

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

EVALDO MOREIRA DA SILVA JUNIOR

**EFEITO DO ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO PRESENTE NO
MÚSCULO ESQUELÉTICO APÓS LESÃO AGUDA**

**SÃO PAULO
2015**

EVALDO MOREIRA DA SILVA JUNIOR

**EFEITO DO ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO PRESENTE
NOMÚSCULO ESQUELÉTICO APÓS LESÃO AGUDA**

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

Orientadora: Profa. Dra Kristianne Porta Santos Fernandes

**SÃO PAULO
2015**

Silva Junior, Evaldo Moreira da.

Efeito do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre o infiltrado inflamatório presente no músculo esquelético após lesão aguda./ Evaldo Moreira da Silva Junior. 2015.

60 f.

*Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE,
São Paulo, 2015.*

Orientador (a): Profa. Dra Kristianne Porta Santos Fernandes.

*1. Ultrassom. 2. Reparo muscular. 3. Células inflamatórias. 4.
Macrófagos.*

I. Fernandes, Kristianne Porta Santos.

II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 10 de dezembro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): Evaldo Moreira da Silva Junior

Título da Dissertação: "Efeito do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre o infiltrado inflamatório presente em músculo esquelético após lesão aguda".

Presidente: PROFA. DRA. KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES



Membro: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROFA. DRA. RITA DE CÁSSIA MARQUETI DURIGAN



DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus pais, **Evaldo e Maria**, por todo incentivo, compreensão, apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida. A vocês, minha eterna gratidão e admiração.*

AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço a **Deus**, pelo dom da vida e por me acompanhar em todas as etapas, sem nunca me desamparar.

Ao **Wellington Billi** por todo incentivo e compreensão ao longo dessa trajetória, os quais foram fundamentais para a realização desse sonho e por ser peça fundamental na minha vida, sempre acreditando em mim.

As minhas irmãs, **Elaine**, **Eliane** e **Evelyn** por todo amor e incentivo que me fazem mais forte diante das adversidades.

Aos meus pais, **Evaldo** e **Maria**, por todo apoio, incentivo e amor. Por serem minha base sempre.

As minhas sobrinhas, **Natasha** e **Giovana**, por todo amor e incentivo.

Ao meu amigo, o professor **Marcelo Corral** pelos ensinamentos e incentivo para os estudos.

A minha orientadora, **Prof^a Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes**, que esteve presente em todas as etapas durante a execução desse trabalho, por toda paciência, incentivo, ensinamentos e dedicação, a quem devo minha caminhada até aqui. Agradeço pela confiança em mim depositada durante essa trajetória. Aproveito e registro minha admiração, a qual me faz como um exemplo de profissional e pessoa a seguir.

A **Prof^a Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação. Registro aqui toda minha admiração e agradecimento pelo conhecimento transmitido.

A **Prof^a Dra. Cristiane Miranda França**, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação na realização das imunomarcações.

Aos demais **professores** do programa de pós graduação em Ciências da Reabilitação da UNINOVE, pelo convívio e ensinamentos, quais contribuíram de forma grandiosa na minha formação.

A técnica **Angela**, por me ensinar e acompanhar em todas as imunomarcações.

Aos colegas de laboratório, **Agnelo, Erika, Lucas, Nadhia e Therezinha** pelo convívio e por tornarem essa caminhada mais fácil.

Aos demais **colegas** e **funcionários** do laboratório.

A minha amiga **Jacira Ribeiro** por toda a ajuda, companheirismo e incentivo ao longo desses dois anos.

Aos alunos de iniciação científica **Eriton** e **Natalia**, muito obrigado por todo auxílio.

A **UNINOVE** por fornecer toda a estrutura necessária para a realização dessa pesquisa e por me fornecer bolsa de estudos.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda às pessoas. Pessoas transformam o mundo”

Paulo Freire

RESUMO

As lesões musculares embora mais comuns em atletas, atingem também os não praticantes de atividades física, levando o indivíduo ao afastamento de suas atividades diárias. O reparo muscular compreende fases interdependentes orquestradas pelas células imunes que invadem o tecido logo após a ocorrência da lesão. O ultrassom (US) terapêutico é vastamente utilizado no tratamento de lesões musculares, porém faltam evidências científicas que expliquem seu mecanismo de ação. Este trabalho visou elucidar o papel do US sobre as células componentes do infiltrado inflamatório presente no tecido muscular após lesão aguda. Para tanto, foram utilizados 45 ratos Wistar, separados em 3 grupos (5 animais no grupo controle, 20 animais sofreram lesão e não receberam tratamento e 20 animais sofreram lesão e foram tratados com US). O procedimento de lesão adotado foi a criolesão com duas aplicações de bastão resfriado em nitrogênio líquido diretamente no músculo tibial anterior (TA). O US (modo estacionário, pulsado 1:4, com frequência de 1 MHz e intensidade de 0,4 W/cm²) foi aplicado diariamente por 3 minutos no respectivo músculo. Ao término dos períodos experimentais (1, 2, 3 e 7 dias), os músculos TA foram analisados quanto a presença de neutrófilos e dos diferentes fenótipos de macrófagos por meio de imunomarcação (positividade para elastase, CD68, CD80 e CD206). As imagens foram analisadas e quantificadas por meio do software Image J (NIH, EUA). A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com a avaliação da distribuição dos mesmos pelo teste de Kolmogorov & Smirnov. O tratamento com US gerou, nas áreas lesionadas dos músculos tratados, redução no número de neutrófilos (elastase+) nos períodos de 1 e 2 dias, aumento de macrófagos M1 (CD80+) no período de 1 dia e redução destes nos períodos de 2, 3 e 7 dias. Também foi possível observar quando da comparação com os músculos lesionados não tratados, que o US gerou diminuição de macrófagos de perfil M2a (CD206+) no dia 2 e aumento da presença de células deste fenótipo no dia 3. A marcação de macrófagos totais (CD68+) nos animais tratados com US foi menor do que a presente nos animais não tratados nos dias 2, 3 e 7. Não houve diferença nas demais comparações temporais. Como continuidade e a intensidade da presença de células com ação pró ou anti inflamatória pode levar a quadros de inflamação crônica ou de fibrose, a comprovação da capacidade do US em modular a ocorrência destas células representa uma importante passo para a compreensão do potencial terapêutico deste recurso no tratamento de lesões musculares.

Palavras chave: Ultrassom, reparo muscular, células inflamatórias, macrófagos

ABSTRACT

Muscle lesions although more common in athletes also affects sedentary people, leading to partial or total removal of the individual from their daily activities. The muscle repair process comprises interdependent phases orchestrated by immune cells that invade the tissue behind the injury occurrence. Delays or enhancements at different stages can lead to chronic inflammation cases or fibrosis, reinforcing the search for an alternative treatment. The therapeutic ultrasound (US) is widely used to treat muscle injuries, but lack scientific evidence to explain its mechanism of action. This study aimed aims to elucidate the role of US in the inflammatory infiltrate cells presentes on the muscle tissue behind acute injury. For this purpose, 45 Wistar rats will were used, separated into 3 groups (5 animals in the control group, 20 animals suffer injury and will not receive treatment and 20 animals suffer injury and will be treat with US). The adopted procedure is the cryoinjury lesion consisting of two bat applications of cooled in liquid nitrogen directly into the in tibialis anterior (TA) muscle. The US treatment and these groups will be evaluate after 1, 2, 3 and 7 days. The US treatment (stationary mode, pulse 1: 4, with a frequency of 1 MHz and intensity of 0.4 W / cm²) was performed daily for 3 minutes. At the end of the study, the animals were euthanized with an anesthetic overdose and the TA muscles were removed for neutrophil infiltration analysis and the different phenotypes of macrophages during muscle remodeling by immunostaining (positive for CD68, CD80, CD163, CD206 and elastase). The images were analyzed and quantified using the Image J software (National Institute of Health - NIH, USA). Statistical analysis of data was performed according to evaluating the distribution of the same by & Kolmogorov Smirnov test. Treatment with US generated in the damaged areas of the treated muscles, reduction in the number of neutrophils (elastase +) during the periods 1 and 2 days, an increase of M1 macrophages (CD80 +) in one day period and reducing them in periods of 2, 3 and 7 days. It was also noted when comparing the injured muscles untreated, the US generated reduced profile macrophages M2a (CD206 +) on day 2 and increased this phenotype cells present on day 3. The labeling of total macrophages (CD68 +) uS-treated animals was lower than that present in untreated animals on days 2, 3 and 7. There was no difference in other temporal comparisons. As continuity and the intensity of cells presence with pro or anti inflammatory action can leading to chronic inflammation or fibrosis cases, attesting the US's ability can modulate the occurrence of these cells is an important step in understanding the therapeutic potential of this resource in the treatment of muscle injuries.

Keywords: Ultrasound, muscle repair, inflammatory cells, macrophages

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVO.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODO	23
4.1. Delineamento experimental.....	23
4.1.2. Procedimento de criolesão.....	23
4.1.3. Tratamento com USPBI.....	24
4.1.4. Eutanásia dos animais e remoção dos músculos	25
4.1.5. Imunomarcação	25
4.1.6. Análise da presença de neutrófilos	27
4.1.7. Análise da presença de macrófagos	27
4.2. Análise estatística	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Positividade para elastase (neutrófilos).....	30
5.2. Positividade para CD68 (macrófagos).....	32
5.3. Positividade para CD80 (macrófagos M1).....	34
5.4. Positividade para CD206 (macrófagos M2a)	36
5.5. Comparativo entre os grupos e períodos experimentais	38
6. DISCUSSÃO e CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8. ANEXOS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos do ultrassom	24
Tabela 2. Informações sobre os anticorpos utilizados	27
Tabela 3. Efeitos do UST com frequência abaixo de 2 MHz sobre o reparo do músculo esquelético em modelos experimentais	56
Tabela 4. Efeitos do UST com frequência acima de 3 MHz sobre o reparo do músculo esquelético em modelos experimentais	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração de neutrófilos e macrófagos após a ocorrência de lesão	13
Figura 2. Equipamento de ultrassom e procedimento da aplicação	25
Figura 3. Exemplo de cálculo da área de marcação pelo DAB.....	28
Figura 4. Número de células contadas por meio da imunomarcação para o anticorpo anti elastase	30
Figura 5. Padrão de marcação imunomarcação para elastase	31
Figura 6. Percentual da área marcada na imunomarcação para o anticorpo anti CD68	32
Figura 7. Padrão de imunomarcação para CD68	33
Figura 8. Percentual da área marcada na imunomarcação para o anti-anticorpo CD80	34
Figura 9. Padrão de imunomarcação para CD80	35
Figura 10. Percentual da área marcada na imunomarcação para o anti-anticorpo CD206	36
Figura 11. Padrão de imunomarcação para CD206	37
Figura 12. Comparativo entre neutrófilos e macrófagos que grupos que sofreram apenas lesão e nos que receberam lesão e foram tratados com US	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- CD – grupamento de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*)
- CEUA - Comitê de ética no uso de animais
- COX-2 - cicloxigenase 2
- DAB - diaminobenzidina
- HE - hematoxilina eosina
- IFN- γ - interferon gamma
- IL- interleucina
- LBI - laser de baixa intensidade
- MGF - do inglês *Mechano-Growth Factor*
- NO - óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)
- RNAm - ácido ribonucleico mensageiro
- SOD - superóxido dismutase
- TA - tibial anterior
- TAD - tibial anterior direito
- TBARS - ácido tiobarbitúrico
- TGF- β - fator de crescimento transformador β (do inglês, *Transforming Growth Factor*)
- TNF- α - fator de necrose tumoral α (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*)
- US - ultrassom
- UST - ultrassom terapêutico
- VEGF - fator de crescimento vascular endotelial (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

1- INTRODUÇÃO

Após a ocorrência de uma lesão, o tecido muscular passa a abrigar uma população de células inflamatórias que irão coordenar as diferentes etapas do processo de reparo (BUTTERFIELD *et al.*, 2006, TIDBALL & VILLALTA, 2010).

Os neutrófilos (elastase+) são os primeiros leucócitos a chegar ao tecido lesionado e além da fagocitose são responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, enzimas e radicais livres. A liberação destas substâncias pode auxiliar na eliminação e degradação de restos celulares oriundos do processo inflamatório, no entanto se sua ação for contínua e/ou muito intensa, pode aumentar o dano tecidual (TIDBALL 2005; BUTTERFIELD *et al.*, 2006; BOSURGI *et al.*, 2011; SACLIER *et al.* 2013). Estima-se que os neutrófilos cheguem ao tecido nas primeiras horas após a lesão muscular e alcancem seu pico numérico em 24 horas, quando sua presença cai rapidamente, sendo escassos após 36 a 48 horas TIDBALL & VILLALTA, 2010, SACLIER *et al.* 2013).

Já os macrófagos com perfil inflamatório/fagocítico (M1) chegam ao tecido lesionado e atingem concentrações elevadas nas primeiras 24 horas após as lesões aumentando em número, até cerca de 2 dias após as lesões, quando sua presença atinge o pico e então começa a declinar. Assim, aproximadamente no terceiro/quarto dia após a lesão, uma população de macrófagos de perfil não fagocítico (M2) começa a atingir concentração elevada no músculo e perdura nas área lesionada por muitos dias (TIDBALL & VILLALTA, 2010).

