

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NA REGENERAÇÃO
MUSCULAR E NA EXPRESSÃO DE FATORES MIOGÊNICOS EM
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATO APÓS LESÃO**

DAYANE APARECIDA MESQUITA ROCHA

**São Paulo, SP
2010**

DAYANE APARECIDA MESQUITA ROCHA

**EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NA REGENERAÇÃO
MUSCULAR E NA EXPRESSÃO DE FATORES MIOGÊNICOS EM
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATO APÓS LESÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho,
para obtenção do título de
Mestre em Ciências da
Reabilitação.

Orientadora: Profa. Dra. Manoela Domingues Martins
Co-orientadora: Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari

São Paulo, SP

2010

FICHA CATALOGRAFICA

Rocha, Dayane Aparecida Mesquita.

Efeito do ultrassom terapêutico na regeneração muscular e na expressão de fatores miogênicos em músculo esquelético de rato após lesão./ Dayane Aparecida Mesquita. 2010.

56 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho – UNINOVE – Ciências da Reabilitação, São Paulo, 2010.

Orientador (a): Profa. Dra. Manoela Domingues Martins

1. Músculo esquelético. 2. Ultrassom. 3. Remodelamento muscular. 4. Miogênese
- I. Martins, Manoela Domingues.

CDU 615.8

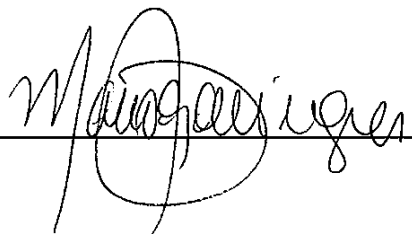
São Paulo, 16 de dezembro de 2010.

TERMO DE APROVAÇÃO

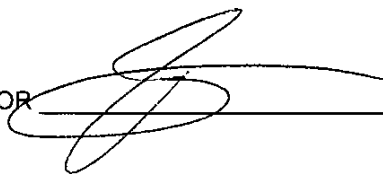
Aluna: DAYANE APARECIDA MESQUITA ROCHA

Título da Dissertação: "EFEITO DO ULTRASSON TERAPÊUTICO NA REGENERAÇÃO MUSCULAR E NA EXPRESSÃO DE FATORES MIOGÊNICOS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATO APÓS LESÃO".

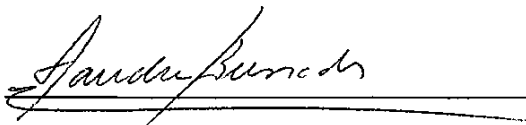
Presidente PROFA. DRA. MANOELA DOMINGUES MARTINS



Membro: PROF. DR. DÉCIO DOS SANTOS PINTO JUNIOR



Membro: PROFA. DRA. SANDRA KALIL BUSSADORI



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha filha Julia que veio fazer parte da minha vida num momento especial e com seu amor singelo e puro me fez entender que a vida é muito mais do que podemos imaginar, você é a luz do meu caminho e sem você a mamãe não teria conseguido.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que jamais me desamparou e que me dá forças para seguir em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais **Nadir e Alice**, pelo incentivo, carinho e amor que dedicaram a mim. Vocês me ensinaram a trilhar no caminho certo.

Ao meu marido **Vagner**, que foi muito mais que um companheiro, soube compreender com paciência minhas ausências e me deu força para nunca desistir.

À minha irmã **Jéssica**, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha querida orientadora **Profa. Dra. Manoela Domingues Martins**, por me ensinar a amar a pesquisa, pela minha trajetória acadêmica, você acreditou no meu potencial e com seu exemplo admirável me fez seguir confiante.

À **Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari**, profissional competente e admirável que me ajudou a nunca perder o foco.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Silva Junior** pela contribuição na preparação do PCR em tempo real que foi de extrema importância no trabalho.

Às **Profa. Dra Kristianne Porta Santos Fernandes e Profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori**, que nunca deixaram de me incentivar. Obrigada por tudo.

Ao **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, da Faculdade de Odontologia da USP, que foi essencial no desenvolvimento do trabalho, colaborando no aperfeiçoamento das técnicas utilizadas neste estudo.

À técnica do laboratório de pesquisa, **Tábata Oliveira** pela colaboração.

Aos **técnicos dos laboratórios** multidisciplinares da UNINOVE pela ajuda na realização dos experimentos.

À técnica do laboratório de Neurociência do ICB-USP, **Sra. Joelcimar Martins da Silva**, pela colaboração na utilização do criostato e pelas palavras de incentivo.

Aos meus colegas de mestrado, **Paulo Roberto Pestana e Roberto Piovesan**, pela amizade construída nesses dois anos. Obrigada por contribuir com meu crescimento profissional.

Aos alunos de iniciação científica **Agnello e Caio Sain Vallio**, pelo agradável convívio e pela ajuda na elaboração deste projeto.

Aos meus amigos inesquecíveis e insubstituíveis, **Luciana Rodrigues, Ester Cavalcante, Caren Dias, Vinicius Mayer, Patrícia Lattaro, Juliana Oliveira Curi e Felipe Sousa Rodrigues**, por me apoiar sempre. Saudades!

Aos **professores do programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação**, pelos ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Ferrari Correa** pela oportunidade.

Às secretárias do programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação, **Juliana Ribeiro e Camila Camarão Esteves**, pela atenção.

RESUMO

O ultrassom (US) tem sido utilizado para o tratamento clínico de uma série de condições inflamatórias músculo esqueléticas porém, sua eficácia ainda não está comprovada. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do US terapêutico na regeneração do músculo esquelético de rato após criolesão bem como, seu papel na expressão de RNAm de fatores miogênicos (MyoD e miogenina). Foram utilizados 100 ratos da linhagem wistar separados em grupo controle (n=10), grupo sham (n=10), grupo criolesionado sem tratamento (n=40) e criolesionado tratado com US (n=40). Nos grupos criolesionados a lesão foi realizada no músculo tibial anterior do lado esquerdo. Os animais do grupo criolesionado e US foram avaliados após 1, 7, 14 e 21 dias. Nos animais tratados os músculos foram submetidos a tratamento com US pulsado com intensidade de 1 MHz e intensidade de 0,8 W/cm², esfera do cabeçote de 3,5 cm, durante 1 minuto com aplicações diárias. O peso corpóreo dos animais foi obtidos em todos os tempos experimentais. Os músculos foram analisados morfológicamente pela coloração de hematoxilina & eosina. A expressão de fatores miogênicos (MyoD e miogenina) foi avaliada por PCR em tempo real. A análise morfológica e semi-quantitativa do edema, processo inflamatório, mionecrose e presença de novas fibras mostrou que o tratamento com US promoveu redução do quadro inflamatório agudo após 1 dia de injúria porém, não modificou as demais fases do reparo muscular. Além disso, o US não alterou a expressão de RNAm de MyoD e miogenina em todos os períodos e grupos experimentais avaliados. Conclui-se que o US pulsado nas condições avaliadas não acelerou o processo de regeneração muscular e não interferiu na expressão de fatores miogênicos relacionado com a proliferação (MyoD) e diferenciação (miogenina) das células satélites. Entretanto, este recurso terapêutico se mostrou eficiente na modulação do quadro inflamatório agudo em músculo esquelético de rato após criolesão.

Palavra-chave: Músculo esquelético; Ultrassom; Reparo muscular; Miogênese

ABSTRACT

Ultrasound has been used for the clinical treatment of a number of inflammatory musculoskeletal conditions, but its efficacy has not yet been proven. The aim of the present study was to assess the effect of therapeutic ultrasound on the regeneration of rat skeletal muscle following cryoinjury and determine its role in the expression of myogenic factors (MyoD and myogenin). One hundred Wistar rats were separated into a control group (n=10), sham group (n=10), cryoinjured group without treatment (n=40) and cryoinjured group treated with ultrasound (n=40). In the groups with cryoinjury, the injury was performed on the left tibialis anterior muscle. Among the treated animals, the muscles were submitted to daily one-minute applications of pulse ultrasound at a frequency of 1 MHz and intensity of 0.8 W/cm². The animals in the cryoinjury and ultrasound groups were assessed after one, seven, 14 and 21 days. Body weight was determined in all evaluation periods. The muscles were morphologically analyzed using hematoxylin-eosin staining. The expression of myogenic factors (MyoD and myogenin) was determined using real-time PCR. The morphological and semi-quantitative analysis of edema, inflammatory process, myonecrosis and the presence of new fibers revealed that treatment with ultrasound promoted a reduction in the acute inflammatory process on Day 1 following injury, but did not affect the other phases of muscle repair. Ultrasound did not alter the expression of mRNA of MyoD or myogenin in any evaluation period. In conclusion, pulsed ultrasound did not accelerate the muscle regeneration process or affect the expression of proteins involved in myogenesis under the conditions analyzed. However, ultrasound proved effective in modulating the acute inflammatory process in rat skeletal muscle following cryoinjury.

KEYWORD: Skeletal muscle; Ultrasound; Muscle repair; Myogenesis.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. CONTEXTUALIZAÇÃO | 15 |
| 2. ESTUDO: "Efeito do ultrassom terapêutico na regeneração e na expressão de fatores miogênicos em músculo esquelético de rato após lesão." | 19 |
| Resumo | 20 |
| Introdução | 22 |
| Material e Método | 24 |
| Resultados | 29 |
| Discussão | 36 |
| Conclusão | 40 |
| Referências bibliográficas | 41 |
| 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 47 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 48 |
| ANEXOS..... | 51 |

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Análise das variáveis morfológicas no grupo criolesionado e US ao longo de todos os tempos experimentais.....32

Tabela 2. A análise comparativa das variáveis morfológicas entre o grupo criolesionado e o grupo US fixando o tempo.....34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo experimental de aplicação do US. (a) aparelho de US com esfera do cabeçote de 3,5 cm e luva estéril contendo água para ser utilizada como interface de aplicação. (b) momento da aplicação do US com interface utilizando água.....26

Figura 2. Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por hematoxilina & eosina. (a) Músculo controle exibindo morfologia normal (aumento original, 400x). (b) Área criolesionada após 1 dia (aumento original, 400x). Nota-se a presença de mionecrose (*) e infiltrado inflamatório (setas). (c) Área criolesionada tratada com US após 1 dia mostrando menor grau de mionecrose (*), infiltrado inflamatório e edema. (aumento original, 400x). (d) Após 7 dias a área criolesionada e tratada com US demonstra diminuição do edema, do infiltrado inflamatório e fusão de miotubos (setas) formando fibras novas (aumento original, 200x). (e) Aos 14 dias observa-se células musculares regeneradas porém imaturas cortadas (seta) (aumento original, 400x). (f) Aos 21 dias nota-se células musculares maduras, maiores, de aspecto poligonal (aumento original, 400x).....31

