimulating collagen deposition was demonstrated in lesions of ligaments and tendons. However, it has also been employed during repair of muscular injuries. This study assesses the myoblastic differentiation and the connective tissue formation in a controlled prospective experimental model of lacerative muscular lesion in male Wistar rats ($\approx 400g$) submitted to partial transversal section of the gastrocnemius muscle. One group ($n=15$) received daily applications of PUT (50%, 1MHz, $i = 0.57W/cm^2$) from the second post-operative day on (TG); the control group (CG; $n=15$) did not receive ultrasound treatment. The muscle was analyzed 4, 7 and 14 days after surgery through H&E, immunohistochemical marking for desmin (identification of muscle cell lineage) and the Picrosirius-polarization method (fibrillar collagen study). Morphometrical analysis determined the percentage area occupied by myotubes and of collagenous fibers. The lesions presented similar inflammatory responses in both treated and control groups. The area density of fibrillar collagen was larger in the TG at 4days post-surgery (mean $17.53 \pm 6.2 \times 6.79 \pm 1.3$; $p=0.0491$), 7 ($31.07 \pm 7.45 \times 12.57 \pm 3.6$; $p=0.0021$) and 14 days ($30.39 \pm 7.3 \times 19.13 \pm 3.51$; $p=0.0118$); the area density of myotubes was larger in the TG at 14 days after surgery ($41.66 \pm 2.97 \times 34.83 \pm 3.08$; $p=0.025$). Our data suggest that the therapy with pulsed ultrasound increases and/or accelerates the differentiation of cells of the muscular lineage, what would favor tissue regeneration. On the other hand, it is also suggested that there is a larger deposition of collagenous fibers, what could mean worse functional performance. However, the percentage of fibers seems to have stabilized at day 7 in TG and kept increasing in CG. Additional animals with a longer post-operative period will be analyzed in order to clarify this issues.

AGRADECIMENTOS COM SAUDADES
AO PROF. DR. OSWALDO ALVES MORA PELA ORIENTAÇÃO