A subpopulação de macrófagos M1 (CD68+, CD80+) é ativada classicamente pelas citocinas de perfil Th1, como IFN- γ e TNF- α . Estas células além de participarem na remoção de restos celulares, geram agentes oxidantes como o óxido nítrico (NO) e produtos como IL-6, IL-1 β , VEGF, IL-13 e altas doses de TNF- α (TIDBALL & VILLALTA 2010; BRIGITTE *et al.*, 2010; BOSURGI *et al.*, 2011).

Como já descrito, depois que a população de macrófagos M1 atinge seu pico, ela vai sendo substituída por uma população de macrófagos de fenótipo M2 que irá atenuar a resposta inflamatória e promover o reparo tecidual. Os macrófagos M2 são classicamente ativados por citocinas e produtos de caráter anti-inflamatório e são subdivididos em 3 categorias: M2a, M2b e M2c (GINDERACHTER *et al.* 2006, SICA *et al.* 2006, TIDBALL & VILLALTA 2010).

Os macrófagos M2a, ativados classicamente por citocinas como a IL-4 e a IL-13, passam a predominar na lesão após os M1, e produzem níveis elevados de produtos de caráter anti-inflamatório como IL-4, IL-10, TGF- β e a enzima arginase que converte arginina (substrato para a síntese de NO) em ornitina e uréia. Assim, a ação dos macrófagos M2a pode reduzir a produção de NO e de outras espécies reativas de oxigênio e enzimas, diminuindo os danos causados pelos macrófagos M1 (TIDBALL & VILLALTA, 2010, GINDERACHTER *et al.*, 2006).

Os macrófagos M2b são ativados por complexos imunes e por ligação com receptores tipo *toll*, elevando a produção de IL-10 e diminuindo a produção de IL-12, mas seu papel ainda não está bem descrito no reparo muscular. Já os macrófagos de fenótipo M2c são ativados principalmente pela IL-10 ou por glicorticoides e também liberam produtos que desativam o perfil M1 contribuindo para resolução do quadro inflamatório (NOVAK & KOH 2013).

Vários autores consideram os macrófagos como células alvo para as intervenções terapêuticas nos tecidos musculares lesionados (TIDBALL & VILLALTA 2010; SACLIER *et al.*, 2013; BOSURGI *et al.*, 2011).

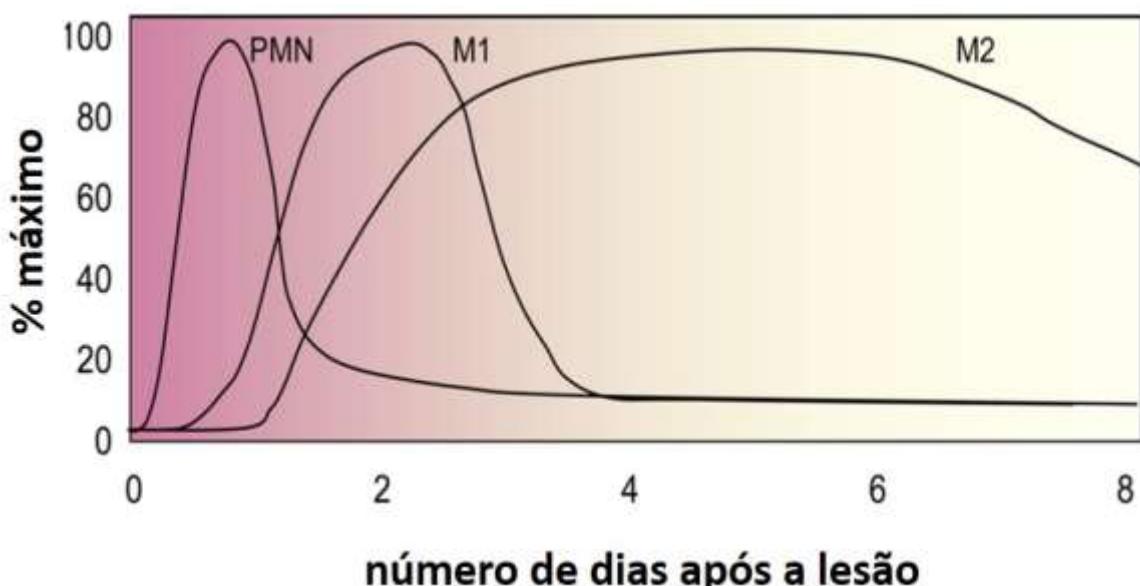


Figura 1. Percentual de neutrófilos e macrófagos presentes no tecido muscular após a ocorrência da lesão (Tidball & Villalta, 2010)

Dentre as intervenções terapêuticas utilizadas para modular o reparo muscular após a lesão, o ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade

(USPBI) vêm sendo bastante utilizado na clínica para o tratamento de lesões musculares (MENDONÇA *et al.*, 2006; PIEDADE *et al.*, 2008; RIBEIRO, 2009; ARTIFON *et al.*, 2012).

O USPBI se utiliza de vibrações mecânicas de alta frequência criadas através de energia elétrica que é convertida em energia sonora através de um cristal piezoelettrico. As ondas sonoras geradas são propagadas pelos tecidos perdendo progressivamente sua intensidade (SPEED 2001; SMITH, JONATHAN & FINNOFF 2009).

Os efeitos do USPBI dependem da sua intensidade, frequência, do tempo de exposição e das condições fisiológicas do tecido alvo. Assim, dependendo dos parâmetros dosimétricos escolhidos, esta técnica pode gerar efeitos térmicos ou não térmicos (FREITAS *et al.*; 2007).

Os efeitos térmicos (provocados pelo aquecimento tecidual) elevam o fluxo sanguíneo, aumentando a flexibilidade do tecido, modulando a dor, reduzindo os espasmos musculares e a rigidez articular, mas podem induzir uma reação inflamatória moderada (CHANDRAN *et al.*; 2007; LAI & PITTELKOW 2007; MIZRAHI *et al.*, 2007).

Dentre os efeitos não térmicos do USPBI temos o micro fluxo acústico que é o direcionamento/movimento dos fluídos que envolvem as membranas celulares, gerando a movimentação de íons e pequenas moléculas podendo alterar o funcionamento, estrutura e a permeabilidade das membranas celulares (CHANDRAN *et al.*, 2007; LAI & PITTELKOW 2007). Já a cavitação, que também é considerada um efeito não térmico do US, consiste na formação de bolhas microscópicas de gases geradas pela mudança de pressão nos fluidos teciduais. A cavitação eleva o fluxo do fluido tecidual circundante e pode ser considerada benéfica quando é estável e regular (CHANDRAN *et al.*, 2007; LAI & PITTELKOW 2007; MIZRAHI *et al.*, 2007).

O regime de aplicação do US pode ser contínuo ou pulsado. A emissão continua, pode gerar efeitos danosos aos tecidos pelo aumento na temperatura e pela possibilidade de reflexão com sobreposição de ondas que traria um estímulo tecidual muito intenso (TER HAAR 1999). Deste modo, tanto nos ensaios clínicos como nos experimentais mostram, o ultrassom pulsado é o mais utilizado (RIBEIRO *et al.* 2010, PADILLA, *et al.*, 2014).

Dentre os parâmetros dosimétricos, a frequência (número de ondas que ocorrem em 1 segundo de aplicação) determina a capacidade de penetração das ondas ultrassônicas no tecido alvo, é mensurada em mega-hertz (MHz). Quanto maior for à frequência, menor é a profundidade atingida pelas ondas. Já a intensidade representa a quantidade de energia que chega ao tecido e é medida em Watts (W) por cm² (KARNES & BURTON, 2004; WATANUKI *et al.*, 2009; MONTALTI *et al.*, 2013). As frequências de 1 e 3 MHz e as intensidades de 0,2 a 5,0 W/cm², correspondem atualmente aos parâmetros mais adotados nos estudos experimentais e clínicos (GOUVÉA *et al.*, 1998; RANTANEM *et al.*, 1999; MENEZES *et al.*, 1999; KARNES & BURTON, 2002; McBRIER *et al.*; 2007; PLENTZ *et al.*; 2008; PINTO *et al.*; 2008; ALFREDO *et al.*; 2008; PIEDADE *et al.*; 2008; WATANUKI *et al.*, 2009; OKITA *et al.*; 2009; ARTIFON *et al.*; 2012; SHU *et al.* (2012) MONTALTI *et al.*, 2013).

Os parágrafos a seguir descrevem sucintamente os estudos que analisaram o papel do US no reparo muscular em modelos experimentais com utilização de animais.

Gouvêa *et al.* (1998) descreveram o efeito do US (1 MHz, 0,5 W/cm², pulsado 1:5), com aplicação de 5 minutos/dia. Os animais foram eutanasiados 3, 7, 14 e 21 dias depois da lesão, que aconteceu por incisão no tibial anterior de ratos. A avaliação histológica revelou nos quatro períodos experimentais que o tratamento com US favoreceu a regeneração muscular promovendo redução no número de fibras necróticas. A análise morfométrica do grupo tratado com US demonstrou um reduzido número de macrófagos e neutrófilos além de um número acentuado de fibroblastos e novas fibras musculares.

Rantanem *et al.* (1999) avaliaram o efeito do US (3 MHz, 1,5 W/cm², pulsado 1:5 aplicado após 6h ou após 72h da lesão) sobre a velocidade de regeneração das fibras musculares, com aplicação de 6 minutos/dia em ratos que sofreram contusão no músculo gastrocnêmico. Os animais foram eutanasiados após 4, 7 e 10 dias da lesão e a comparação entre os animais tratados e os não tratados se deu por meio de análises imunohistoquímicas, morfológicas e da cintilografia. Os resultados mostraram que a proliferação de células satélites nas fases iniciais da regeneração foi aumentada (até 96%) com o tratamento com US, porém não houve efeito sobre a produção de miotubos. A proliferação de

fibroblastos se manteve intensa por períodos de 7 e 10 dias nos animais tratados com US, o que só aconteceu no período de 3 a 4 dias nos animais não tratados. Os autores não encontraram diferenças na revascularização entre os grupos tratados com US e o controle não tratado.

Menezes *et al.* (1999) avaliaram o efeito do US (1 MHz, 0,5 W/cm², pulsado 1:5), com aplicação de 5 minutos/dia com início após o terceiro dia e tratamento por 10 dias, em 26 coelhos que sofreram lesão muscular por esmagamento do músculo reto da coxa, direita e esquerda. Um lado serviu de controle enquanto o outro foi tratado. Ensaios mecânicos de tração mostram que os músculos tratados com US demonstraram melhor performance nos ensaios mecânicos durante o período de reparo muscular.

Karnes & Burton (2002), utilizaram o US (3,0 MHz, 0,5 W/cm², contínuo) para tratar o músculo extensor digital longo de ratos com lesão induzida por contração por eletroestimulação (150 Hz, 21 ciclos/min), com aplicações de 5 minutos/dia, por 3, 5 e 7 dias. A avaliação do índice funcional (força muscular) foi realizada e os resultados mostraram não existir diferença entre os grupos tratados e não tratados nos períodos de 3 e 5 dias, porém após 7 dias de tratamento a força muscular foi maior no grupo tratamento quando comparado ao grupo controle.

Wilkin *et al.* (2004) utilizaram o US (3,3 MHz, 1,0 W/cm², pulsado) para tratar lesões no gastrocnêmico de ratos com o objetivo de avaliar a recuperação muscular após lesão. O tratamento teve início 6 horas após a lesão com sessões de 5 minutos ao dia, durante 7 dias. Os animais foram eutanasiados e tiveram os músculos extraídos após 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 e 40 dias. Não foram encontradas diferenças na massa muscular, na concentração de proteínas totais e no número de núcleos por fibra na área de secção entre os músculos tratados e não tratados.

Markert *et al.* (2005) descreveram o efeito do US (3 MHz, 0,1 W/cm², contínuo) sobre a regeneração após lesão no músculo gastrocnêmico de ratos lesionados por contusão. As sessões de US tiveram duração de 5 minutos/dia durante 4 dias e não demonstraram ser capazes de alterar a massa muscular, concentração de proteínas contráteis, número de núcleos por fibra e densidade de mionúcleos com relação aos músculos lesionados e que não receberam tratamento.

McBrier *et al.* (2007) relataram a diminuição da expressão de RNAm de MGF (mechano-growth fator, um fator de crescimento muscular indispensável ao reparo tecidual) e ausência de alteração de massa nos músculos gastrocnêmicos de ratos Wistar contundidos e tratados com US (3 MHz, 0,4 W/cm², pulsado) por de 5 minutos/dia por 4 dias (com início após 24 horas da lesão).

Freitas *et al.* (2007) descreveram os efeitos do US (0,5, 1,0 e 2,0 W/cm², pulsado) aplicado após 12h por 1, 3 e 5 dias no músculo gastrocnêmico de ratos Wistar que receberam laceração, sobre indicadores de estresse oxidativo. Os resultados apontaram que o tratamento com US gerou diminuição da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) após 1 (1 e 2 W/cm²), 3 (0,5; 1 e 2 W/cm²) e 5 (2 W/cm²) dias; da produção de catalase (período de 1 dia, 2 W/cm²) e de super óxido dismutase (SOD) após 1 (0,5; 1 e 2 W/cm²) e 5 (1 e 2 W/cm²) dias de tratamento. Os resultados sugerem que a técnica pode atuar como protetor ao tecido quanto ao estresse oxidativo.