Figura 3. Análise de RNAm de miogenina nos grupos experimentais estudados.....35

Figura 4. Análise de RNAm de MyoD nos grupos experimentais estudados.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Amplitude

bHLH - Basic helix-loop-helix

β (TGF- β) - Fator de crescimento transformador

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal)

cm - Centímetro

CaCl – Cloreto de cálcio

Cdna - DNA complementar

CT - Treshold cycle

DNase – Enzima capaz de digerir DNA genômico

DEPC - Dimetil pirocarbonato

dNTPs - Desorribonucleotídeo trifosfatado

EDTA – Thylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

FRP - Frequência de repetição de pulso

f - Frequência de onda

GDF – Miostatina

GAPDH) - Expressão de gene constitutivo

(HE) - Hematoxilina e Eosina

(ICLAS) - International Council of Laboratory Animal Science

KHz - kilohertz

MEC - Matriz extracelular

MRF - Fatores regulatórios miogênicos

MyoD - Fator miogênico

Myf-5 - Myogenic factor 5

MRF4 - Myogenic regulatory factor 4

MMPs - Metaloproteinase de matriz extracelular

Mg – Miligramas

MHz – Megahertz

ml- Mililitros

Nm - Milimolar

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

NaN₃ – Trinitrogeneto de sódio (azida de sódio)

Nm – Nanômetros

P – Potência

p- Significância

PCR - Reação em cadeia da polimerase

T – Período

RNA_m - Ácido ribonucléico

RT - Transcrição - Reversa

SDS – PAGE – Sodium dodecyl sulfate polycrylamide gel electrophoresis

TA – Tibial anterior

µm – Micrômetros

µg – Microgramas

US – Ultrassom

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Os músculos esqueléticos representam cerca de 40 a 45% do peso corpóreo total e são essenciais para o movimento do corpo, respiração e manutenção da postura. Esse tecido é dinâmico e pode alterar suas características fenotípicas, proporcionando uma melhor adaptação funcional frente a estímulos variados. Sendo que, após o nascimento, a massa muscular e o fenótipo são determinados, em parte, por influências e sinais ambientais ^{1,2}.

Devido a várias situações como lesões em atletas, atrofias por desuso, transplantes, distrofias musculares, existe considerável interesse na regeneração do músculo esquelético ³.

O processo de reparo muscular pode ser dividido em fases que se interconectam denominadas de degeneração, inflamação, regeneração, formação de fibrose e remodelamento. Na primeira e segunda fase pode ser observada a formação de hematoma, necrose tecidual, degeneração e resposta inflamatória que ocorre nos primeiros dias após a agressão. Na terceira nota-se fagocitose do tecido degenerado, regeneração das fibras musculares, produção tecidual e crescimento vascular. Esta por sua vez, ocorre por volta de 7 a 10 dias, com pico máximo na 2^a semana diminuindo na 3^a semana. Na última fase de fibrose e remodelamento ocorrem os processos de maturação das fibras regeneradas e reorganização tecidual. Ao longo de todas estas etapas existe uma íntima relação entre as células e destas com a matriz extracelular resultando na sinalização de modificações qualitativas e quantitativas na expressão de genes envolvidos na miogênese ^{4,5}.

Após a agressão tecidual, ocorre o processo de formação de novas fibras musculares, este processo é descrito como miogênese, que se caracteriza em uma cascata complexa de eventos, incluindo proliferação e a diferenciação das células precursoras ou mioblastos, que se fusionam para formar os miotubos primários e secundários e a subsequente maturação para formar fibras musculares funcionais ³. Durante esse processo de miogênese as células conhecidas como células satélites tem um papel fundamental no remodelamento muscular, pois são elas as responsáveis pela formação de

novas fibras musculares ^{3,6}.

Todas as etapas da miogênese estão associadas à expressão de proteínas específicas envolvidas principalmente na organização do aparato contrátil do músculo que estão sob um controle genético restrito, mas podem sofrer alterações a partir de estímulos internos (fatores de crescimento) e externos (ações terapêuticas, treinamento físico) ⁶. Paralelamente as modificações dos seus componentes celulares, os músculos em situações de remodelamento, exibem modificações nos componentes de sua matriz extracelular (MEC) e nas enzimas que degradam esta matriz, conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMPs) ^{7,8,9,10}.

Com interesse em desenvolver recursos que acelerem o processo de remodelamento muscular, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos, um dos recursos bioestimulantes mais utilizados com esse objetivo no tecido muscular esquelético é a eletroterapia com ultrassom (US). Entretanto, ainda são escassas e, por, vezes contraditórias, as evidências científicas para que se possa determinar com segurança os parâmetros dosimétricos e metodológicos necessários à aquisição de seus objetivos ¹¹.

O US terapêutico é utilizado na área de saúde desde o final da década de 40 e, dependendo da frequência das ondas, é utilizado para o diagnóstico por imagem, cura terapêutica ou destruição tecidual ^{12,13}. Trata-se de um dos recursos mais utilizados pela fisioterapia para o tratamento das mais variadas lesões músculo esqueléticas agudas e crônicas ^{14,15}. As ondas ultrassônicas são descritas como aquelas que ultrapassam o limite da capacidade humana audível ¹⁶. A energia do sinal do US é absorvida, propagada ou refletida, dependendo de sua frequência.

Os efeitos do ultrassom dependem dos seus parâmetros de aplicação, a quantidade de energia que irá alcançar um local específico, estará relacionado com as características do US, ou seja com a frequência, modo que a onda será gerada, intensidade, amplitude, foco e uniformidade do feixe, influenciando diretamente na produção de efeitos térmicos e não térmicos. Além disso, a impedância acústica, que é regida pela densidade dos tecidos que receberão, também estão diretamente

relacionadas com a penetração da onda ultrassônica e conseqüentemente com os efeitos gerados ¹¹.

O equipamento de US, possuem ondas sonoras, comumente entre uma freqüência de 1 e 3 MHz, essa onda é propagada e viaja através dos tecidos, sendo absorvida. Freqüências altas de 3 MHz, são de rápida absorção, específicas para tratamento de tecidos superficiais, e freqüências baixas de 1 MHz, penetram mais facilmente e são empregadas para tratamento de tecidos mais profundos ¹⁷.

As ondas do US, podem ser geradas de dois modos, contínuo e pulsado, sendo a interrupção de energia a diferença entre eles. No modo contínuo não ocorre interrupção de energia, havendo, portanto depósito de energia nos tecidos, já no modo pulsado ocorre a interrupção freqüente de energia, sendo considerado nesse modo a freqüência de onda (f) e a freqüência de repetição de pulso (FRP). ^{18,19}.

A onda ultrassônica é produzida em um cristal piezelétrico e seu potencial de irradiação de energia é determinado pela intensidade, que é transmitida pelo transdutor. A dosagem de onda que cada tecido receberá, pode variar de acordo com a amplitude de onda e da intensidade estabelecidas no US, na grande parte dos estudos clínicos, observamos que a intensidade varia de 0,5 a 3 W/cm² e de modo geral os efeitos do US, tem sido relatados em intensidade baixas e no modo pulsado de aplicação. ^{20, 21,22}.

No que diz respeito aos seus efeitos térmicos (aquecimento) e não térmicos, sabemos que à medida que a onda ultrapassa os tecidos gera conseqüências, como, por exemplo, o potencial de membrana celular é alterado, fazendo com que ela fique mais permeável a vários íons, como cálcio e sódio, produzindo assim excitação celular, melhorando sua atividade. Quando aplicado no tecido na fase inflamatória pós lesão, seu efeito geral é o de facilitar a cascata inflamatória, agindo como mediador pró inflamatório ou até mesmo pró proliferativo ²³.

Quando aplicado na fase de reparo tecidual ele é capaz de estimular as células ativas e maximiza a atividade e a qualidade cicatricial, fazendo uma

cicatriz mais funcional, sua movimentação molecular, também gera calor no local, provocando vasodilatação e melhor aporte sanguíneo ^{24,25,26} .

Apesar de muitos efeitos benéficos já atribuídos ao uso do US, na fase de reparo tecidual, encontramos na literatura autores que obtiveram resultados contraditórios com relação ao seu uso na regeneração do músculo esquelético. Como por exemplo a ausência na produção de efeitos morfométricos no tecido muscular ²⁷; ausência de alteração de massa muscular, número de núcleos por fibra, área de secção transversa e das proteínas contráteis ²⁸; não houve influência na massa muscular, concentração de proteínas totais, número de núcleos por fibra, e área de secção transversa ²⁹ ; não houve efeitos benéficos significantes na morfologia da regeneração muscular ³⁰ .

Buscamos neste trabalho preencher uma lacuna no conhecimento dos efeitos do US terapêutico pulsado sobre os fatores miogênese e no processo de regeneração muscular, para assim, contribuir na compreensão do efeito biológico deste recurso terapêutico e auxiliar no estabelecimento de padrões dosimétricos de seu uso clínico em tecidos musculares.

2. ESTUDO

2.1. Artigo - Efeito do ultra-som terapêutico na regeneração e na expressão de fatores miogênicos em músculo esquelético de rato após lesão.

Effect of therapeutic ultrasound on muscle regeneration and expression of mRNA of myogenic factors in rat skeletal muscle following injury

Dayane Aparecida Mesquita Rocha¹, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari¹, José Antonio da Silva Jr ¹, Sandra Kalil Bussadori¹, Kristianne Porta Santos Fernandes¹, Manoela Domingues Martins².

¹ Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho – UNINOVE

² Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS

Endereço para contato: *Manoela Domingues Martins, Rua Vergueiro, 235 Liberdade, São Paulo-SP, Brasil, 11-63973621

e-mail: manomartins@gmail.com

RESUMO

O ultrassom (US) tem sido utilizado para o tratamento clínico de uma série de condições inflamatórias músculo esqueléticas porém, sua eficácia ainda não está comprovada. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do US terapêutico na regeneração do músculo esquelético de rato após criolesão bem como, seu papel na expressão de RNAm de fatores miogênicos (MyoD e miogenina). Foram utilizados 100 ratos da linhagem wistar separados em grupo controle (n=10), grupo sham (n=10), grupo criolesionado sem tratamento (n=40) e criolesionado tratado com US (n=40). Nos grupos criolesionados a lesão foi realizada no músculo tibial anterior do lado esquerdo. Os animais do grupo criolesionado e US foram avaliados após 1, 7, 14 e 21 dias. Nos animais tratados os músculos foram submetidos a tratamento com US pulsado com intensidade de 1 MHz e intensidade de 0,8 W/cm², esfera do cabeçote de 3,5 cm, durante 1 minuto com aplicações diárias. O peso corpóreo dos animais foi obtidos em todos os tempos experimentais. Os músculos foram analisados morfológicamente pela coloração de hematoxilina & eosina. A expressão de fatores miogênicos (MyoD e miogenina) foi avaliada por PCR em tempo real. A análise morfológica e semi-quantitativa do edema, processo inflamatório, mionecrose e presença de novas fibras mostrou que o tratamento com US promoveu redução do quadro inflamatório agudo após 1 dia de injúria porém, não modificou as demais fases do reparo muscular. Além disso, o US não alterou a expressão de RNAm de MyoD e miogenina em todos os períodos e grupos experimentais avaliados. Conclui-se que o US pulsado nas condições avaliadas não acelerou o processo de regeneração muscular e não interferiu na expressão de fatores miogênicos relacionado com a proliferação (MyoD) e diferenciação (miogenina) das células satélites. Entretanto, este recurso terapêutico se mostrou eficiente na modulação do quadro inflamatório agudo em músculo esquelético de rato após criolesão.

Palavra-chave: Músculo esquelético, Ultrassom, Reparo muscular, Miogênese

ABSTRACT

Ultrasound has been used for the clinical treatment of a number of inflammatory musculoskeletal conditions, but its efficacy has not yet been proven. The aim of the present study was to assess the effect of therapeutic ultrasound on the regeneration rat skeletal muscle following cryoinjury and determine its role in the expression of myogenic factors (MyoD and myogenin). One hundred Wistar rats were separated into a control group (n=10), sham group (n=10), cryoinjured group without treatment (n=40) and cryoinjured group treated with ultrasound (n=40). In the groups with cryoinjury, the injury was performed on the left tibialis anterior muscle. Among the treated animals, the muscles were submitted to daily one-minute applications of pulse ultrasound at a frequency of 1 MHz and intensity of 0.8 W/cm². The animals in the cryoinjury and ultrasound groups were assessed after one, seven, 14 and 21 days. Body weight was determined in all evaluation periods. The muscles were morphologically analyzed using hematoxylin-eosin staining. The expression of myogenic factors (MyoD and myogenin) was determined using real-time PCR. The morphological and semi-quantitative analysis of edema, inflammatory process, myonecrosis and the presence of new fibers revealed that treatment with ultrasound promoted a reduction in the acute inflammatory process on Day 1 following injury, but did not affect the other phases of muscle repair. Ultrasound did not alter the expression of mRNA of MyoD or myogenin in any evaluation period. In conclusion, pulsed ultrasound did not accelerate the muscle regeneration process or affect the expression of proteins involved in myogenesis under the conditions analyzed. However, ultrasound proved effective in modulating the acute inflammatory process in rat skeletal muscle following cryoinjury.

KEYWORD: Skeletal muscle, Ultrasound, Muscle repair, Myogenesis.

INTRODUÇÃO

O músculo esquelético possui uma grande capacidade de se reparar, em resposta a injúria, que pode ser causada, por atividade física, doenças miodegenerativas e genéticas. Este reparo muscular representa um processo complexo, que ocorre em várias etapas interconectadas (degeneração, inflamação, regeneração, formação de fibrose e remodelamento) e que envolvem a ativação de diferentes tipos de células, além da ação coordenada entre a degradação e síntese da matriz extracelular (MEC) com o objetivo de restabelecer a estrutura e função do tecido muscular ¹.

Dentre as células que participam do remodelamento muscular, as células satélites são amplamente estudadas visto que, são as responsáveis pela formação das novas fibras musculares após agressão tecidual. Este fenômeno descrito como miogênese, se caracteriza por uma cascata complexa de eventos incluindo proliferação e a diferenciação das células precursoras ou mioblastos, que se fusionam para formar os miotubos primários e secundários e a subsequente maturação para formar fibras musculares funcionais ². Todas as etapas da miogênese estão associadas à expressão de proteínas específicas envolvidas principalmente na organização do aparato contrátil do músculo que estão sob um controle genético restrito mas podem sofrer alterações a partir de estímulos internos (fatores de crescimento) e externos (ações terapêuticas, treinamento físico) ³.

As proteínas envolvidas na formação e remodelamento do músculo esquelético estão associadas a uma família de fatores de transcrição, como MRF (fatores regulatórios miogênicos) que pertencem à superfamília de fatores de transcrição bHLH (basic helix-loop-helix) ⁴. A família MRF consiste de MyoD (Myf-3), Myf-5, miogenina (Myf-1) e MRF4 (Myf-6/Herculin). MyoD e o Myf-5 são os fatores primários e agem na fases iniciais da miogênese atuando na determinação miogênica, enquanto a miogenina e o MRF4 agem mais tardiamente, sendo considerados fatores de diferenciação ^{5,6}.

No músculo normal células satélites são normalmente quiescentes e expressam marcadores como Pax-7+, CD34 e M-caderina ⁷, porém não expressam níveis detectáveis de MRFs. Análise da expressão gênica de

células satélites individuais ativadas, mostraram inicialmente a expressão de Myf-5 ou MyoD, seguida da coexpressão desses marcadores durante a fase proliferativa com o surgimento da identificação de miogenina e MRF-4 na fase de diferenciação terminal ^{4,5,6,7}. Desta forma tem sido evidenciado que a expressão de miogenina ocorre tardiamente durante a fusão e diferenciação sendo então, a miogenina considerada um marcador do início da diferenciação das fibras musculares desempenhando um papel crucial nos processos de plasticidade, adaptação e reabilitação em músculo adulto ⁷.

O ultrassom (US) tem sido utilizado terapêuticamente por mais de 50 anos e atualmente é uma das modalidades eletro terapêuticas mais largamente e freqüentemente empregada ^{9,10,11}, porém, existe uma gama de perguntas com relação a sua correta parametrização. Assim sendo, seu potencial terapêutico ainda está longe de ser totalmente estabelecido, sendo que novas aplicações são regularmente adicionadas ao seu repertório ¹². Dentre as indicações deste recurso estão: tratamento de fraturas ósseas, cicatrização de úlceras, recuperação de lesões de ligamento, de amputações, de lesões musculares, e de cápsulas articulares inflamadas ou danificadas, trombólise, entre outras ^{13,14}.

O US terapêutico pode ser definido como uma onda ou pressão sonora com freqüência acima do limite humano, 16 KHz ¹². Clinicamente o US tem sido usado em intensidades que variam de 0,5 a 3 W/cm² sendo que dosagens de 1,5 a 2 W/cm², não têm se mostrado eficientes, podendo inclusive ser menos efetivas do que as baixas dosagens ^{11,15,16,17,18}.

Com o intuito de estudar o efeito de recursos terapêuticos na reabilitação de lesões musculares, vários modelos experimentais em animais foram desenvolvidos tais como: criolesão, miotoxina, contusão, eletroestimulação, exercício físico, desnervação, desvascularização que apresentam características próprias de resposta tecidual ^{19,20,21,22}. Entretanto, existem lacunas no conhecimento no que diz respeito ao efeito biológico US nos diferentes modelos de lesão muscular. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso do US terapêutico na regeneração do músculo

esquelético de rato após criolesão bem como, seu papel na expressão de fatores miogênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste estudo foi elaborada atendendo às resoluções 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNINOVE (protocolo AN004/2009 - anexol). O protocolo experimental utilizado neste estudo seguiu os princípios de ética e experimentação animal, elaborados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS) com base nas normas internacionais, que visa o aprimoramento de condutas na experimentação animal baseando-se em três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência.

Animais

Foram utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia da linhagem Wistar) machos, com 8 semanas de vida, pesando entre 250 e 300g mantidas no biotério da UNINOVE- Unidade Vergueiro. Os animais foram mantidos em caixa plásticas apropriadas, temperatura ambiente (25°C) e luminosidade controlados com ciclo de 12 horas sendo que os animais receberam comida e água *ad libitum*. Os animais foram alimentados antes e durante o período experimental com ração sólida e água *ad libitum*.

Grupos Experimentais

Os animais foram separados em 4 grupos:

Grupo Controle (n=10): músculo tibial anterior (TA) direito sem procedimento cirúrgico e sem criolesão.

Grupo Sham (n=10): músculo TA esquerdo submetido apenas ao procedimento cirúrgico.

Grupo Criolesionado (n=40): músculo TA esquerdo submetido a procedimento cirúrgico e criolesão.

Grupo US (n=40): músculo TA esquerdo submetido ao procedimento cirúrgico e criolesão, tratado com US.

Os animais do grupo criolesionado e US foram avaliados após 1 dia (n=10), 7 dias (n=10), 14 dias (n=10) e 21 dias (n=10).

Protocolo Experimental

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados após os animais terem sido anestesiados com injeção intramuscular de anestésico geral injetável a base de Ketamina (Dopalen) e de Xilazina (Anasedan). Para aplicação foram utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado. Cada animal foi anestesiado utilizando-se uma mistura de ketamina (0,2 ml/100 gramas do animal) e de xylazina (0,1 ml/100 gramas do animal), a técnica de aplicação foi a intramuscular. O modelo de criolesão que está de acordo com o descrito por Miyabara *et al* (2005)²³. O músculo TA foi exposto cirurgicamente e a criolesão foi realizada por meio de duas aplicações (duração de 10 segundos cada), utilizando bastão metálico de extremidade plana, previamente resfriado em nitrogênio líquido, diretamente na musculatura. O bastão metálico utilizado no músculo foi de 0.4 x 0.4 cm e de 0.4 x 1 cm. Após o procedimento foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida (6,0) e os animais foram mantidos em gaiolas com aquecimento para prevenir a hipotermia.

Nos animais do grupo US os músculos foram submetidos a tratamento diário com US terapêutico Sonomaster Microcontrolled Communicator (marca KW Eletrônica, Amparo, SP/Brasil), utilizando como interface para aplicação a água (120ml) contida em luva estéril (Figura 1), no modo pulsado a 20%, em frequência de 1MHz, intensidade de 0,8 W/cm², esfera do cabeçote de 3,5 cm, durante 1 minuto^{24,25,26,27,28,29,30}.

Os animais foram pesados antes da realização da lesão e nos dias de sacrifício de cada grupo. O sacrifício foi realizado com overdose de anestésico.



Figura 1. Modelo experimental de aplicação do US. (a) aparelho de US com esfera do cabeçote de 3,5 cm e luva estéril contendo água para ser utilizada como interface de aplicação. (b) momento da aplicação do US com interface utilizando água.