Plentz *et al.* (2008) usaram o US (1 MHz, 0,4 W/cm², contínuo) para tratar lesões em bíceps femoral de 16 ratos Wistar lesionado transversalmente por meio de incisão cirúrgica. Esses animais foram divididos em 2 grupos, controle (somente lesão) e o grupo tratamento (lesão e terapia ultrassônica). As aplicações de 3 minutos foram realizadas após 1, 8 e 24 horas da lesão. Foram realizadas coletas de sangue após cada tratamento. As análises sanguíneas apontaram redução dos eritrócitos após 1h, aumento dos neutrófilos após 8h e dos eosinófilos após 24h no grupo tratado com relação aos animais que não receberam o tratamento, o que sugere amplificação da resposta inflamatória aguda com uso do US contínuo.

Pinto *et al.* (2008) compararam o efeito do US (1 MHz, 0,3 W/cm², pulsado) com o do laser no tratamento de lesões aguda no músculo tibial anterior de ratos que receberam uma injeção intramuscular de clordidrato de bupivacaína para indução da inflamação. O US foi aplicado uma vez ao dia por 2 e 7 dias (com início 24 horas após a lesão). As amostras foram analisadas histologicamente por meio de coloração HE e o resultado sugeriu que tanto o tratamento com laser como com ultrassom apresentaram ação anti-inflamatória, no entanto só a fototerapia pareceu ter efeito em todos os períodos observados enquanto que o

US foi capaz de induzir o declínio da resposta inflamatória somente após 7 dias de tratamento.

Piedade *et al.* (2008) avaliaram os efeitos do US (1 MHz, 0,57 W/cm², pulsado 1:2) sobre a regeneração muscular e a deposição de fibras colágenas no músculo gastrocnêmico de ratos após lesão por laceração. Os animais foram tratados por 4, 7 e 14 dias (aplicações de 5 minutos/dia). Observou-se, através da análise histológica, uma maior área de tecido em regeneração após 4 dias de tratamento com US quando comparada ao grupo não tratado. Nos períodos de 7 e 14 dias não foram relatadas diferenças significativas no padrão de reparo mas o tratamento com US pareceu favorecer a organização estrutural do tecido lesionado.

Alfredo *et al.* (2008) avaliaram os efeitos do US (1 MHz, 0,5 W/cm², pulsado 1:2) sobre o reparo muscular, com aplicações de 3 minutos ao dia em ratos sedentários que tiveram o músculo tibial anterior lesionado por incisão cirúrgica. As aplicações foram iniciadas após 24 horas da lesão e ocorreram por 3 dias seguidos, sendo que os animais foram eutanasiados no quarto dia. A análise histológica por HE no quarto dia após a lesão revelou que o tecido conjuntivo tornou-se mais organizado e havia uma quantidade maior de células inflamatórias (sem especificação de seu subtipo) após nos músculos tratados com ultrassom.

Okita *et al.* (2009) descreveram o efeito do US (1 MHz, 1.0 W/cm², contínuo) sobre a disposição das fibras de colágeno no músculo sóleo de ratos após imobilização prolongada (1 mês). Para isso realizaram aplicações de 15 minutos ao dia, 6 vezes por semana e durante 4 semanas. A análise histológica (HE) e morfológica das amostras concluíram que o tratamento com US foi capaz de melhorar a organização das fibras colágenas no endomíseio dos músculos lesionados.

Chan *et al.* (2010) relataram os efeitos do US (1,5 MHz, 30mWcm², pulsado) sobre a regeneração de miofibrilas e o tempo de cicatrização do músculo gastrocnêmico de camundongos após lesão por meio da laceração. O tratamento foi iniciado 24 horas após a lesão (20 minutos/dia) e sucedeu por 7, 14, 21 e 28 dias. A eutanásia de todos os animais aconteceu 4 semanas após a lesão. A análise histológica através da coloração com HE mostrou uma maior regeneração

nas fibras musculares nos grupos tratados com US quando comparados aos respectivos grupos controle.

Rennó *et al.* (2011) compararam o efeito do US (1,5 MHz, 30mW/cm², pulsado) com o do laser de baixa intensidade (LBI) sobre o músculo tibial anterior de ratos que foram criolesionados. O tratamento foi iniciado 24 horas após a lesão, sendo realizado a cada 48 horas, no total de 6 sessões (não houve descrição do tempo de aplicação) e os resultados foram avaliados somente no período de 13 dias após a ocorrência das lesões. Tanto o tratamento com LBI quanto o com US foram capazes de reduzir a intensidade do quadro inflamatório e a imunomarcação da enzima ciclooxygenase 2 (COX-2) quando comparados aos resultados obtidos nos animais lesionados e não tratados. Na comparação entre os resultados obtidos com os tratamentos com US ou LBI, observou-se que o LBI demonstrou uma capacidade ligeiramente maior de atenuação da lesão do que o US.

Shu *et al.* (2012) avaliaram o efeito do US (3 MHz, 0,25 W/cm², 0,50 W/cm² e 0,75 W/cm², pulsado) sobre o reparo muscular após lesão por esmagamento no músculo gastrocnêmico de ratos. O tratamento teve início 24 horas após a lesão, duração de 5 minutos/dia e se manteve por 4, 7 e 14 dias. A análise histológica por HE após 4 e 7 dias mostrou um quadro inflamatório menos intenso e com menor número de células inflamatórias em todos grupos tratados com US quando da comparação com o grupo não tratado. Aos 14 dias os grupos tratados e o não tratado apresentaram aspectos teciduais similares.

Artifon *et al.* (2012) compararam os efeitos do US (1 MHz, nas intensidades de 1 W/cm², 0,5 W/cm² e 0,2 W/cm², modo pulsado) associado ao alongamento sobre remobilização de músculo sóleo após indução de encurtamento por imobilização prolongada (15 dias). O US foi aplicado por 3 minutos/dia durante o período de 10 dias diretamente no músculo sóleo. Não houve diferença entre os animais tratados com alongamento e US e os que receberem somente alongamento.

Montalti *et al.* (2013) avaliam o efeito do US (1,5 MHz, 30mW/cm², pulsado) no reparo muscular de tibial anterior (TA) de ratos que receberam criolesão. As aplicações iniciaram após 24 horas das lesões e ocorreram, com intervalos de 48 horas, por 20 minutos/dia, durante 7 e 13 dias. Após análise histológica

observaram que nos músculos tratados com o US, houve uma melhor organização estrutural do tecido muscular após 13 dias de tratamento. A disposição das fibras de colágeno não foi diferente entre os animais tratados e não tratados, nos dois períodos. A expressão de COX-2 foi avaliada por imunohistoquímica e demonstrou que tanto nos animais tratados por 7 como 13 dias houve aumento de sua expressão. O aumento da COX-2 sugere um aumento no número de células inflamatórias e uma melhora acentuada na organização do tecido sobre a área da lesão.

Todos estudos descritos estão resumidos na tabela inserida nos anexos deste trabalho. É possível observar grandes variações nos parâmetros dosimétricos (frequência, intensidade) e no regime de aplicação. Não foram encontrados estudos que descrevam os efeitos do US sobre a presença de neutrófilos e dos diferentes perfis fenotípicos de macrófagos após lesão muscular.

2 – JUSTIFICATIVA

Lesões musculares são muito comuns em atletas e em sedentários e acarretam o afastamento parcial ou total do indivíduo de suas atividades diárias. O sucesso na reabilitação depende de características intrínsecas do tecido muscular e do tipo de tratamento aplicado (SHIN *et al.*, 2014). O USPBI é vastamente utilizado na prática clínica para o tratamento de lesões musculares (PADILLA, *et al.*, 2014) mas pouco se conhece sobre seu mecanismo de ação. Como as células inflamatórias que invadem o tecido muscular lesionado são responsáveis por orquestrar seu reparo (TIDBALL & VILLALTA 2010; SACLIER *et al.*, 2013; BOSURGI *et al.*, 2011, SHIN *et al.*, 2014), avaliar o efeito deste recurso terapêutico sobre estas células é um passo importante para compreender seu mecanismo de ação e poder futuramente melhorar a qualidade e a velocidade do reparo deste tecido.

3 – OBJETIVOS

Objetivo geral: Analisar os efeitos do USPBI sobre o infiltrado inflamatório presente no músculo tibial anterior de ratos após lesão aguda.

Objetivos específicos:

- Avaliar a capacidade do USPBI em modular a presença de neutrófilos no tecido muscular de ratos após lesão aguda.
- Avaliar a capacidade do USPBI em modular o perfil fenotípico dos macrófagos presentes no tecido muscular de ratos após lesão aguda, em especial os fenótipos M1 e M2a.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório do Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA em 23 de setembro de 2014 (An0026/2014).

4.1. Delineamento experimental

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*: var. albinus, Rodentia, Mammalia) machos, da linhagem Wistar, com dois meses de idade e massa corporal 200 ± 15 gramas, mantidos no biotério da UNINOVE em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente (22°C), umidade relativa (40%), luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro), com comida e água ad libitum.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 03 grupos experimentais

- **Grupo 1 Controle:** Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento, havendo apenas a remoção do músculo tibial anterior (TA) ($n=5$);
- **Grupo 2 Criolesão sem tratamento:** Os animais sofreram criolesão no músculo tibial anterior direito (TAD) e não receberam tratamento ($n=20$);
- **Grupo 3 Criolesão tratado com US:** Os animais sofreram criolesão no músculo TAD e foram tratados com US ($n=20$);

Os animais dos grupos 2 e 3 foram eutanasiados após 1, 2, 3 e 7 dias da ocorrência da lesão para tornar possível a identificação de neutrófilos e de macrófagos dos diferentes fenótipos (TIDBALL & VILLALTA, 2010).

4.1.2. Procedimento de criolesão

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o descrito por MIYABARA *et al.* (2005), MESQUITA-FERRARI *et al.* (2011) e ALVES *et al.* (2012). Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com administração intraperitoneal de 1 mL/kg de 1% ketamina HCL (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 2% xilazina (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas com agulhas ultra finas (modelo insulina, BD, Juiz de Fora, MG, Brasil). Posteriormente à indução anestésica, os animais foram

positionados em uma superfície plana e foi realizada a tricotomia da região correspondente ao músculo TA.

O músculo TA foi exposto cirurgicamente e submetido ao procedimento de criolesão, que consistiu na aplicação de um bastão metálico de extremidade plana (3 mm de diâmetro) resfriado previamente em nitrogênio líquido, diretamente na superfície do músculo por 10 segundos. Após o descongelamento da área (30 segundos), o procedimento foi repetido na mesma área por mais 10 segundos. Terminado este procedimento, foi realizada a sutura com fio de poliamida (5,0) e os animais foram mantidos em caixas plásticas em ambiente aquecido (37°C) até ficarem conscientes. Para prevenir sofrimento, os animais receberam aplicação intraperitoneal do analgésico cloridrato de tramadol (5 mg/kg), 2 vezes ao dia por 3 dias seguidos.

O modelo de lesão muscular por meio de criolesão foi o escolhido para este estudo devido ao fato deste, ser um modelo no qual se consegue executar uma lesão bem delimitada na superfície ventral do músculo, de forma padronizada, e com pouca variabilidade em sua severidade (BAPTISTA *et al.*, 2011).

4.1.3. Tratamento com US

Os animais do grupo 3 (tratados com US) foram contidos manualmente e submetidos ao tratamento utilizando o equipamento de US do modelo Sonomaster Microcontrolled comunicator (KW Eletrônica, Amparo, SP, Brasil) de acordo com os parâmetros descritos na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos do ultrassom

Agente acoplador	Gel
Modo de aplicação	Estacionário
Modo	Pulsado 1:5
Frequência	1 MHz
Intensidade	0,4 W/cm ²
Tempo de aplicação	3 minutos

Os parâmetros de frequência e intensidade foram escolhidos de acordo com a análise da literatura que indica resultados positivos com uso de frequência

de 1 ou 1,5 MHz e intensidade entre 0,2 a 1 W/cm² no modo pulsado. As publicações de Gouvêa *et al.* (1998), Menezes *et al.* (1999), Pinto *et al.* (2008), Piedade *et al.* (2008), Alfredo *et al.* (2008) e Artifon *et al.* (2012) sobre os efeitos do US no tecido muscular utilizaram a frequência 1Mhz como neste estudo, com pequenas variações na intensidade escolhida.

A aplicação do US foi iniciada 2 horas após a lesão e repetida diariamente por 1, 2, 3 e 7 dias, sempre no mesmo horário e no mesmo local, de maneira estacionária, abrangendo toda área lesionada. Para tanto, os animais foram contidos manualmente, sem a necessidade de anestesia.