Análise Morfológica

Para análise histopatológica 5 espécimes de cada grupo foram imediatamente resfriados em isopentano por 10 segundos e congelados a seguir em nitrogênio líquido. Esses materiais foram armazenados em freezer -70° C. Os músculos congelados foram cortados em secções transversais de 10 µm de espessura em criostato (Leica CM3050, Nussloch, Alemanha) e estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma, Chemical CO, St Louis, MO/USA). Para análise morfológica foi utilizada a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e os cortes histológicos foram avaliados por microscopia de luz (microscópio Axioplan 2 Zeiss).

A análise qualitativa e semiquantitativa das lâminas foram realizadas em microscopia de luz convencional por um examinador previamente calibrado. A análise qualitativa dos cortes histológicos corados em HE compreendeu a descrição das etapas do remodelamento tecidual envolvendo a presença e o tipo de infiltrado inflamatório, edema, necrose, fibras novas e imaturas. A análise semiquantitativa consistiu na graduação dos componentes teciduais descritos acima em: ausente (grau 0), discreto (grau 1), moderado (grau 2) e intenso (grau 3) de acordo com Walker, 2006³¹.

Extração de RNA total

Para análise por PCR em tempo real 5 espécimes de cada grupo foram imediatamente colocadas em eppendorf contendo 1ml de "TRIzol" e posteriormente armazenados em freezer -70° C. Foram utilizados 80-100mg do músculo removido para extração de RNA total. O tecido foi homogenizado em reagente TRIzol (Invitrogen) e o isolamento do RNA total foi obtido seguindo as orientações do fabricante. Para verificação do sucesso do procedimento de extração, as amostras de RNA total foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%.

O RNA total foi quantificado por espectrometria em 260nm e todas as amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen) para evitar contaminação com DNA genômico. Todas as soluções utilizadas para os procedimentos

descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC (Dimetil pirocarbonato) e, além disso, os materiais plásticos e vidraria também receberam tratamento contra RNase.

Síntese de cDNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo

Para análise da expressão gênica foi utilizada a síntese de cDNA e o PCR em tempo real. A transcrição reversa (RT) foi realizada em uma reação de 200 µl, na presença de 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3mM MgCl₂, 10 ditiotreitól mM, 0,5 mM dNTPs e 50ng de primers aleatórios com 200 unidades de Moloney murino transcriptase reversa do vírus da leucemia (Invitrogen). As reações foram mantidas em condições de 20 ° C por 10 min, 42 ° C por 45 min e 95 ° C por 5 minutos. Um microlitro da reação do RT foi utilizada para realização do PCR em tempo real.

A PCR em tempo real foi realizada utilizando o kit SYBRGreen (Applied Biosystems, E.U.A.) em 7000 Sequence Detection System (ABI Prism, da Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições utilizadas foram 50°C por 2min, 95°C por 10 min., seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada ponto de dados. A abundância de MyoD e miogenina RNAm foi quantificada como um valor relativo em comparação com a expressão de gene constitutivo (GAPDH).

Os primers utilizados para a reação de PCR em tempo real foram: GAPDH (GenBank™ número de acesso NM 017008) senso 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC -3' e anti-senso GCCCCACGGCCATCA -3'; MyoD senso 5' GGA GAC ATC CTC AAG CGA TGC e anti-senso AGC ACC TGG TAA ATC GGA TTG (produto de amplificação: 80pb); Miogenina - senso 5'ACTACCCACCGTCCATTAC- 3' e anti-senso 3'TCGGGGCACTCACTGTCTCT 5' (produto 233) .

Os valores quantitativos para RNAm de MyoD, miogenina e GAPDH foram obtidos a partir do número de ciclos (CT – treshold cycle), em que há aumento do sinal associado a um crescimento exponencial dos produtos de PCR.

As curvas de fusão foram geradas no final de cada corrida para garantir a uniformidade do produto. O nível de expressão relativa do gene alvo foi normalizado com base na expressão GAPDH como controle endógeno. ΔCt valores das amostras foram determinados subtraindo o valor médio de Ct MyoD/miogenina RNAm Ct do valor médio da GAPDH de controle interno. Como é raro usar ΔCt como dados relativos devido a esta característica logarítmica, o parâmetro $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizada para expressar os dados de expressão relativa.

Análise estatística

A análise comparativa do peso inicial e final nos diversos momentos e grupos foi feita aplicando-se o teste t-Student pareados. A comparação das diferenças entre os escores de acordo com o grupo e o período experimental na análise semiquantitativa e no PCR foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. A comparação das variáveis morfológicas entre crio e US foi feita no tempo aplicando o teste de Mann-Whitney.

Em todas as análises os resultados foram considerados significantes quando $p < 0.05$. Todas as análises foram feitas no programa GraphPad Prism, v.5.0.

RESULTADOS

Peso dos animais

Durante todo o período experimental, os animais apresentaram aspecto saudável, sem manifestação de distúrbios locomotores. A análise do peso inicial dos animais mostrou que o mesmo não diferiu nos diferentes momentos sendo considerados homogêneos.

Os animais do grupo controle e do grupo sham não mostraram diferença entre o peso inicial e final ($p=0,7489$). No grupo criolesionado após 1 dia os animais exibiram redução significativa de peso ($p= 0,0249$). Após 7 dias os animais exibiram ganho de peso porém, esta não se mostrou estatisticamente

significante ($p=0,0560$). Com o passar do tempo houve aumento significativo peso aos 14 dias ($p=0,0240$) e 21 dias ($p=0,0061$).

O grupo US não demonstrou alteração de peso após 1 dia ($p=0,9238$). Entretanto, os animais mostraram perda significativa de peso após 7 dias ($p=0,0254$), 14 dias ($p<0,0001$) e 21 dias ($p=0,0020$).

Análise Morfológica

Qualitativa

A análise morfológica qualitativa permitiu verificar que os músculos do grupo controle apresentaram aspecto histológico normal com presença de fibras com núcleos periféricos, sem sinais de lesão ou processo inflamatório (Figura 2a).

O grupo sham mostrou discreto infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, poucas células musculares degeneradas (mionecrose) e focos de edema situados em região superficial.

O grupo criolesionado após 1 dia mostrou intenso edema entre as fibras musculares, moderado infiltrado inflamatório com neutrófilos e macrófagos dispersos por entre as fibras (Figura 2b). Estas por sua vez, apresentavam-se em grande parte necróticas (mionecrose). Neste mesmo período experimental os espécimes do grupo US mostraram edema e infiltrado inflamatório em menor proporção quando comparados ao grupo criolesionado. Assim como, a área de mionecrose foi menos evidente (Figura 2c). Após 7 dias, em ambos os grupos, criolesionado e US, notou-se redução do processo inflamatório, escassa mionecrose e o surgimento de inúmeras fibras musculares novas e imaturas (Figura 2d). Após 14 dias, no grupo criolesionado e US, o edema e o infiltrado inflamatório eram escassos, e notava-se moderada presença de células musculares com núcleo centralizado cortadas (separadas) indicando renovação tecidual (Figura 2e). Aos 21 dias ambos os grupos exibiram tecido muscular com aspecto morfológico normal evidenciando o reparo (regeneração) completo sem sinais inflamatórios e raras células com núcleo centralizado (Figura 2f).

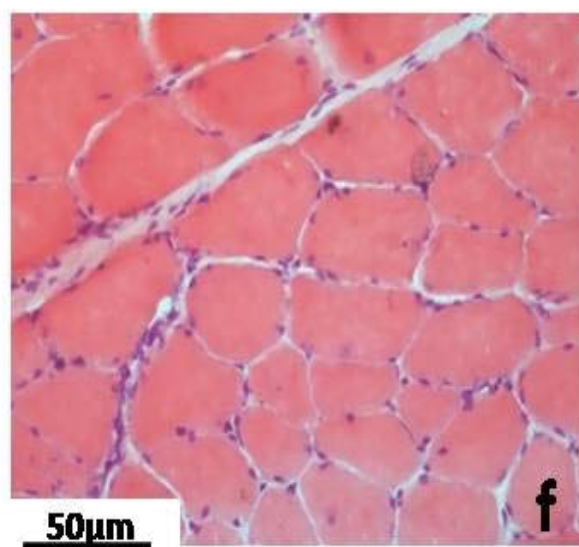
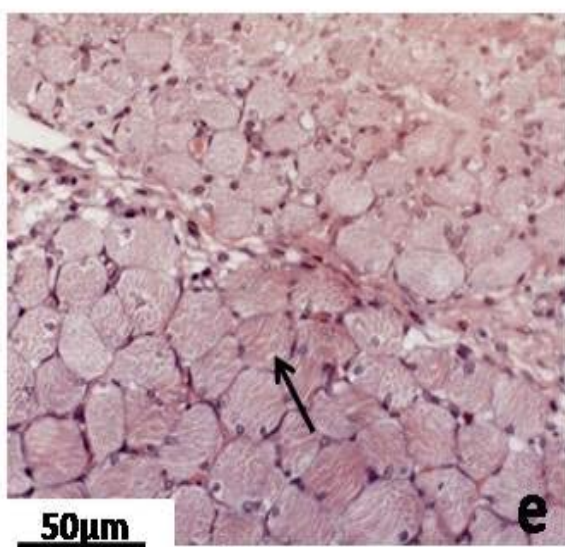
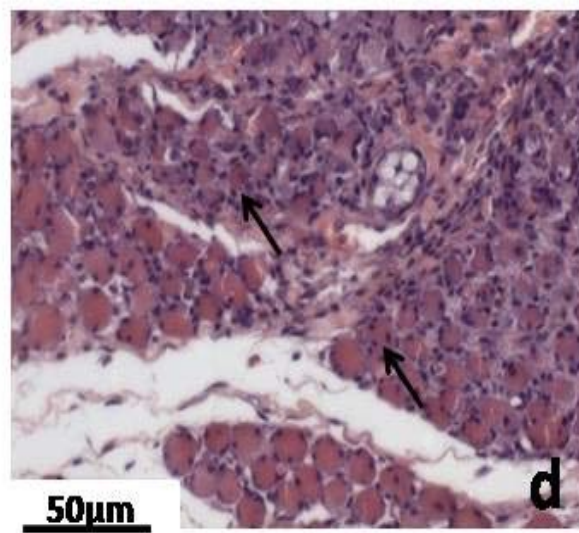
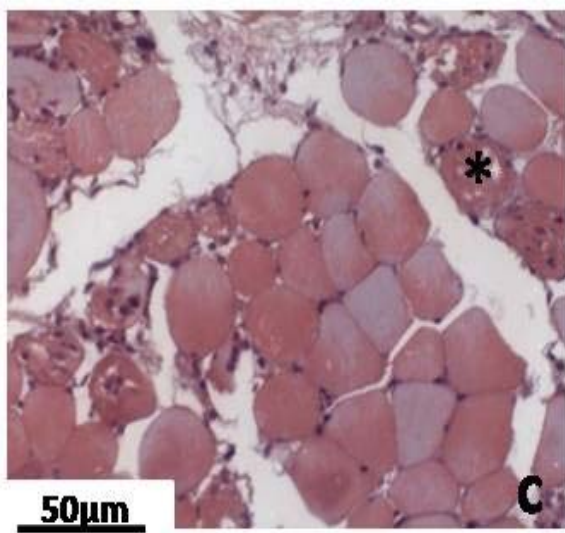
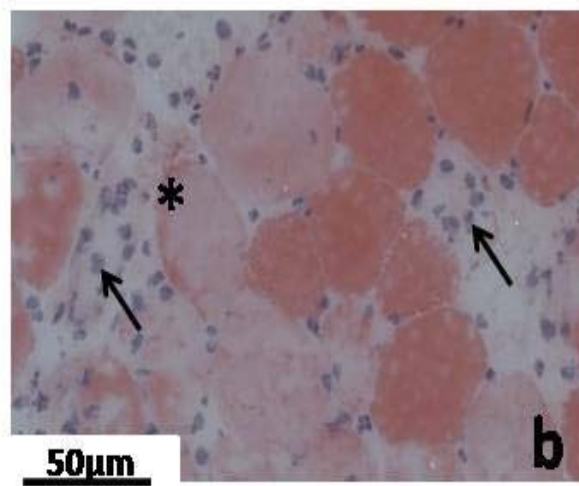
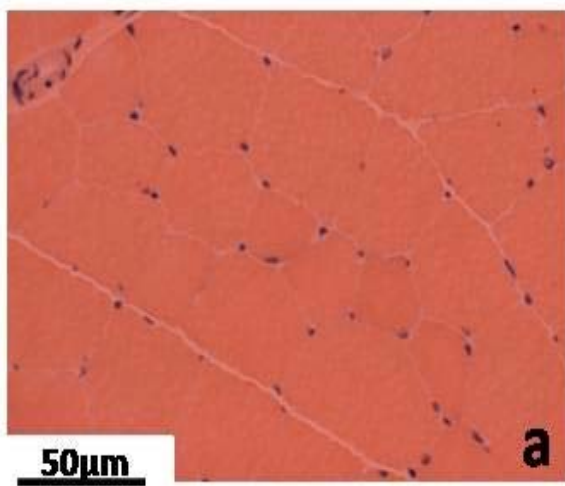