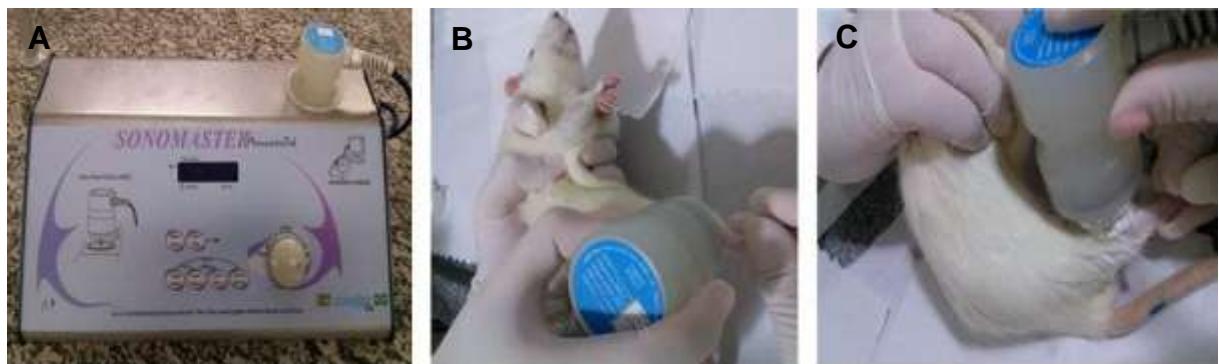


Figura 2. A: equipamento de ultrassom utilizado; B: contenção manual do animal; C: aplicação do ultrassom

4.1.4. Eutanásia dos animais e remoção dos músculos

Após cada período experimental (1, 2, 3 e 7 dias), os animais foram eutanasiados utilizando superdose de anestésico. Em seguida, os músculos TA foram retirados e imediatamente inseridos em solução de formol tamponado (pH 8,0) a 10%, onde permaneceram por 24 horas até a inclusão em parafina.

4.1.5. Imunomarcação (elastase, CD68, CD 80 e CD 206)

Após 24 horas em solução de formol, os músculos foram seccionados transversalmente na região central da área lesionada, desidratados e emblocados em parafina a 60°C. Foram realizados em média 03 cortes de 3µm de espessura em micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas de microscopia desengorduradas e silanizadas (3-aminopropiltrióxilosilano, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA). As lâminas contendo os cortes histológicos foram inicialmente desparafinadas em xiloglutaraldeído aquecido em 60°C por

5 minutos e hidratas com banhos sequenciais em soluções alcoólicas de diferentes concentrações (absoluto, 90°, 80° e 70°). Após a hidratação, as lâminas foram mantidas em água destilada.

Para as imunomarcações de CD68, CD 80 e CD 206 foi realizada a recuperação antigênica com uso de inclusão em tampão citrato (pH 6,0) por 20 minutos a 90°C (em panela) seguido por descanso de 30 minutos em temperatura ambiente (esta etapa não foi realizada para a marcação com elastase porque não houve necessidade). Após este período, as lâminas foram lavadas em solução de salina-fosfato tamponada (PBS, pH 7,4) por 5 minutos. Os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio 0,3% por 5 minutos, por 3 vezes, visando o bloqueio da peroxidase endógena. Para a marcação das proteínas CD206 e CD80 foi realizado um bloqueio adicional com BSA 5% por 5 minutos com a finalidade de evitar ligações inespecíficas, já que em testes prévios esses anticorpos demandaram essa necessidade. Em seguida, os cortes foram hidratados com PBS por 5 minutos e incubados com os anticorpos primários (tabela 2) contra CD68 (1:1000) para identificação de macrófagos, CD80 (1:250) para identificação de macrófagos do perfil M1; CD206 (1:2000) identificação de macrófagos do perfil M2a; e elastase (1:3500) para identificação de neutrófilos; por 24 horas em temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram lavadas sucessivamente por 5 minutos com PBS, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Histofine, Simple Stain Rat MAX PO, Tsukiji, Tokyo, Japan) por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens com tampão PBS, a revelação da reação da peroxidase foi obtida com solução cromógena de diaminobenzidina a 5 % (DAB, Abcam, Cambridge, MA, USA) por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas por 10 minutos em água corrente e os cortes contra corados suavemente com hematoxilina de Mayer. As lâminas do grupo controle (animais sem lesão e tratamento) passaram pelo mesmo procedimento.

Tabela 2. Anticorpos utilizados

Anticorpos	Clone	Reatividade	Titulação	Incubação
Anti Elastase (Abcam)	Policlonal	Anti rato, camundongo e humano produzido em coelho.	1 : 3500	24 horas, câmera úmida, temperatura ambiente
Anti CD68 (Abcam)	Monoclonal	Anti rato, camundongo, coelho e humano produzido em camundongo.	1 : 1000	24 horas, câmera úmida, temperatura ambiente
Anti CD206 (Abcam)	Policlonal	Anti rato, camundongo e humano produzido em coelho.	1 : 2000	24 horas, câmera úmida, temperatura ambiente
Anti CD80 (Bioss)	Policlonal	Anti rato produzido em coelho.	1 : 250	24 horas, câmera úmida, temperatura ambiente

4.1.6. Análise da presença de neutrófilos (imunomarcação elastase)

Para análise quantitativa da presença de neutrófilos, 10 áreas (aumento de 200X) foram fotografadas com auxílio de microscópio de luz convencional NIKON Eclipse E200 e câmera acoplada Premiere MA-88300 (NIKON, Tóquio, Japão) bem como software de aquisição de imagem TSview (Tucson Imaging Technology Co. Limited – Fujian, China). As imagens foram analisadas usando o plugin Count Cells do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA).

4.1.7. Análise da presença de macrófagos (imunomarcação CD68, CD80 e CD206)

Para análise quantitativa da presença de macrófagos, foi obtida a porcentagem da área de marcação evidenciada pelo DAB. Inicialmente, procedeu-se a digitalização de 6 campos histológicos, escolhidos aleatoriamente nas regiões de marcação mais intensa, com o aumento original de 400X. O procedimento de digitalização foi realizado utilizando um microscópio NIKON

Eclipse E200 e câmera acoplada Premiere MA-88300 (NIKON) bem como software de aquisição de imagem TSview (Informer Technologies). A intensidade de luz foi padronizada em todas as digitalizações. As imagens obtidas foram mantidas em RGB, resolução 2048 x 1536 pixels e extensão jpg.

Para obtenção do percentual da área de marcação do infiltrado inflamatório em relação à área da lesão, as imagens digitalizadas foram abertas no software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA) e submetidas ao filtro de deconvolução RGB (*plugin* color deconvolution) (Landini, 2010) conforme a descrição feita por Ruifrok & Johnston (2008). Por esse método, é possível separar a cor do DAB e da hematoxilina, permitindo o cálculo do percentual de células marcadas com mais fidelidade. Separando o DAB das demais cores, a imagem foi convertida para 8 bits, os tons de cinza definidores da marcação pelo DAB foram selecionados e a área ocupadas por esses tons foi calculada (figura 2).

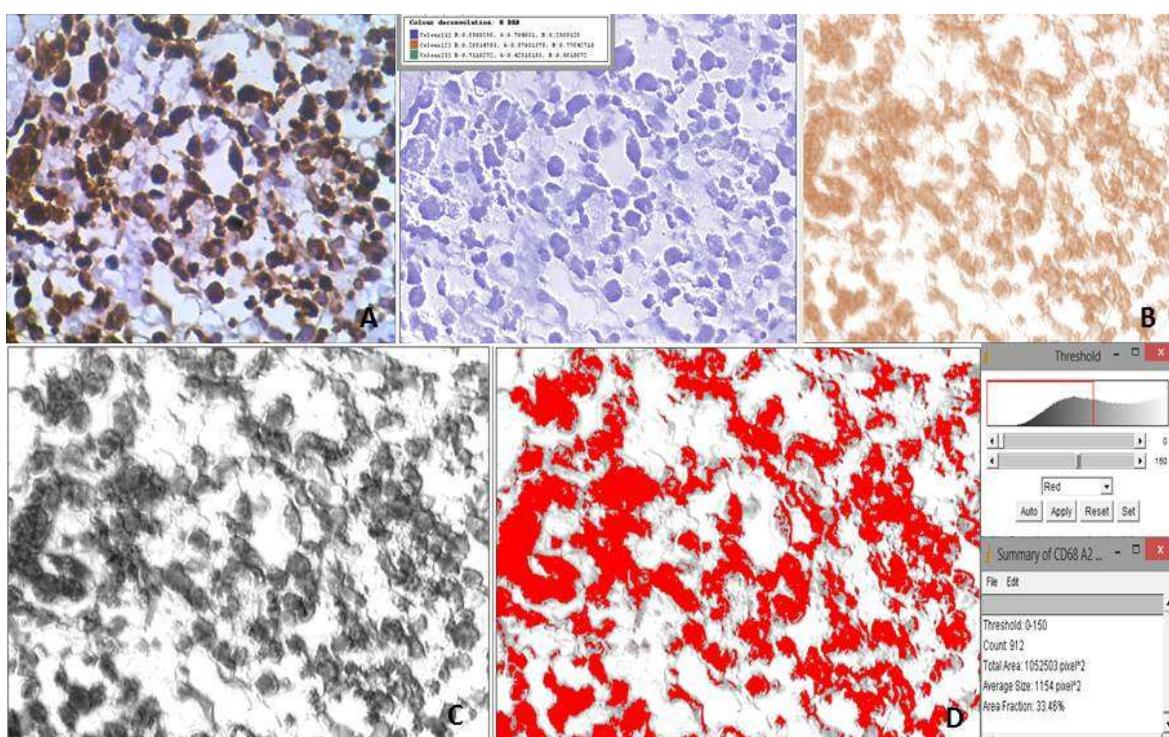


Figura 3. Exemplo de cálculo da área de marcação pelo DAB. A: corte histológico com marcação evidenciada pelo DAB; B: *deconvolução* da imagem mostrada em A, obtendo-se duas imagens, uma referente a coloração da hematoxilina (azul) e outra da coloração do DAB (marrom); C: a imagem da *deconvolução* em marrom convertida para 8 bits; D: seleção da área de marcação (vermelho) utilizando a imagem demonstrada em C.

4.2. Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Instat. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov & Smirnov e os dados com distribuição normal foram submetidos ao teste T com correção de Welch, já os de distribuição não paramétrica, foram comparados por meio dos testes de Mann Whitney ou Kruskal-Wallis complementado pelo teste Dunn. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ($p<0.05$).

5 – RESULTADOS

5.1. Positividade para elastase (neutrófilos)

Nos períodos de 1 e 2 dias após a lesão, houve uma redução significante no número de neutrófilos nas áreas lesionadas dos músculos dos animais tratados com US (teste T, $p = 0,0001$ e $0,0019$ respectivamente) em relação aos animais lesionados e não tratados. Já nos períodos de 3 e 7 dias (Teste T e Mann Whitney respectivamente) pós-lesão, não houve diferença significante entre os grupos tratados com US e os não tratados (figura 3). No tecido muscular dos animais do grupo controle (sem lesão) não foram localizados neutrófilos em nenhum dos períodos experimentais. Na figura 4 estão as imagens histológicas representativas de cada grupo experimental nos diferentes períodos de avaliação. A análise estatística referente à comparação entre os períodos experimentais em cada grupo foi inserida nos anexos.

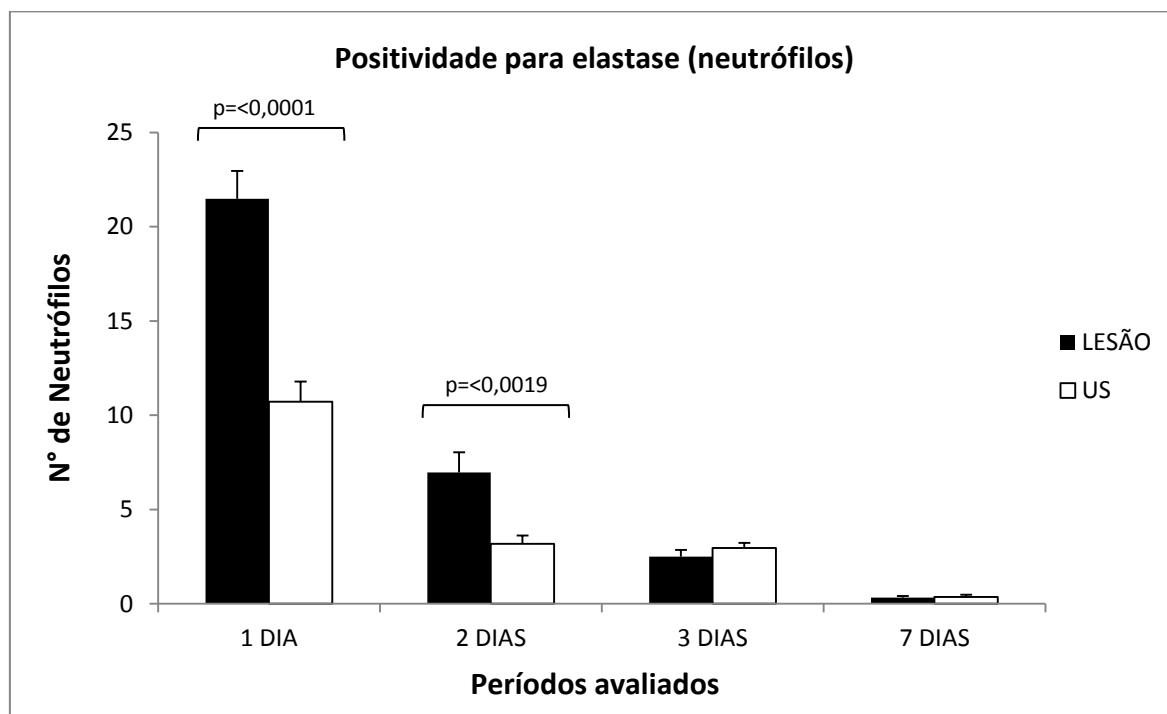


Figura 4. Número de células contadas por meio da imunomarcação com uso do anti-anticorpo elastase. O grupo controle não está representado por não ter apresentado células marcadas. Resultados apresentados em média + erro padrão.