Figura 2. Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por hematoxilina & eosina. (a) Músculo controle exibindo morfologia normal (aumento original, 400x). (b) Área criolesionada após 1 dia (aumento original, 400x). Nota-se a presença de mionecrose (*) e infiltrado inflamatório (setas). (c) Área criolesionada tratada com US após 1 dia mostrando menor grau de mionecrose (*), infiltrado inflamatório e edema. (aumento original, 400x). (d) Após 7 dias a área criolesionada e tratada com US demonstra diminuição do edema, do infiltrado inflamatório e fusão de miotubos (setas) formando fibras novas (aumento original, 200x). (e) Aos 14 dias observa-se células musculares regeneradas porém imaturas cortadas (seta) (aumento original, 400x). (f) Aos 21 dias nota-se células musculares maduras, maiores, de aspecto poligonal (aumento original, 400x).

Semi-quantitativa

A análise semiquantitativa das variáveis edema, mionecrose, infiltrado inflamatório e fibras novas ao longo dos quatro períodos experimentais com grupos independentes está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1. Análise das variáveis morfológicas no grupo criolesionado e US ao longo de todos os tempos experimentais.

| Variável | | Estatística KW | p-valor |
|--------------|---------------|----------------|---------|
| Edema | Criolesionado | 9,706 | 0,0212* |
| | US | 6,587 | 0,0863 |
| Mionecrose | Criolesionado | 9,553 | 0,0228* |
| | US | 11,00 | 0,0117* |
| Infiltrado | Criolesionado | 10,43 | 0,0153* |
| Inflamatório | US | 11,00 | 0,0117* |
| FN | Criolesionado | 11,00 | 0,0117* |
| | US | 7,907 | 0,0480* |

*diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Edema

A análise estatística do edema no grupo criolesionado e no grupo US de forma individual, ao longo dos períodos experimentais, mostrou que houve diferença significativa apenas no grupo criolesionado ($p=0,0212$) sendo esta identificada de forma significativa entre o 1º e 21º dia do experimento. A análise comparativa entre o grupo criolesionado e o grupo US em cada tempo experimental revelou que o grupo criolesionado apresentou escores maiores de edema especialmente no 1º dia após a criolesão, porém esta não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,0808$) (Tabela 2).

Mionecrose

Na avaliação isolada do item mionecrose pode-se observar diferença significativa em ambos os grupos ao longo dos períodos experimentais Tabela 1. No grupo criolesionado estas diferenças foram detectadas entre o 1º e 14º dia e 1º e 21º. No grupo US apesar de ter sido detectada diferença significativa entre os tempos, não foi possível obter diferenças entre eles, devido aos graus obtidos serem iguais. Quando comparado o grupo criolesionado com o grupo US notou-se que o grupo tratado com US mostrou mionecrose reduzida de forma significativa apenas no 1º dia ($p=0,0339$)(Tabela 2).

Infiltrado inflamatório

O infiltrado inflamatório mostrou diferença significativa no grupo criolesionado ($p=0,0153$) e no grupo US ($p=0,0117$) ao longo do experimento. No grupo criolesionado apesar de ter sido detectada diferença significativa entre os tempos, não foi possível observar em quais períodos houve essa diferença, devido aos graus obtidos serem iguais. No grupo US foi encontrada diferença significativa entre o 1º e 14º dia e 1º e 21º dia. Quando comparado o grupo criolesionado com o grupo US notou-se que o grupo tratado mostrou infiltrado inflamatório reduzido de forma significativa após 1 dia ($p=0,0253$) (Tabela 2).

Fibras musculares novas e imaturas

A análise das fibras novas mostrou que houve diferença significativa entre os tempos para o grupo criolesionado ($p=0,0117$) e para o US ($p=0,0480$). Em ambos os grupos esta diferença foi detectada entre o 1º e 7º dia. Quando comparado o grupo criolesionado com o grupo US nenhuma diferença estatisticamente significativa foi evidenciada em todos os tempos (Tabela 2).

Tabela 2: A análise comparativa das variáveis morfológicas entre o grupo criolesionado e o grupo US fixando o tempo.

| Variável | Comparação | Estatística de MW | p-valor |
|--------------|-------------------|-------------------|---------|
| Edema | Crio1 x crioUS1 | 0,5 | 0,0808 |
| | Crio7 x crioUS7 | 3,0 | 0,6546 |
| | Crio14 x crioUS14 | 3,0 | 0,6546 |
| | Crio21 x crioUS21 | 4,5 | 1,0000 |
| Mionecrose | Crio1 x crioUS1 | 0,0 | 0,0339* |
| | Crio7 x crioUS7 | 3,0 | 0,5127 |
| | Crio14 x crioUS14 | 4,5 | 1,0000 |
| | Crio21 x crioUS21 | 4,5 | 1,0000 |
| Infiltrado | Crio1 x crioUS1 | 0,0 | 0,0253* |
| Inflamatório | Crio7 x crioUS7 | 4,5 | 1,0000 |
| | Crio14 x crioUS14 | 3,0 | 0,6546 |
| | Crio21 x crioUS21 | 4,5 | 1,0000 |
| FN | Crio1 x crioUS1 | 4,5 | 1,0000 |
| | Crio7 x crioUS7 | 1,5 | 0,1904 |
| | Crio14 x crioUS14 | 1,5 | 0,1904 |
| | Crio21 x crioUS21 | 4,5 | 1,0000 |

Expressão de RNAm de MyoD e Miogenina

A Figura 3 mostra a expressão de MyoD em todos os grupos e períodos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de MYoD entre o grupo controle e todos os outros grupos experimentais. Assim como, não houve diferença entre o grupo criolesionado e o US nos diferentes períodos avaliados.

A análise individualizada da MyoD ao longo do tempo mostrou que não houve diferença nos valores do grupo criolesionado ($p=0,3312$) e no grupo US ($p=0,2320$). Assim como, não houve diferença na análise comparativa entre o grupo criolesionado e US nos períodos de 1,7,14 e 21 dias.