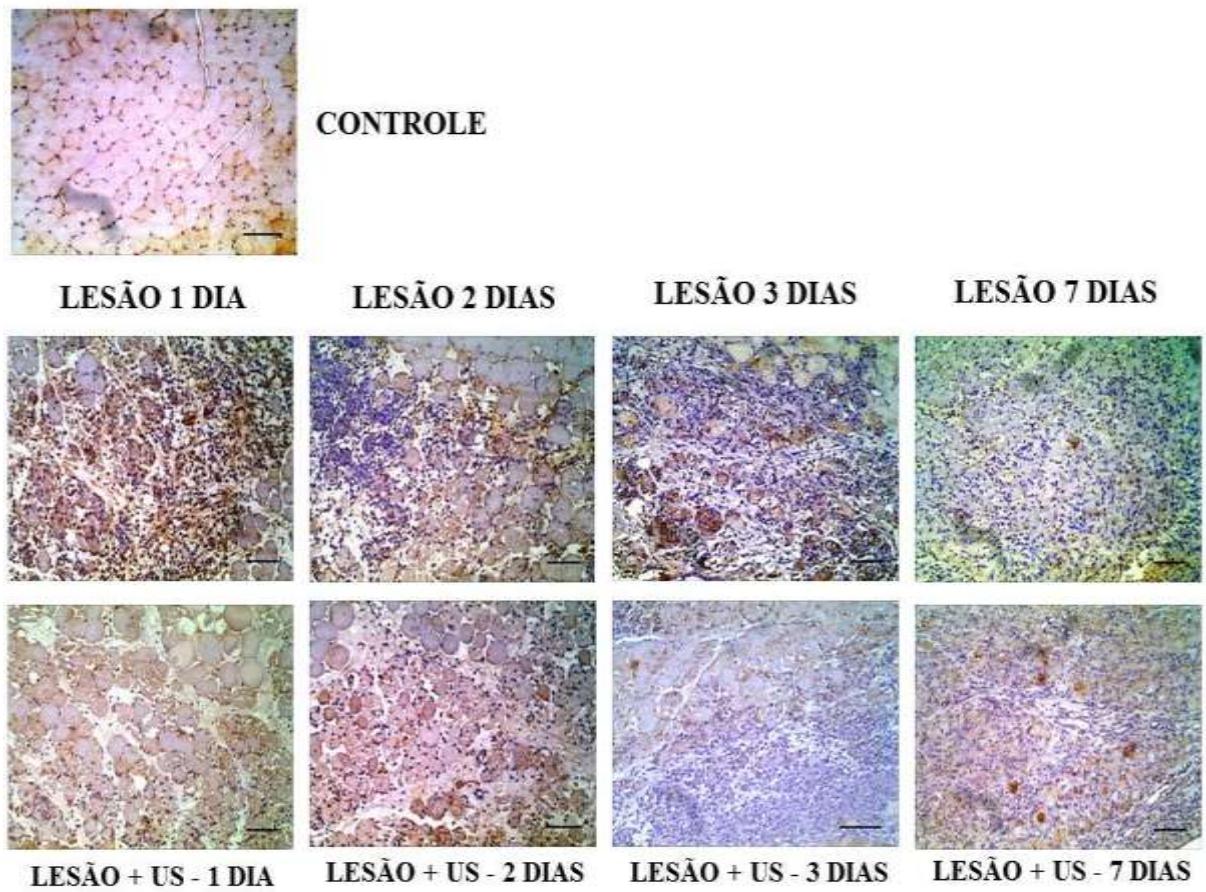


Figura 5. Padrão da imunomarcação para elastase (diaminobenzidina, aumento de 100X, escala de 100 µm).

5.2. Positividade para CD68 (macrófagos)

Após 1 dia da lesão não foi possível observar diferença significante entre os animais tratados com US e não tratados, embora a área marcada tenha sido maior nos animais tratados com US. Nos períodos de 2, 3 e 7 dias houve uma redução significante (teste T, $p = 0,0001$ para os 3 períodos) no percentual de área marcada pelo DAB nos grupos que receberam o tratamento com US em relação aos animais não tratados nos mesmos períodos. No tecido muscular dos animais do grupo controle (sem lesão) não foram encontradas células marcadas em nenhum dos períodos experimentais. Os dados estão apresentados sob forma de gráfico (figura 5) a seguir. Na figura 6 estão as imagens histológicas representativas de cada grupo experimental nos diferentes períodos de avaliação. A análise estatística referente à comparação entre os períodos experimentais em cada grupo foi inserida nos anexos.

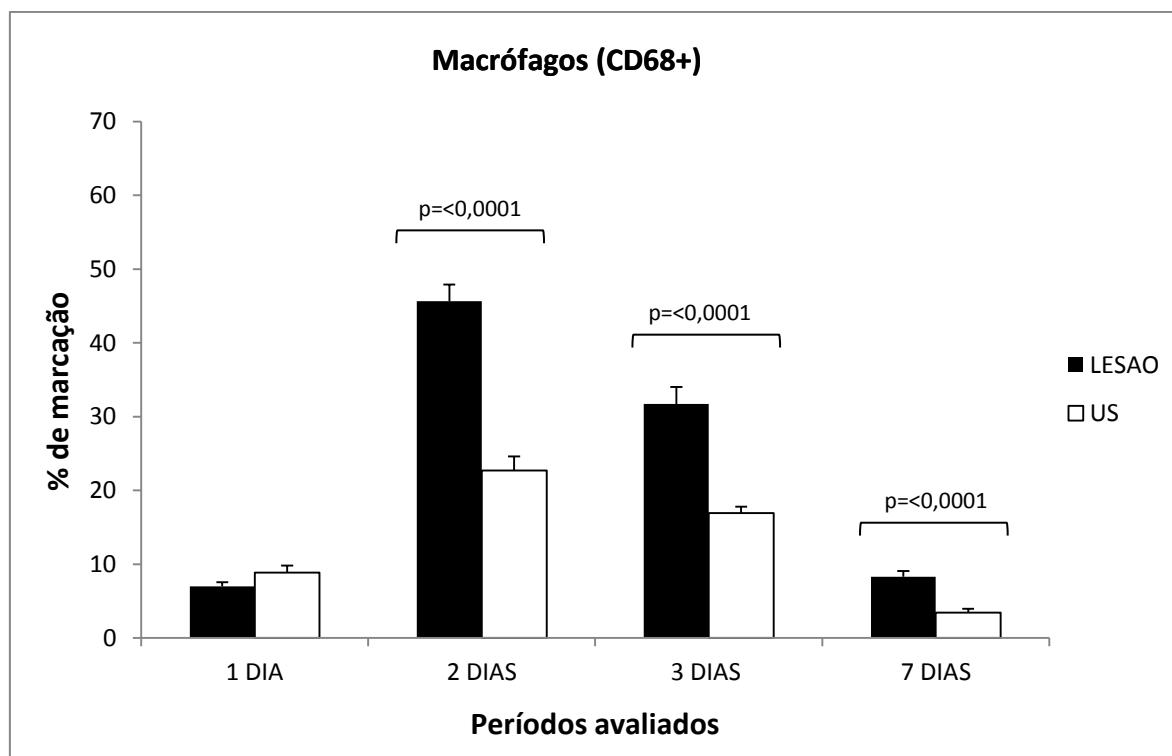


Figura 6. Percentual da área de marcada na imunomarcação para o anticorpo anti CD68; O grupo controle não está representado por não ter apresentado células marcadas. Resultados apresentados em média + erro padrão.

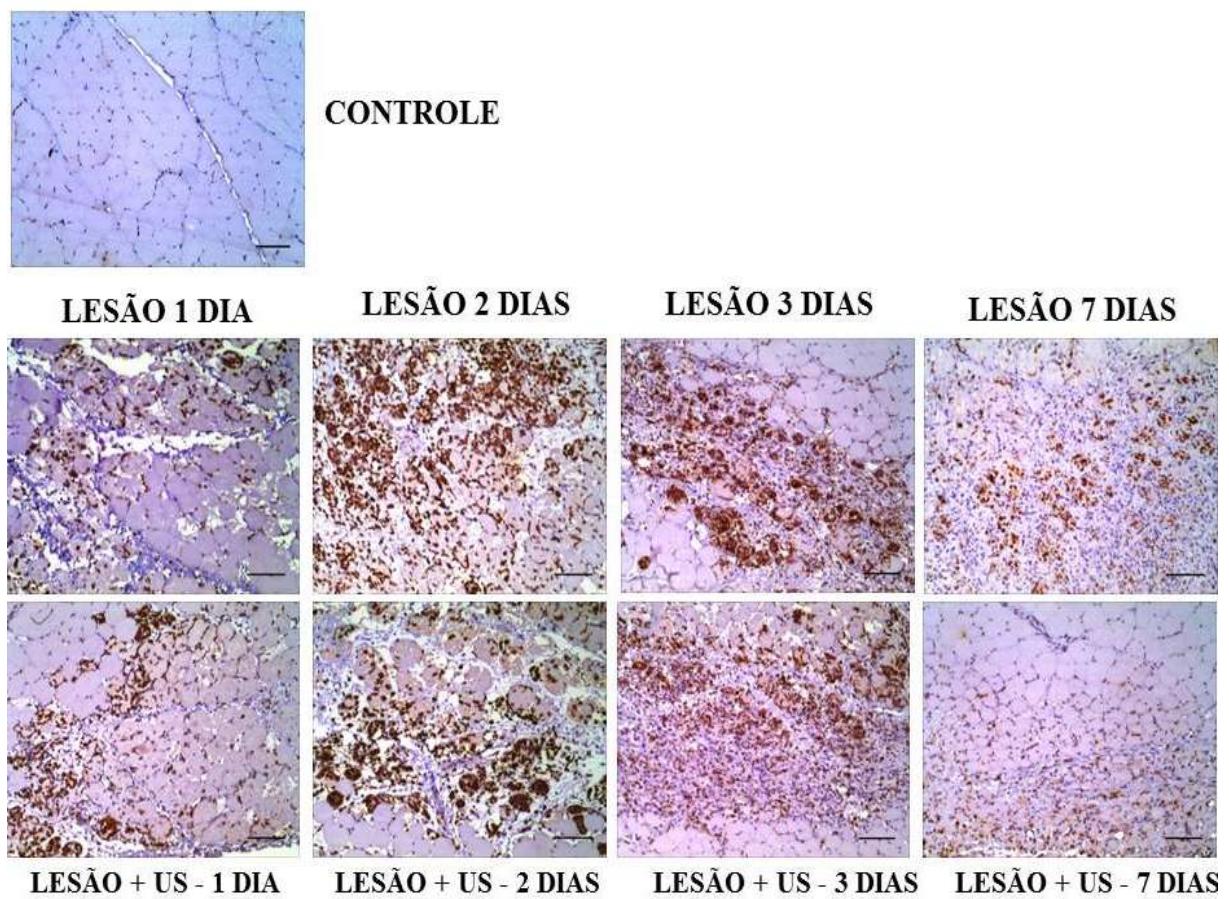


Figura 7. Padrão da imumarciação para CD68 (diaminobenzidina, aumento de 100X, escala de 100 µm).

5.3. Positividade para CD80 (macrófagos M1)

No primeiro dia, a área de marcação de macrófagos de perfil M1 foi maior nos animais tratados com US do que nos animais não tratados (teste T, $p = 0,0239$). Já nos demais períodos (2, 3 e 7 dias), a área de marcação de macrófagos de perfil M1 foi menor nos animais que receberam a terapia com US quando comparada à mesma área nos animais não tratados (teste T e $p = 0,0001$; 0,0058 e 0,0002, respectivamente). No tecido muscular dos animais do grupo controle (sem lesão) não foram encontrados células marcadas em nenhum dos períodos experimentais. Os dados são apresentados sob a forma de gráfico a seguir (figura 7). Na figura 8 estão as imagens histológicas representativas de cada grupo experimental nos diferentes períodos de avaliação. A análise estatística referente à comparação entre os períodos experimentais em cada grupo foi inserida nos anexos.

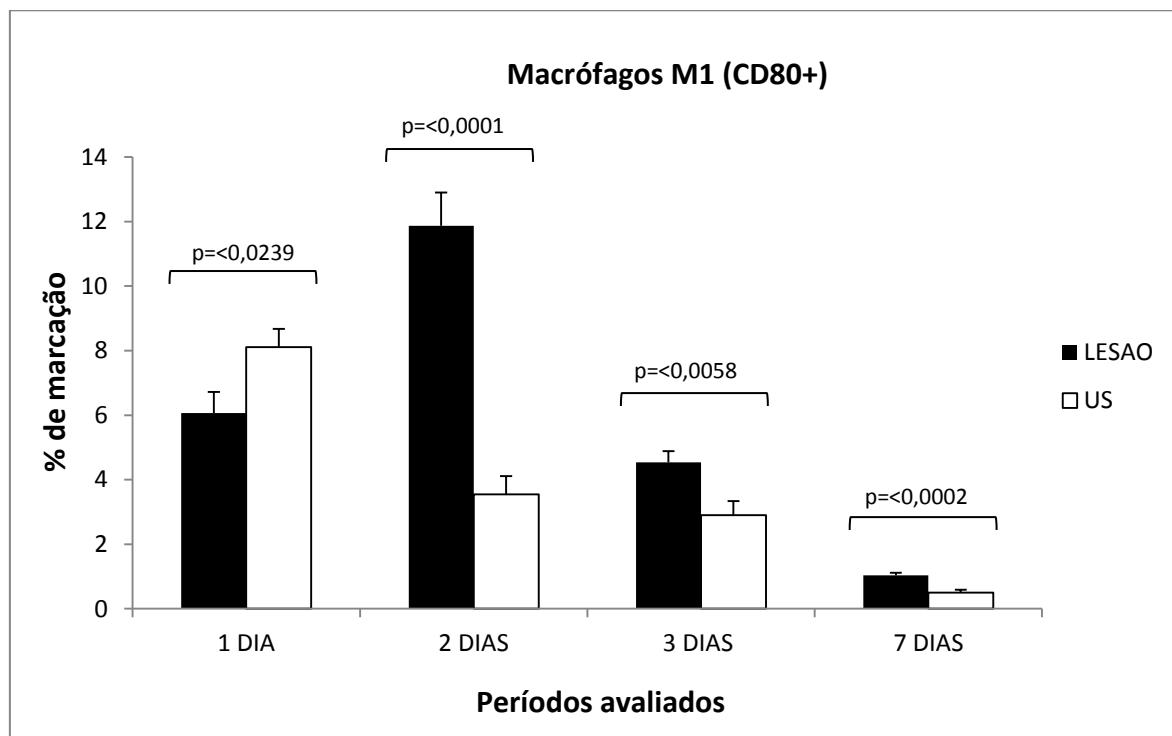


Figura 8. Percentual da área marcada na imunomarcação para o anticorpo anti CD80; O grupo controle não está representado por não ter apresentado células marcadas. Resultados apresentados em média + erro padrão.

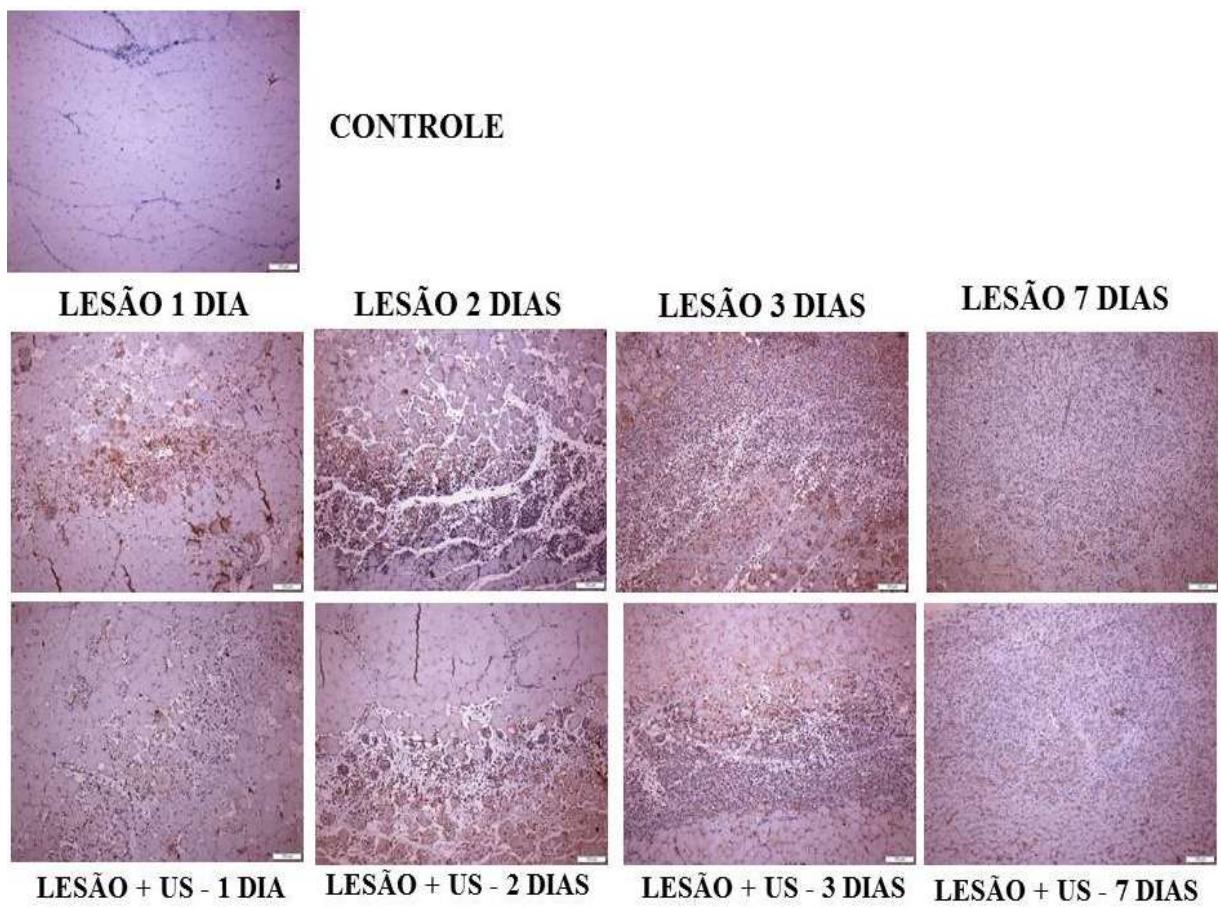


Figura 9. Padrão da imunomarcação para CD80 (diaminobenzidina, aumento de 100X, escala de 100 µm).

5.4. Positividade para CD206 (macrófagos M2a)

No primeiro dia, a área de marcação positiva para CD206 (macrófagos de perfil M2a) foi maior nos animais lesionados do que a verificada nos animais tratados com US, mas esta diferença não foi significante. Em 2 dias a área de marcação positiva para macrófagos de perfil M2a (teste T, $p = 0,0001$) foi menor no grupo tratado com US quando comparada com a área de marcação nos animais que não receberam tratamento. Já após 3 dias da lesão, a área de marcação positiva para macrófagos M2a foi maior nos animais tratados com US do que a verificada nos animais que não receberam o tratamento (teste T, $p = 0,0001$). No tecido muscular dos animais do grupo controle (sem lesão) não foram encontrados células marcadas. Os dados são apresentados sob a forma de gráfico a seguir (figura 9). Na figura 10 estão as imagens histológicas representativas de cada grupo experimental nos diferentes períodos de avaliação. A análise estatística referente à comparação entre os períodos experimentais em cada grupo foi inserida nos anexos.

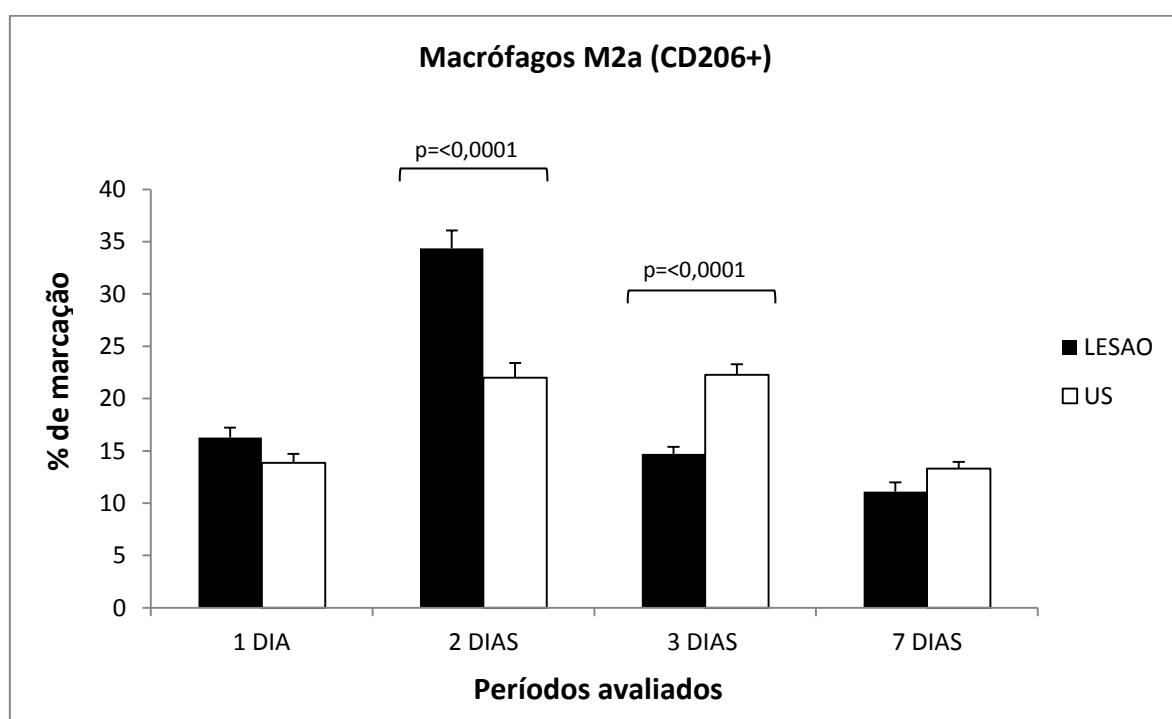


Figura 10. Percentual da área de marcada por imunomarcação para o anticorpo anti CD206; O grupo controle não está representado por não ter apresentado células marcadas. Resultados apresentados em média + erro padrão.

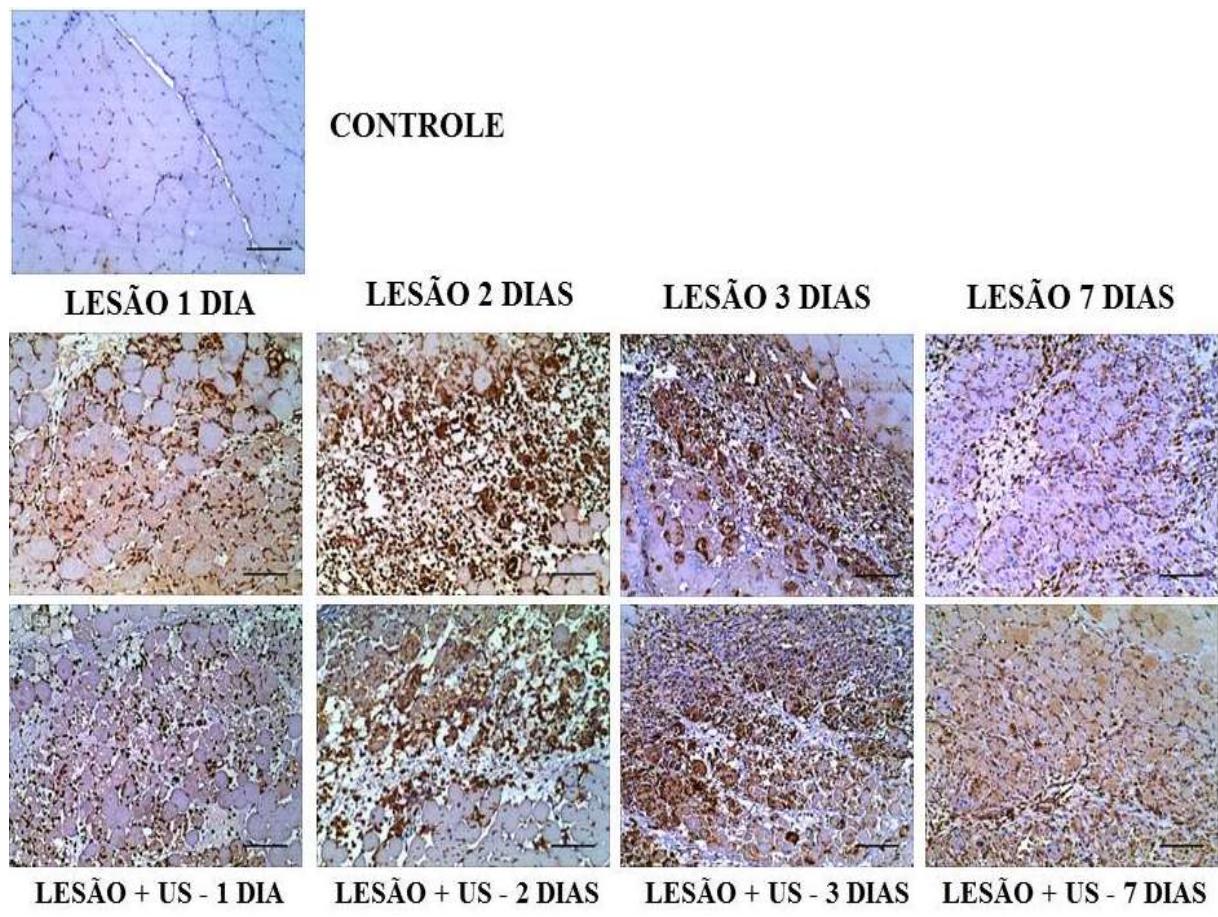


Figura 11. Padrão da imunomarcação para CD206 (diaminobenzidina, aumento de 100X, escala de 100 µm).

5.5. Comparativo entre os grupos e períodos experimentais

Na figura 11 estão reunidos os dados das diferentes marcações para facilitar a interpretação das ocorrências de maneira conjunta.