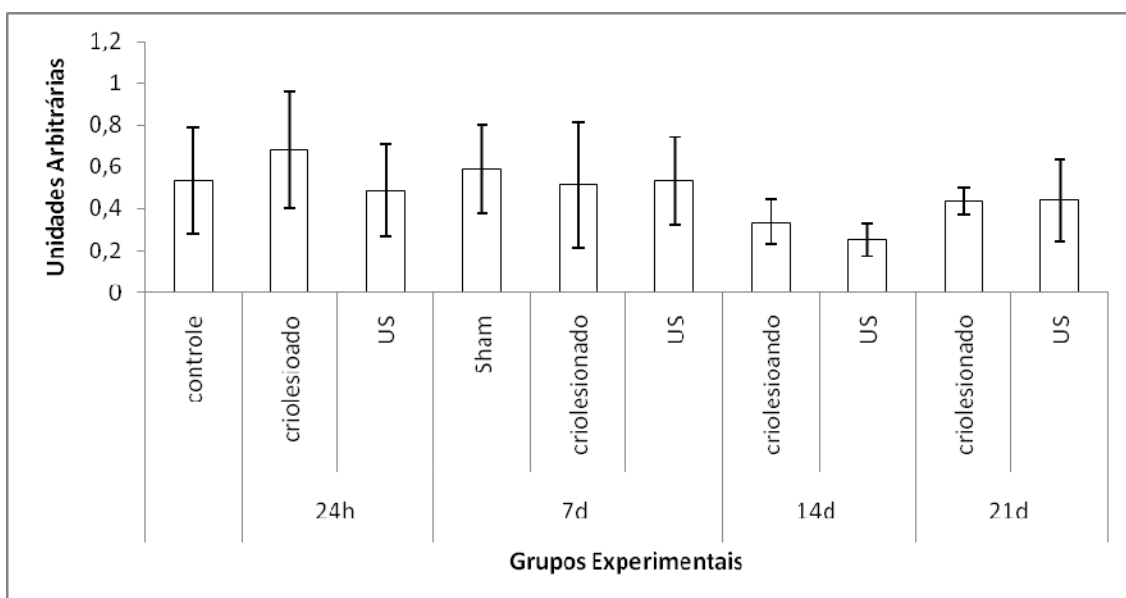


Figura 3. Análise de RNAm de MyoD nos grupos experimentais estudados

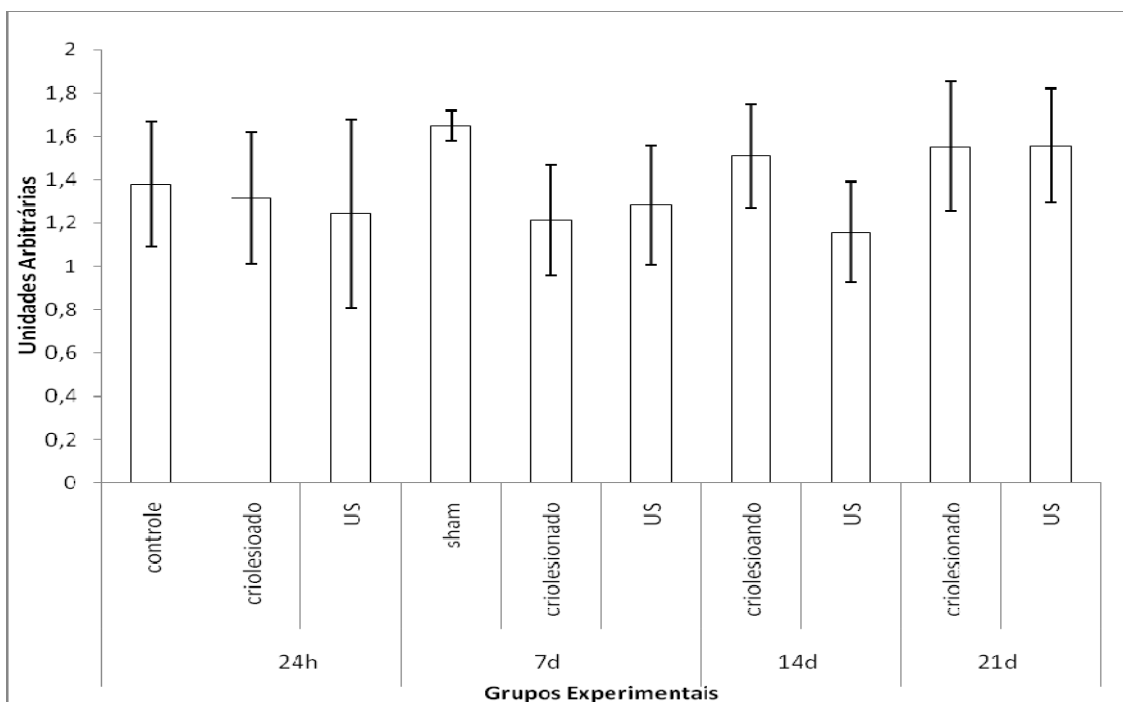


Figura 4. Análise de RNAm de miogenina nos grupos experimentais estudados.

A Figura 4 mostra a expressão de miogenina em todos os grupos e períodos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de miogenina entre o grupo controle com todos os outros grupos experimentais.

A análise individualizada da miogenina ao longo do tempo mostrou que não houve diferença nos valores do grupo criolesionado ($p=0,5008$) e no grupo US ($p=0,3312$). Assim como, não houve diferença na análise comparativa entre o grupo criolesionado e US nos períodos de 1, 7, 14 e 21 dias.

Discussão

O tecido muscular pode sofrer lesão frente a diferentes estímulos, porém responde de forma semelhante por meio de um processo de reparo altamente organizado que visa restabelecer morfofuncionalmente o tecido^{1,2,32}. Vários recursos e modalidades terapêuticas vem sendo empregados para tentar proporcionar um processo de reparo muscular de melhor qualidade e menor duração^{33,34}. Dentre esses, o US terapêutico vem sendo cada vez mais utilizado porém, estudos mostram resultados controversos sobre sua ação no

tecido muscular^{30,35,36,37,38}. Assim sendo, objetivamos neste estudo determinar se o tratamento com US é capaz de acelerar o processo de reparo e modificar a expressão gênica de proteínas envolvidas na miogênese em um modelo animal de trauma agudo por criolesão.

Nossos resultados demonstraram que o US terapêutico, nas condições estudadas, não acelerou o processo de regeneração muscular e não interferiu na expressão de proteínas envolvidas na miogênese. Entretanto, este recurso terapêutico se mostrou eficiente na modulação do quadro inflamatório que se estabeleceu nas primeiras 24 horas após a injúria.

O processo de reparo muscular pode ser dividido em fases que se interconectam denominadas de degeneração, inflamação, regeneração, formação de fibrose e remodelamento. Na primeira e segunda fase pode ser observado a formação de hematoma, necrose tecidual, degeneração e resposta inflamatória que ocorre nos primeiros dias após a agressão. Na terceira nota-se fagocitose do tecido degenerado, regeneração das fibras musculares, produção tecidual e crescimento vascular. Esta por sua vez, ocorre por volta de 7 a 10 dias, com pico máximo na 2^a semana diminuindo na 3^a semana. Na última fase de fibrose e remodelamento ocorrem os processos de maturação das fibras regeneradas e reorganização tecidual. Ao longo de todas estas etapas existe uma íntima relação entre as células e destas com a matriz extracelular resultando na sinalização de modificações qualitativas e quantitativas na expressão de genes envolvidos na miogênese^{39,40,41}. Em nosso estudo, todas as fases do reparo muscular foram claramente observadas e, tanto no grupo criolesionado como no tratado com US, elas ocorreram dentro do prazo esperado, que culminou com o reparo aos 21 dias. Porém o US não modificou temporalmente o reparo do músculo esquelético. Este resultado está de acordo com outros autores que também não observaram melhora no reparo muscular com este recurso terapêutico^{30,35,36,37,38}. Entretanto, alguns trabalhos vem relatando efeitos positivos do US acelerando o remodelamento muscular^{25,26,29,42}.

O US é um dos recursos mais utilizados pela fisioterapia para o tratamento de vários tipos de lesões músculo esqueléticas agudas e crônicas

^{9,43}. Alguns trabalhos sugerem que o US possui ação pró inflamatória, ou seja, acelera a resposta inflamatória do processo de reparação, promovendo a liberação de histamina, macrófagos e monócitos, além de incrementar a síntese de fibroblastos e colágeno ^{9,44,45,46,43}

Entretanto, outros estudos clínicos e experimentais vem demonstrando uma ação antiinflamatória para o US tendo em vista que promove a diminuição do edema e dor ^{42,47}.

As comparações entre os diversos trabalhos se tornam difícil, pois, muitas vezes, há variação ou omissão na descrição dos parâmetros utilizados no tratamento com US ^{9,26,27,36,37,48,49}. Assim sendo, existe um consenso na literatura da necessidade de se estabelecer parâmetros dosimétricos para aplicação deste recurso.

O presente estudo optou por utilizar o US terapêutico com modo de emissão pulsado A 20%, pois este preveni efeitos de reflexão e danos térmicos além de, ser a forma de emissão mais utilizada na prática clínica em fisioterapia ^{14,50}. Utilizou-se o US com ondas de baixa frequência (1MHz) tendo em vista que, esta proporciona maior profundidade de penetração em torno de 3 a 5 cm sendo indicado para lesões profundas ^{24,25,26,27,28,30,48}. A intensidade utilizada foi baixa (0,8 W/cm²) para evitar aquecimento local, já que este provoca efeitos deletérios teciduais ^{27,30,36,51}. Quanto ao tempo de tratamento diversos estudos sobre US terapêutico utilizaram tempos de aplicação que vão de 5 minutos ^{26,27,36,37}, 6 minutos. ⁴⁸, até 15 minutos ⁴⁹, para diminuir a possibilidade de aquecimento do tecido optamos por um tempo de 1 minuto, que sabe-se que é capaz de gerar efeitos na celularidade do tecido alvo.

Na análise morfológica qualitativa e semiquantitativa do edema, da mionecrose, do infiltrado inflamatório e das fibras musculares buscou-se estabelecer parâmetros para melhor analisar o reparo tecidual. A comparação destes quesitos, entre o grupo criolesionado e o criolesionado tratado com US, mostrou que o US reduziu o edema, infiltrado inflamatório e a miconecrose após 1 dia da injúria porém não interferiu na miogênese. Estes dados eram esperados visto que, algumas evidências da literatura apontam para um papel bioestimulador e antiinflamatório do US, em especial, na fase aguda do

processo inflamatório. Nestes estudos após a terapia com US houve diminuição do edema ^{44,52,53}, indicando uma redução da inflamação aguda (formação do exsudato inflamatório) ou uma aceleração da sua resolução ⁵⁴. Também vem sendo descrito que o US diminui quadros de dor ^{24,42}, e este efeito justifica-se pela própria diminuição do edema que comprime terminações nervosas locais e é fonte de mediadores químicos inflamatórios oriundos do plasma e das células exsudadas. Portanto, quando há redução de edema conseqüentemente há diminuição da dor.

A avaliação da fase mais tardia do reparo muscular neste estudo mostrou que o US não interferiu na miogênese, pois os resultados entre o grupo tratado com US não diferiu do grupo criolesionado no que diz respeito a produção de novas fibras e expressão de fatores miogênicos. O US não demonstrou atuar como estimulador da proliferação de células satélites tendo em vista a não modificação do RNAm de MyoD assim como, não modificou a diferenciação dos miotubos pela expressão de miogenina. Os dados obtidos da expressão dos genes envolvidos na miogênese estão de acordo com os achados morfológicos que demonstraram não haver diferença entre os grupos quanto ao padrão de formação de fibras novas e remodelamento final do músculo.

O processo de miogênese envolve a proliferação e a diferenciação das células precursoras ou mioblastos, que se fusionam para formar os miotubos primários e secundários e a subsequente maturação para formar fibras musculares funcionais ². Neste momento os genes dos mioblastos iniciam sua expressão músculo específica e as células, a partir daí, perdem a capacidade de se dividir e as fibras musculares passam a crescer quase que somente em volume (hipertrofia). O processo de miogênese é controlado por vários genes regulatórios dentre eles o MyoD e a miogenina. A análise da expressão gênica na miogênese tem demonstrado que a MyoD é considerada um marcador da proliferação das células musculares (início da miogênese), enquanto que a expressão de miogenina ocorre tardiamente durante a fusão e diferenciação dos miotubos ambos desempenhando um papel crucial nos processos de plasticidade, adaptação e reabilitação em músculo adulto ⁸.