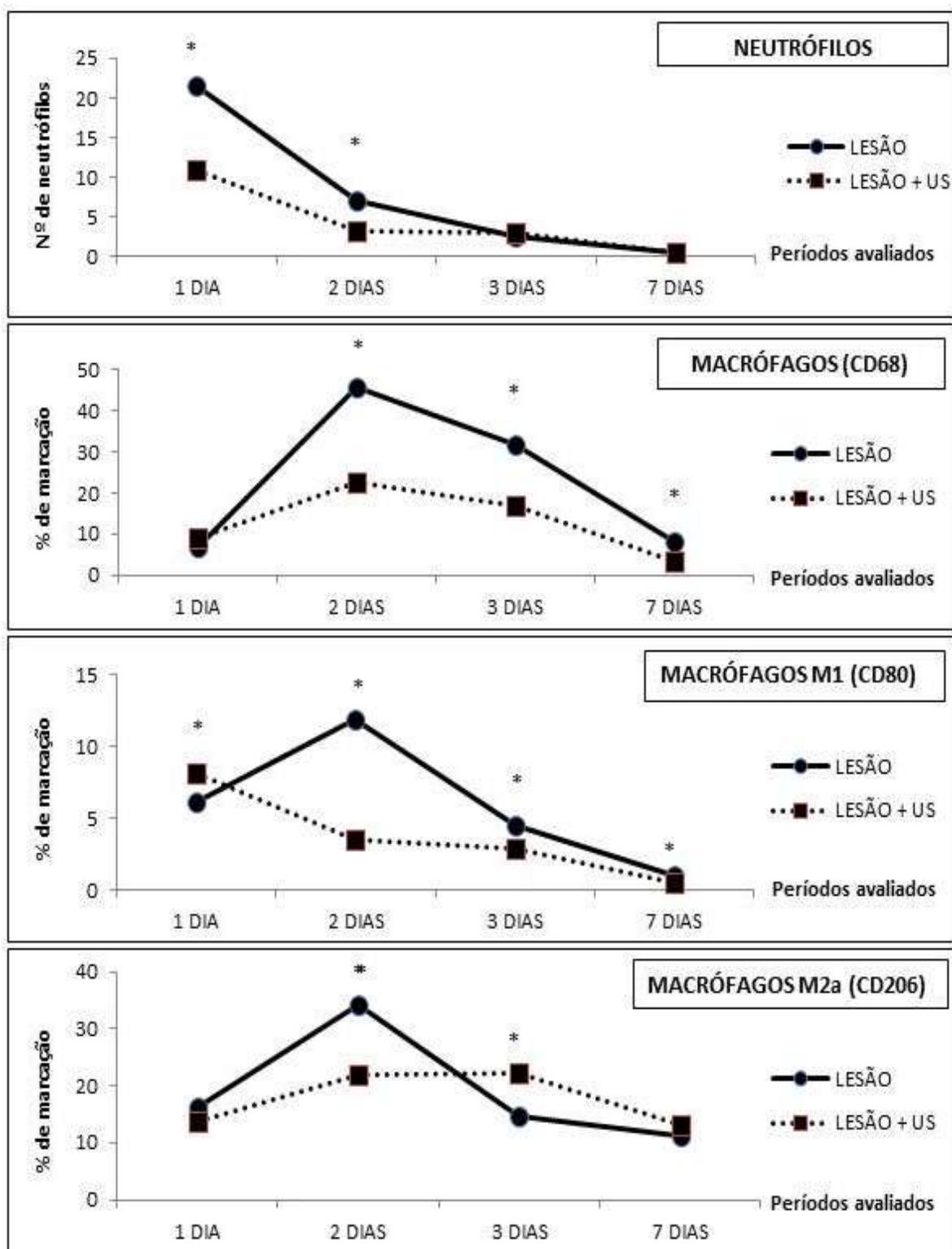


Figura 12. Comparativo entre os marcadores de neutrófilos e macrófagos nos grupos que sofreram apenas lesão e nos que receberam lesão e foram tratados com US. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos em cada período experimental.

6 – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Embora vastamente utilizado na prática clínica para tratamento de lesões musculares, o ultrassom terapêutico ainda não apresenta seus parâmetros dosimétricos básicos e seu mecanismo de ação claramente definidos na literatura (MENDONÇA *et al.*, 2006; PIEDADE *et al.*, 2008; RIBEIRO, 2009; ARTIFON *et al.*, 2012). Os resultados apresentados nesse estudo visam colaborar para a compreensão destas lacunas.

Neste sentido, os parâmetros de frequência e intensidade foram escolhidos de acordo com a análise da literatura que indica resultados positivos com frequências entre 1 e 1,5 MHz e intensidades entre 0,2 e 1 W/cm² sempre no modo pulsado (GOUVÊA *et al.* 1998; MENEZES *et al.* 1999; PINTO *et al.* 2008; PIEDADE *et al.* 2008; ALFREDO *et al.* 2008; e ARTIFON *et al.* 2012) para tratamento de lesões do tecido muscular. Do mesmo modo, foi escolhido um modelo experimental de lesão aguda (criolesão) bem descrito na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2007; RENNÓ *et al.* 2011; SOUZA *et al.*, 2011; BAPTISTA *et al.*, 2011; MONTALTI *et al.* 2013).

Já a determinação de avaliar o tipo de infiltrado presente no tecido muscular após o tratamento com ultrassom está alicerçada no fato de já ser estabelecido na literatura que os macrófagos são considerados células alvo para as intervenções terapêuticas (TIDBALL & VILLALTA, 2010; BOSURGI *et al.*, 2011; SACLIER *et al.*, 2013).

Pela análise dos resultados do grupo de animais lesionados e não tratados, pudemos constatar que os dados encontrados estão de acordo com as descrições de Tidball e Villalta (2010) que relatam que após lesão, o tecido afetado é invadido neutrófilos que atingem seu número máximo nas primeiras 24 horas, com declínio nos dias seguintes. Já a presença de macrófagos do tipo M1 atinge seu pico em 48 horas e declina nos próximos dias. Esse declínio coincide com a chegada dos macrófagos M2 que ocorre por volta do terceiro dia após a ocorrência da lesão. Deste modo, o modelo de criolesão utilizado pode ser considerado um instrumento importante e fidedigno também para

avaliar o efeito de um recurso terapêutico sobre as células inflamatórias presentes durante o processo de reparo do músculo esquelético.

No que tange aos efeitos do US sobre o infiltrado inflamatório, foi possível verificar que o número de neutrófilos (imunomarcação para elastase), presentes na área de lesão nos dias 1 e 2 pós-lesão, foi menor que o destas células nos animais que não receberam o tratamento com US, resultado que pode ser considerado positivo, já que a redução no número dessas células no período considerado de pico (TIDBALL & VILLALTA, 2010) poderia minimizar o dano tecidual gerado pela lise direta da membrana das células musculares pela liberação de espécies reativas de oxigênio, proteases e outros constituintes lisossomais destas células (SMITH *et al.*, 1989; NGUYEN & TIBALL 2003; TIDBALL 2005; BOSURGI *et al.*, 2011).

Já a presença de macrófagos de perfil M1 (positividade para CD80) foi maior no primeiro dia pós-lesão nos tecidos tratados com US. Este fato pode também ser considerado positivo, já que estes macrófagos produzem citocinas, quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento mas também realizam a fagocitose de restos teciduais danificados. Além disso, seus produtos geram a ativação das células precursoras miogênicas que irão substituir as fibras lesionadas (ARNOLD *et al.* 2007; TIDBALL & VILLALTA, 2010; BOSURGI *et al.*, 2011; WEIDENBUSCH & ANDERS, 2012; SACLIER *et al.*, 2013).

Como a perpetuação do processo inflamatório inicial pode ter um efeito deletério no músculo, podendo promover a amplificação da lesão inicial (TIDBALL, 2005), o fato do US reduzir a presença dos macrófagos pró inflamatórios (M1) nos 3 períodos seguintes (2, 3 e 7 dias) também seria um efeito terapêutico importante.

Já os macrófagos de perfil M2a (CD 206 positivos) estão comumente associados aos estágios mais avançados do reparo. No caso do tecido muscular de ratos, ao período de 3 a 14 dias (PESTANA *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2014;)

Os resultados deste trabalho sobre a presença de macrófagos de perfil M2a mostraram uma redução no dia 2 e uma elevação no terceiro e sétimo dia (não significante), sugerindo que o US seria capaz de aumentar o número destas células na fase onde este perfil fenotípico seria mais requisitado.

Já o marcador CD68, embora seja usado para identificação de macrófagos (BARROS *et al.*, 2013; RIGAMONTI *et al.*, 2014.), também pode identificar monócitos, neutrófilos, basófilos e linfócitos ativados (GOODPASTER *et al.*, 2008). Deste modo, podemos interpretar que embora existam referências descrevendo a marcação de outras células, o CD68 é capaz de realizar a marcação em macrófagos, sem distinção do perfil fenotípico.

Dentre os estudos presentes na literatura e descritos nesse trabalho, não há nenhum que faça a mesma avaliação realizada nessa pesquisa, o que impossibilita a comparação direta entre os resultados e torna os dados inéditos. Porém, alguns estudos correlacionam seus resultados ao processo inflamatório.

Gouvêa *et al.* (1998) avaliando o efeito do US (1 MHz, 0,5 W/cm², pulsado 1:5), em lesões por incisão no tibial anterior de ratos, concluíram por avaliação histológica por HE que o tratamento com US promoveu redução no número de macrófagos e neutrófilos nas áreas de lesão em períodos de 3, 7, 14 e 21 dias. Já Freitas *et al.* (2007) descreveram que o US (0,5, 1,0 e 2,0 W/cm², pulsado) aplicado após 12h por 1, 3 e 5 dias no músculo gastrocnêmico de ratos Wistar que receberam laceração, gerou diminuição da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); da produção de catalase e de super óxido dismutase (SOD), o que indicaria uma menor presença das células produtoras destas EROs, ou seja, os neutrófilos e os macrófagos de perfil M1 nestes tecidos, assim como verificado em neste estudo.

Já Alfredo *et al.* (2008) ao avaliarem os efeitos do US com a mesma frequência e intensidade de 0,5 W/cm² usados neste estudo, observaram por meio de análise histológica (HE) que no quarto dia após a lesão havia uma quantidade maior de células inflamatórias (sem especificação de seu subtipo) após nos músculos tratados com ultrassom, como no quarto dia o músculo esquelético lesionado já estaria abrigando uma população de macrófagos de perfil predominantemente M2 (TIDBALL & VILLALTA, 2010), este resultado também iria de encontro ao do presente estudo, onde foi verificado um aumento de marcação positiva para macrófagos de perfil M2a após o terceiro dia da lesão.

O trabalho de Rennó *et al.* (2011) relata que US (1,5 MHz, 30mW/cm², pulsado) aplicado sobre o músculo tibial anterior de ratos que foram criolesionados foi capaz de reduzir a intensidade do quadro inflamatório e a imunomarcação da enzima ciclooxygenase 2 (COX-2) quando comparados aos resultados obtidos nos animais lesionados e não tratados. Como as células de perfil pro-inflamatório como neutrófilos e macrófagos M1 induzem a produção de COX-2 no local da lesão (SCHONBECK *et al.*, 1999; BONDESEN, 2004; RICCIOTTI *et al.*, 2011), os achados destes autores estariam também sendo corroborados pelos do presente estudo. Montalti e seus colaboradores (2013) avaliando o efeito do US (1,5 MHz, 30mW/cm², pulsado) no reparo muscular de tibial anterior (TA) de ratos que receberam criolesão, relataram aumento na expressão de COX-2 após 7 e 13 dias nos animais tratados com US quando da comparação com os não tratados, porém em ambos os períodos experimentais ainda havia processo inflamatório de grande monta, o que só ocorreu no primeiro dia do pós-operatório no presente estudo.

Os achados do presente estudo estão em sintonia com os relatados por Shu *et al.* (2012) quando da avaliação dos efeitos do US (3 MHz, 0,25 W/cm², 0,50 W/cm² e 0,75 W/cm², pulsado) sobre o reparo muscular após lesão por esmagamento no músculo gastrocnêmico de ratos, que indicaram por análise histológica (HE) um quadro inflamatório menos intenso e com menor número de células inflamatórias em todos grupos tratados com US após 4 e 7 dias quando da comparação com o grupo não tratado.

Em resumo, os resultados do presente estudo demonstram que o ultrassom pulsado de baixa intensidade é capaz de reduzir o número de neutrófilos e macrófagos M1 nos períodos iniciais do processo de reparo e ampliar a presença de macrófagos M2a na fase mais tardia do reparo, o que de maneira conjunta traria uma modulação positiva, ampliando a chance de reparo por regeneração.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFREDO, P.P.; ANARUMA, C.A.; PIÃO, A.C.S.; AMADO, S.M.; CASAROTTO, R.A. **Análise qualitativa dos efeitos da sonoforese com Arnica montana sobre o processo inflamatório agudo do músculo esquelético de ratos.** Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo, v.15, n.3, p.273-9, jul./set. 2008

ALVES, A.N.; PESTANA, P.R.D.; FERNANDES, K.P.S.; SILVA JUNIOR, J.A.; FRANÇA, C.M.; MARTINS, M.D.; BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. **Efeito da natação na expressão de fatores regulatórios miogênicos durante o reparo do musculoesquelético de rato.** Rev Bras Med Esporte – Vol. 18, No 6 – Nov/Dez, 2012.

ARNOLD, L; HENRY, A; PORON, F; BABA-AMER, Y; VAN-ROOIJEN, N. PLONQUET A, GHERARDI, R.K; CHAZAUD, B. **Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis.** 2007, J Exp Med 204(5): 1057-1069.