A ação do US no estímulo da miogênese parece controversa visto que, alguns trabalhos tem demonstrado que o US aumenta a proliferação e diferenciação de células satélites em modelo experimental de lesão muscular^{38,55}. No entanto, outros autores que também utilizaram modelo experimental animal e de cultura de células musculares foram incapazes de demonstrar melhora na regeneração muscular ou da proliferação de mioblastos com o uso do US corroborando os achados do nosso estudo^{36,37}. Essas controvérsias ressaltam a falta de evidência científica sobre a eficácia do US na reparação muscular^{26,56}. Os efeitos biológicos do US dependem de vários fatores tais como intensidade, tempo de exposição, estrutura espacial e temporal do campo ultrassônico e estado fisiológico do objeto. Este grande número de variáveis dificulta a compreensão exata do mecanismo de ação do US na interação com os tecidos biológicos⁵⁷.

CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que o US pulsado nas condições avaliadas não acelerou o processo de regeneração muscular e não interferiu na expressão de proteínas envolvidas na miogênese. Entretanto, este recurso terapêutico se mostrou eficiente na modulação do quadro inflamatório agudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldspink G. Molecular mechanisms involved in the determination of muscle fibre mass and phenotype. *Adv. Exerc. Sports Physiol* 1999; 5, 27-39.
2. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *J Histochem cytochem* 2002; 50: 589-610.
3. Muntoni F, Brown S, Sewry C, Patel K. Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord.* 2002 Jun;12(5):438-46.
4. Chargè SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209–238.
5. Ekaza JD, Gérard C. Myostatin regulation of development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental Cell Research*, Volume 312, Issue 13, 1 August 2006, Pages 2401-2414.
6. Kook SH, Choi KC, Son YO, Lee KY, Hwang IH, Lee HJ, Chang JS, Choi IH, Lee JC. Satellite cells isolated from adult Hanwoo muscle can proliferate and differentiate into myoblasts and adipose-like cells. *Mol Cells.* 2006 Oct 31;22(2):239-45.
7. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA. and Beauchamp, J. R. (2006b). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Sci.* 119, 1824-1832.
8. Schierholt AS, Fonseca I, Silva PV, Paiva SR, Chaves LCS, Lopes OS, Faria DA, Guimarães SEF. Análise filogenética do gene da miogenina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.1, p.156-162, 2008.
9. Franco AD, Pereira LE, Groschitz M, Aimbire F, Martins RABL, Carvalho RA. Análise do efeito do ultra-som no edema inflamatório agudo – estudo experimental. *Rev Fisioterapia em Movimento*, Curitiba 2005; 18(2): 19-24.
10. Koeke PU. Estudo comparativo da eficácia da fonoforese, do ultra-som terapêutico e da aplicação tópica de hidrocortizona no tratamento do tendão de rato em processo de reparo tecidual. [dissertação de

- mestrado] São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. 2003.
11. Warden SJ, McMeeken JM. Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound Med Biol.* 2002; 28:1075-1080.
 12. Fernandes BL. Efeito do Ultrassom contínuo sobre o processo de regeneração do tecido conjuntivo de ratos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2010.
 13. Warden SJ, Fuchs RK, Kessler CK, Avin KG, Cardinal RE, Stewart RL. Ultrasound Produced by a Conventional Therapeutic Ultrasound Unit Accelerates Fracture Repair. *Physical Therapy.* 2006; 86(8): 1118-27.
 14. Carvalho PTC, Silva IS, Reis FA, Belchior ACG, Aydos RD, Facco GG, Dourado DM. Histological study of tendon healing in malnourished wistar rats treated with ultrasound therapy. *Acta Cir Bras* 2006;21(4):13-17.
 15. Cheng GA, Beverly C, Pong WW, Fujiwara T. Therapeutic ultrasound: Rate of usage, knowledge of use, and opinions on dosimetry. *Physiotherapy Singapore* 1999; 2(2): 69-83.
 16. Blume K, Matsuo E, Lopes MS, Lopes LG. Dosimetria proposta para o tratamento por ultra-som – uma revisão de literatura. *Fisioterapia em Movimento.* 2005; 18(3):55-64.
 17. Campanelli F. Efeitos da radiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade sobre o mal perfurante plantar (MMP), manifestação cutânea decorrente da hanseníase [dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo; 2004.
 18. Bassoli AD. Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica [dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2001.
 19. Rucavado A, Escalante T, Teixeira CF, Fernandes CM, Diaz C, Gutierrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators Inflamm.* 2002 Apr;11(2):121-8.

20. Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestril R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Apr;290(4):C1128-38
21. Koskinen SOA, Wang W, Ahtikoski AM, Kjaer M, Han XY, Komulainen J, Kovanen V & Takala TES. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R1292–R1300.
22. Zhao J, Zhang Y, Zhao W, Wu Y, Pan J, Bauman WA, Cardozo C. Md1 effects of nandrolone on denervation atrophy depend upon time after nerve transection. *Muscle Nerve* 2008; 37: 42–49, 2008.
23. Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Moriscot AS. Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. *Cell Tissue Res*. 2005a;319(3):479-89.
24. Okita M, Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Yoshimura T. Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle. *Ultrasound Med Biol*. 2009;35(2):237-44.
25. Matheus JPC, Oliveira FB, Gomide LB, Milani JGPO, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. *Rev Bras Fisioter*. 2008;12(3):241-7.
26. Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, Toledo OMS. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics* 2008; 48: 403–411.
27. Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil*, 2002; 83:1-4.
28. Menezes DF, Volpon JB, Shimano AC. Aplicação do ultra-som terapêutico em lesão muscular experimental aguda. *Rev Bras Fisioter*. 1999;4:27-31.
29. Gouvêa CMCP, Vieira PMN, Amaral AC. Efeito do ultra-som na recuperação de músculo tibial anterior de rato lesado. *Rev Univ Alfenas*. 1998;4:165-73.

30. Craig JÁ, Bradley J, Walsh DM, Baxter GD, Allen JM. Delayed onset muscle soreness: lack of effect of therapeutic ultrasound in humans. *Arch Phys Med Rehabil.* 1999;80(3):318-23
31. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histochemistry* 2006; 49: 406-410.
32. Li Y, Huard J. Muscle derived stem cell transdifferentiate into myofibroblast in injured muscle. *American J Pathology.* 2002;161(3): 895-907
33. Lattier G, Millet GY, Martin A et al (2004) Fatigue and recovery after high-intensity exercise. Part II: Recovery interventions. *Int J Sports Med* 25:509–515
34. Reilly T, Ekblom B (2005) The use of recovery methods post-exercise. *J Sports Sci* 23:619–627.
35. Lopes LG, Bertolini SMMG, Martins EER, Gewehr PM, Lopes MS. Análise morfométrica de tecido muscular de coelhos submetido a ultra-som pulsado e contínuo de 1 MHz. *Fisioterapia e Pesquisa.* 2005;12(3):15-21.
36. Markert CD, Merrick MA, Kerby TC, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Reahabil,* 86: 1304-10; 2005.
37. Wilken LD, Merrick MA, Kerby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 2004; 25: 73-7.
38. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med.* 1999; 27:54-9.
39. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84-A:822-32.
40. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ & Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004; 29: 191–197.
41. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004; 84:649-98.

42. Berná-Serna JD, Sánchez-Garre J, Madrigal M, Zuazu I, Berna-Mestre JD. Ultrasound therapy in rectus sheath hematoma. *Phys Ther.* 2005;85(4):352-7.
43. Robertson VJ, Baker KG. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. *Phys Ther.* 2001;81(7):1339-50.
44. Kitchen SS, Patridge CJA. Review of therapeutic ultrasound:II. The efficacy of ultrasound. *Physiotherapy*, v.76, p.595, 1990.
45. Low J, Reed A. *Eletroterapia explicada*. 3.ed. São Paulo: Manole, 2001.
46. Guirro R, Guirro E. Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial: estudo experimental em ratos. *Ciência & Tecnologia* 1995; 8: 37-42.
47. Pinto MVM, Costa DA, Rocha LLV, Santos HR, Silva ALS, Barbosa LG, et al. Comparative study of the effects of the Ga-As (904 nm, 150mW) laser and the pulsed ultrasound of 1 MHz in inflammation of tibialis muscle of wistar rats. *Braz Arch Biol Technol.* 2008;51(special):225-30.
48. Silveira PCL. Effects of therapeutcs pulsed ultrasound and demethulsulfaxide .(DMSO.) phonofhoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound in Med & Biol* 2010; 36 (1): 44-50.
49. Nussbaum EL, Locke M. Heat shock muscle after repeated applications of pulsed and continuous ultrasound.; *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88:785-90
50. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento no nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev Bras Fisioter.* 2006;10(1):113-9.
51. Warrn GL, Summanm, Gao X, Champmam P, Hulderman T, Simeonova. Mechanisms of skeletal muscle injury and repair revealed by gene expression studies in mouse models. *J Physiol*, 2007; 582 (2): 825-41.
52. Fyfe MC, Chahl L.A. Mast cell degranulation and increased vascular permeability induced by therapeutic' ultrasound in the rat ankle joint. *British Journal of Experimental Pathology*, v. 65, n. 6, p.671-676, 1984.
53. Starkey C. *Recursos terapêuticos em fisioterapia: termoterapia, eletroterapia, ultra-som, terapias manuais*. São Paulo: Manole, 2001.

54. Lehmann, JF and de Lateur, B.J. (1982) Therapeutic heat. In: Therapeutic heat and cold. Ed: Lehmann, J.F. 3rd edition. Baltimore: Williams & Wilkins. 404-562.
55. Artilheiro PP, Oliveira EM, Viscardi CS, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KPS, Ferrari RAM. Efeitos do ultra-som terapêutico contínuo sobre a proliferação e viabilidade de células musculares C2C12. *Fisioterapia e Pesquisa*, São Paulo, v.17, n.2, p.167-72, abr/jun. 2010.
56. Järvinen TA, Järvinen TLN, Järvinen M, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33;745-64
57. Sarvazyan AP; Belousov LV; Petropavlovskaya MN; Ostroumova TV. The action of low-intensity pulsed ultrasound on amphibian embryonic tissues. *Ultrasound Medicine Biology* 8(6): 639-654. 1982.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo, a análise morfológica dos músculos depois da criolesão, mostrou que todas as fases do reparo muscular foram claramente observadas e, tanto no grupo criolesionado como no tratado com US, elas ocorreram dentro do prazo esperado, que culminou com o reparo aos 21 dias. Porém o US não modificou temporalmente o reparo do músculo esquelético.

Na análise dos constituintes teciduais envolvidos no reparo como edema, mionecrose, infiltrado inflamatório e formação de fibras musculares novas pode-se observar que o ultrassom mostrou que o US reduziu o edema, infiltrado inflamatório e a mionecrose após 1 dia da injúria porém não interferiu na miogênese.

A avaliação da fase mais tardia do reparo muscular neste estudo mostrou que o US não interferiu na miogênese pois os resultados entre o grupo tratado com US não diferiu do grupo criolesionado no que diz respeito a produção de novas fibras e expressão de fatores miogênicos. O US não demonstrou atuar como estimulador da proliferação de células satélites tendo em vista a não modificação do RNAm de MyoD assim como, não modificou a diferenciação dos miotubos pela expressão de miogenina.

O US pulsado nas condições avaliadas não acelerou o processo de regeneração muscular e não interferiu na expressão de proteínas envolvidas na miogênese. Entretanto, este recurso terapêutico se mostrou eficiente na modulação do quadro inflamatório agudo. Neste contexto, estes dados são importantes para que estudos posteriores, nos ofereça melhor entendimento da ação antiinflamatória do US neste modelo. Assim como, deve-se realizar novos estudos com variações nos parâmetros do tratamento com US para verificar se outros protocolos podem ter ação no reparo muscular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldspink G. Molecular mechanisms involved in the determination of muscle fibre mass and phenotype. *Adv. Exerc. Sports Physiol* 1999; 5, 27-39.
2. Goldspink G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 1999; 120: 5-15.
3. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *J Histochem cytochem* 2002; 50: 589-610
4. Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH, Huard J. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *J Appl Physiol.* 2003; 95:771-80.
5. Gomez, M. The physiology and biochemistry of soft tissue healing. *Rehabilitation of Injured Knee*, 2nd Ed. 34-44, 1995
6. Muntoni F, Brown S, Sewry C, Patel K. Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord.* 2002 Jun;12(5):438-46.
7. Koskinen SO, Wang W, Ahtikoski AM, Kjær M, Han XY, Komulainen J, Kovanen V, and Takala TES. Turnover of basement membrane type IV collagen in exercise-induced skeletal muscle injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280: R1292– R1300, 2001.
8. Rodolico C, Mazzeo A, Toscano A, Messina S, Aguenouz M, Gaeta M, Messina C, Vita G. Specific matrix metalloproteinase expression in focal myositis: an immunopathological study. *Acta Neurol Scand.* 2005 Sep;112(3):173-7.
9. Raitz R, Martins MD, Araujo VC. A study of the extracellular matrix in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med.* 2003 May;32(5):290-6
10. Willenbrock F, Crabbe T, Slocombe PM, Sutton CW, Docherty AJP, Cockett MI, et al. The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal domain interactions: a kinetic analysis of the inhibition of gelatinase A. *Biochemistry* 1993;32:4330 –4337.

11. Ribeiro R. Efeito do ultra-som terapêutico pulsado na proliferação e atividade gelatinolítica de células musculares [dissertação de mestrado]. São Paulo: Mestrado em ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho; 2009.
12. Starkey, C. Recursos terapêuticos em fisioterapia: termoterapia, eletroterapia, ultra-som, terapias manuais. São Paulo: Manole, 2001.
13. Guirro R, Guirro E. Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial: estudo experimental em ratos. *Ciência & Tecnologia* 1995; 8: 37-42.
14. McDiarmid T, Burns PN. Clinical applications of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.73, p.155, 1987.
15. Robertson VJ, Baker KG. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. *Phys Ther.* 2001;81(7):1339-50.
16. Doan N, Reher P, Meghje S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation protein syntheses, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999; 57:409-19.
17. Lobato R. Efeitos do ultrassom terapêutico na prevenção de aderências tendinosas [dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2002.
18. Vieira SV. Efeito do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a musculatura lisa e sobre o epitélio endometrial em útero de ratas adultas, após uterotomia. Estudo experimental. [dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2007.
19. Malamam TAB. Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade e da atividade física na musculatura esquelética de ratos submetidos ao alcoolismo crônico e posterior lesão por impacto padronizada.[dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2006.
20. Blume K, Matsuo E, Lopes MS, Lopes LG. Dosimetria proposta para o tratamento por ultra-som - uma revisão de literatura. *Fisioter Mov* 2005; 18(3):55-64.

21. Warden SJ, Fuchs RK, Kessler CK, Avin KG, Cardinal RE, Stewart RL. Ultrasound Produced by a Conventional Therapeutic Ultrasound Unit Accelerates Fracture Repair. *Phys Ther* 2006;86(8):1118-27.
22. Fernandes BL. Efeito do Ultrassom contínuo sobre o processo de regeneração do tecido conjuntivo de ratos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2010.
23. Dubowitz V, Brooke MH, Neville HE. Histological and histochemical stains and reactions. In.: Dubowitz V. *Muscle biopsy..: a modern approach*, London.: W.B. Saunders; 1985, 20-23.
24. Li Y, Huard J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injury skeletal muscle. *Am J Pathol*, 161(3); 895-907; 2002.
25. Watson T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. *Ultrasonics*. 48: 321-29; 2008.
26. Alfredo PP, Anaruma CA, Pião ACS, João SMA, Casarotto RA. Effects of phonophoresis with Arnica Montona onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles – experimental study. *Ultrasonics*, 4: 466-71; 2009.
27. Lopes LG, Bertolini SMMG, Martins EER, Gewehr PM, Lopes MS. Análise morfométrica de tecido muscular de coelhos submetido a ultra-som pulsado e contínuo de 1 MHz. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2005;12(3):15-21.
28. Markert CD, Merrick MA, Kerby TC, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil*, 86: 1304-10; 2005.
29. Wilken LD, Merrick MA, Kerby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 2004; 25: 73-7.
30. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med*. 1999; 27:54-9.

ANEXO 1

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado *Efeito do Ultra-Som Terapêutico na Miogênese e no Remodelamento da Matriz Extracelular Durante o Reparo Muscular* sob número de protocolo AN004 sob responsabilidade de Manoela Domingues Martins sendo **Aprovado**.

São Paulo, 27 de Abril de 2009.

Prof. Dra. Daniela Aparecida Biasotto-Gonzalez
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2

Submissão de artigo para publicação à Revista Brasileira de Fisioterapia.



Página inicial > Usuário > Autor > Submissões > **Submissões Ativas**

Submissões Ativas

Submissão concluída. Agradecemos seu interesse em contribuir com manuscritos para o periódico Revista Brasileira de Fisioterapia/Brazilian Journal of Physical Therapy.

» [Submissões Ativas](#)

Revista Brasileira de Fisioterapia

Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310
São Carlos - São Paulo - Brasil - CEP 13565-905
Telefone: +55-16-3351-8755

ANEXO 3**DADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Comparação dos pesos inicial e final para os diversos momentos e grupos.

| | | Inicial | Final | |
|-------|----------|-------------|-------------|---------|
| grupo | Momentos | Media±DP | Media±DP | p-valor |
| crio | 1 | 237,0±29,2 | 230,0±19,7 | 0,0249 |
| | 7 | 234,0±16,4 | 242,0±13,5 | 0,0560 |
| | 14 | 202,0±10,4 | 212,0(11,4 | 0,0240 |
| | 21 | 232,0(23,1 | 250,0(28,9 | 0,0061 |
| sham | 7 | 226,0(23,8 | 224,0(14,7 | 0,7489 |
| US | 1 | 266,0(29,2 | 265,5(25,3 | 0,9238 |
| | 7 | 399,0(118,2 | 350,5(109,7 | 0,0254 |
| | 14 | 260,4(26,9 | 238,1(23,6 | <0,0001 |
| | 21 | 268,0(25,1 | 248,3(27,3 | 0,0020 |

Comparação entre tempos para grupos independentes pelo teste de Kruskal-Wallis.

| Variáve | Estatística KW | p-valor |
|------------|----------------|---------|
| Edema | 6,587 | 0,0863 |
| Mionecrose | 11,00 | 0,0117 |
| Inf Infl | 11,00 | 0,0117 |
| FN | 4,245 | 0,2362 |

Comparação para crio e crio+US considerando os tempos 1, 7, 14 e 21dias .

| Variável | | Estatística KW | p-valor |
|------------|-----------|----------------|---------|
| Edema | Crio | 9,706 | 0,0212 |
| | Crio + US | 6,587 | 0,0863 |
| Mionecrose | Crio | 9,553 | 0,0228 |
| | Crio + US | 11,00 | 0,0117 |
| Inf Infl | Crio | 10,43 | 0,0153 |
| | Crio + US | 11,00 | 0,0117 |
| FN | Crio | 11,00 | 0,0117 |
| | Crio + US | 7,907 | 0,0480 |

Compara entre crio e crio+US no tempo.

| Variável | Comparação | Estatística de MW | p-valor |
|------------|----------------------|----------------------|---------|
| Edema | Crio1 x crioUS1 | 0,5 | 0,0808 |
| | Crio7 x crioUS7 | 3,0 | 0,6546 |
| | Crio14 x crioUS14 | 3,0 | 0,6546 |
| | Crio21 x crioUS21 | 4,5 | 1,0000 |
| Mionecrose | Crio1 x crioUS1 | 0,0 | 0,0339 |
| | Crio7 x crioUS7 | 3,0 | 0,5127 |
| | Crio14 x crioUS14 | 4,5 | 1,0000 |
| | Crio21 x crioUS21 | 4,5 | 1,0000 |
| Inf Infl | Crio1 x crioUS1 | 0,0 | 0,0253 |
| | Crio7 x crioUS7 | 4,5 | 1,0000 |
| | Crio14 x crioUS14 | 3,0 | 0,6546 |
| | Crio21 x crioUS21 | 4,5 | 1,0000 |
| FN | Crio1 x crioUS1 | 4,5 | 1,0000 |
| | Crio7 x crioUS7 | 1,5 | 0,1904 |
| | Crio14 x crioUS14 | 1,5 | 0,1904 |
| | Crio21 x crioUS21 | 4,5 | 1,0000 |

Análise de miogenia e MYoD para Crio e US nos 4 tempos.

| Variável | | Estatística KW | p-valor |
|----------|------|----------------|---------|
| Miogenia | Crio | 2,3618 | 0,5008 |
| | US | 3,4206 | 0,3312 |
| mYoD | Crio | 3,4206 | 0,3312 |
| | Us | 4,2882 | 0,2320 |

Comparação de miogenina e MyoD nos grupos Crio e US fixando o tempo.

| Variável | Comparação | Estatística de MW | p-valor |
|----------|-------------------|-------------------|---------|
| Miogenia | Crio1 x crioUS1 | 19,00 | 0,8852 |
| | Crio7 x crioUS7 | 25,00 | 0,6761 |
| | Crio14 x crioUS14 | 15,00 | 0,089 |
| | Crio21 x crioUS21 | 16,00 | 0,6650 |
| MyoD | Crio1 x crioUS1 | 13,00 | 0,3827 |
| | Crio7 x crioUS7 | 26,00 | 0,8345 |
| | Crio14 x crioUS14 | 20,00 | 0,6650 |
| | Crio21 x crioUS21 | 18,50 | 1,0000 |