ARTIFON, E.L.; FERRARI, D.; CUNHA, D.M.; NASCIMENTO, C.M.; RIBEIRO, L.F.C.; BERTOLINI, G.R.F. **Efeitos do ultrassom terapêutico associados ao alongamento estático sobre parâmetros histomorfométricos longitudinais de sóleos imobilizados de ratos.** Rev Bras Med Esporte vol.18 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2012

BAPTISTA, J.; MARTINS, M.D.; PAVESI, V.C.S.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S.; JUNIOR, D.S.P.; MESQUITA-FERRARI, R.A. **Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats.** Photomed Laser Surg. v. 29, n. 1, p. 11-17, 2011.

BARROS, M.HM; FRANZISCA, H; JOHANNES, H.D; BETTINA, K; GERALD, N. **Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages.** PLoS One. 2013; 8 (11): e80908.

BONDESEN, B.A; MILLS, S.T; KEGLEY, K.M; PAVLATH, G.K. **The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration.** Am J Physiol Cell Physiol 287: C475–C483, 2004

BOSURGI, L.; MANFREDI, A.A.; QUERININI, P.R. **Macrophages in injured skeletal muscle: a perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration.** Frontiers in Immunology, 2011.

BRIGITTE, M.; SCHILTE C.; PLONQUET, A.; BABA-AMER, Y.; HENRI, A.; CHARLIER, C.; TAJBAKHSH, S.; ALBERT, M.; GHERARDI, R.K.; CHRÉTIEN, F. **Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury.** Arthritis Rheum. 2010 Jan;62(1):268-79. doi: 10.1002/art.27183.

BUTTERFIELD, T.A.; BEST, T.M.; MERRICK, M.A. **The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair.** J Athl Train 2006;41:457–65

CHANDRAN, R.; KNOBLOCH, T.J.; ANGHELINA, M.; AGARWAL, S. **Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation.** Am J Physiol Cell Physiol. 2007;293:C267-76

CHAN, Y.S., HSU, K.Y.; KUO, C.H.; LEE, S.D.; CHEN, S.C.; CHEN, W.J.; UENG, S.W.N.; **Using low-intensity pulsed ultrasound to improve muscle healing after laceration injury: an in vitro and in vivo study.** Ultrasound in Med & Biol., Vol. 36, No 5. 743 – 751, 2010.

EMILY, H.; SHIN, M.D.; EDWARD, J.; CATERSON, M.D.; JACKSON, W.M.; NESTI, L.J.; **Quality of healing: defining, quantifying, and enhancing skeletal muscle healing.** Wound Rep Reg (2014) 22 18–24 2014

FREITAS, L.B.S.; FREITAS, T.P.; ROCHA, L.G.; SILVEIRA, P.; PINHO, R.A.; Streck EL. **Effect of therapeutic pulsed ultra-sound on parameters of oxidative.** Cell Biology International 2007; 31:482-488.

GINDERACHTER, J.A.; MOVAHEDI, K.; GHASSABEH, G.H.; MEERSCHAUT, S.; BESCHIM, A.; RAES, G.; BAETSELIER, P.D. **Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion.** Immunobiology, v.211, p.487-501, 2006.

GOODPASTER, T; LEGESSE-MILLER, A. HAMEED, M.R; AISNER, S.C; RANDOLPH-HABECKER, J; COLLER, H.A. **An Immunohistochemical Method for Identifying Fibroblasts in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2008;56(4):347-358. doi:10.1369/jhc.7A7287.2007.

GOUVÊA, C.M.C.P.; VIEIRA, P.M.N.; AMARAL, A.C. **Efeito do ultra-som na recuperação de músculo tibial anterior de rato lesado.** Rev Univ Alfenas. 1998;4:165-73.

KARNES, J.L.; BURTON, H.W. **Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats.** Arch Phys Med Rehabil. 2002;83(1):1-4.

LAI, J.; PITTELKOW, M.R. **Physiological effects of ultrasound mist n fibroblast.** Int J Dermatol 2007;46:587-93.

LANDINI, G. **Color deconvolution using imageJ.** 2010. Available from <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>

MARKERT, C.D; MERRICK MA,; KIRBY TE,; DEVOR ST. **Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration.** Arch Phys Med Rehabil. 2005;86:1304-10.

MCBRIER, N.M.; LEKAN, J.M.; DRUHAN, L.J.; DEVOR, S.T.; MERRICK, M.A. **Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury.** Arch Phys Med Rehabil. 2007;88:936-40.

MENDONÇA, A.C.; FERREIRA, A.S.; BARBIERI, C.H.; THOMAZINE, J.A.; MAZZER, N. **Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intensão de lesão cutânea total em ratos.** Acta Ortop Bras. 2006;14(3):152-7.

MENEZES, D.F.; VOLPON, J.B.; SHIMANO, A.C. **Aplicação de ultra-som terapêutico em lesão muscular experimental aguda.** Rev Bras Fisioter. 1999;4:27-31.

MESQUITA-FERRARI, R.A.; MARTINS, M.D.; SILVA, J.A.Jr.; DA SILVA, T.D.; PIOVESAN, R.F.; PAVESI, V.C.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S. **Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process.** Lasers Med Sci. v. 26, n. 3, p. 335-40, 2011.

MIYABARA, E.H.; AOKI, M.S.; SOARES, A.G.; MORISCOT, A.S. **Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A.** Cell Tissue Res 319:479-89, 2005.

MIZRAHI, N.; SELIKTAR, D.; KIMMEL, E. **Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells.** Ultrasound Med Biol 2007; 33(11): 1818-1829.

MONTALTI, C.S.; SOUZA, N.V.; RODRIGUES, N.C.; FERNANDES, K.R.; TOMA, R.L.; RENNO, A.C. **Effects of low-intensity pulsed ultrasound on injured skeletal muscle.** Braz J Phys Ther. 17(4):343-50, 2013.

NGUYENN, X.H; TIDBALL, J.G; **Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice.** 10.1113/jphysiol.2003.040907.

NOVAK, M.L.; KOH, T.J.; **Macrophage phenotypes during tissue repair.** Volume 93, June 2013. Journal of Leukocyte Biology.

OLIVEIRA, N.M.L.; GAVA, A.D.; SALVINI, T.F. **Crioterapia na lesão muscular: uma análise morfométrica.** Rev bras fisioter. V. 11, N. 5, P. 2, 2007.

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 immobilizes rat soleus muscle.** Ultrasound Med Biol. 2009;35(2):237-44.

PADILLA, E.; PUTS, R.; LAURENCE, V.I.C.O.; RAUM, K. **Stimulation of bone repair with ultrasound: A review of the possible mechanic effects.** Ultrasonics 54 (2014) 11-25- 11.45.

PESTANA, P.R.D; FERNANDES, K.P.S; VALLIO, C.S; ROCHA, D.A.M; MARTIS, M.D; BUSSADORI, S.K; MESQUITA-FERRARI, R.A. **Natação e aspectos morfológicos do músculo esquelético em processo de reparo após criolesão.** Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo, v.18, n.3, p. 264-9, jul/set. 2011.

PIEDADE, M.C.B.; GALHARDO, M.S.; BATTLEHNER, C.N.; FERREIRA, M.A.; CALDINI, E.G.; TOLEDO, O.M.S. **Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats.** Ultrasonics. 2008;48:403–11.

PINTO, M.V.M.; COSTA, D.A.; ROCHA, L.L.V.; SANTOS, H.R.; SILVA, A.L.S.; BARBOSA, L.G.; 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.

PLENTZ, R.D.M.; STOFFEL, P.B.; KOLLING, G.J.; COSTA, S.T.; BECK, C.; SIGNORI, L.U. Alterações hematológicas provocadas pelo ultra-som de 1Mhz na forma continua aplicada no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. Rev Bras Fisioter. 2008;12 (6): 495-501

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(1):54-9

RENNÓ, A.C.; TOMA, R.L.; FEITOSA, S.M.; FERNANDES, K.; BOSSINI, P.S.D.E.; OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.; RIBEIRO, D. A. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. Photomed Laser Surg. Jan;29(1):5-10, 2011.

RICCIOTTI, E; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2011;31(5):986-1000.

RIGAMONTI, E; ROVERE, S; QUERINI, P; ORDA, P; SCIORTI,C; BRUELLI, S. Macrophage Plasticity in Skeletal Muscle Repair. BioMed Research International ; 2014:560629. DOI: 10.1155/2014/560629

RIBEIRO, R.; MESQUITA-FERRARI, R.A.; CORREA, JCF.; BUSSADORI, SK.; MARTINS, M.D.; FERNANDES, K.P.S. Efeito do ultrassom terapêutico em músculo esquelético: revisão sistemática. Ter Man. 2010; 8(51): 200-204.

SACLIER, M.; CUVELLIER, S.; MAGNAN, M.; MOUNIER, R.; CHAZAUD, B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells

during skeletal muscle regeneration. FEBS Journal 280 (2013) 4118–4130.

SCHÖNBECK, U; SUKHOVA, G.K; GRABER, P.S; COULTER, L.P. **Expressão aumentada de ciclo-oxigenase-2 em lesões ateroscleróticas humanas.** Am J Pathol. 1999; 155: 1281-1291

SHU, B.; YANG, Z.; LI, X.; ZHANG, L.Q. **Effect of different pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion.** Cell Biochem Biophys (2012) 62; 329 – 336.

SIGNORI, L.U.; COSTA, S.T.; NETO, A.F.; PIZZOLOTTO, R.M.; BECK, C.; SBRUZZI, G.; SILVA, AM.; PLENTZ, RD. **Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats.** Physiotherapy. v. 97, p. 163–169, 2011

SMITH, J.; M.D, JONATHAN, T.; FINNOFF, D.O. **Diagnostic and Interventional Musculoskeletal Ultrasound: Part 1.** Fundamentals American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation 1934-1482/09/\$36.00 Vol. 1, 64-75, January 2009.

SOUZA, T.O.; MESQUITA, D.A.; FERRARI, R.A.; DOS SANTOS PINTO D JR.; CORREA, L.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S.; MARTINS, MD. **Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair.** Lasers Med Sci. v, 26. n, 6. p, 803-14, 2011.

SPEED, C.A. **Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions.** Rheumatology 40: 1331–1336, 2001.

TER HAAR, G. **Basic physics of therapeutic ultrasound.** Physiotherapy, v.64, n.4, p.100-103, 1999.

TIDBALL, J.G. **Inflammatory processes in muscle injury and repair.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005;288:R345-R353.

VILLALTA, S.A., NGUYEN, H.X., DENG, B., GOTOH, T., TIDBALL, J.G., 2009. **Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy.** Hum Mol Genet 18, 482-496.

TIDBALL, J.G.; VILLALTA, S.A. **Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 298:R1173-R1187, 2010.

WATANUKI, M.; KISHIMOTO, K.N.; KOTAJIMA, S. IWABUCHI, S.; KOKUBUN, S. **Effect of low-intensity pulsed ultrasound on scaffold-free ectopic bone formation in skeletal muscle.** Ups J Med Sci. 114(4):242-8, 2009.

WEIDENBUSCH, M & ANDERS, H.A. **Tissues Use Resident Dendritic Cells and Macrophages to Maintain Homeostasis and to Regain Homeostasis upon Tissue Injury: The Immunoregulatory Role of Changing Tissue Environments.** Mediators of Inflammation. 2012, Article ID 951390, :10.1155/2012/951390,

WILKIN, L.D.; MERRICK, M.A.; KIRBY, T.E.; DEVOR, S.T. **Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion.** Int J Sports Med. 2004;25:73-7.

8. ANEXOS

Aprovação do comitê de uso e ética em experimentação animal, UNINOVE



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº An0026/2014

Título do Projeto: Interferência do ultrassom terapêutico no reparo muscular.

Orientador: Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

Alunos: Evaldo Moreira da Silva Junior
Jacira Souza Ribeiro

Objetivos:

Objetivo geral

- Analisar o efeito do UST no reparo do músculo esquelético de rato.

Objetivos específicos

- Avaliar *in vivo* a capacidade do UST em modular o perfil fenotípico de macrófagos presentes no tecido muscular de ratos durante o processo de reparo após lesão.
- Avaliar o efeito do UST na expressão de IL-6 e de TNF- α durante o processo de reparo muscular após lesão.
- Avaliar os efeitos do UST sobre os aspectos morfológicos do tecido muscular durante o processo de reparo após lesão.
- Avaliar o efeito do UST sobre a distribuição e organização do colágeno durante o processo de reparo após lesão.
- Avaliar o efeito do UST sobre atividade da metaloprotease de matriz 2 durante o processo de reparo após lesão.

Método:

Serão utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*: var. albinus, Rodentia, Mammalia) machos, da linhagem Wistar, com dois meses de idade e massa corporal 200±15 gramas, a serem mantidos no biotério da UNINOVE. Os animais serão mantidos em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente (22°C), umidade relativa (40%), luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escurro) e com comida e água ad libitum. O estudo será conduzido após aprovação do Comitê de Ética em animais da Universidade Nove de Julho.

Os animais serão distribuídos aleatoriamente em 03 grupos experimentais

- **Grupo 1 - Controle:** Os animais não serão submetidos a nenhum procedimento com remoção do músculo tibial anterior (TA) após eutanásia (n=5);
- **Grupo 2 - Criolesão sem tratamento:** Os animais serão apenas criolesionados no músculo tibial anterior direito (TAD) e não receberão tratamento (n=20);
- **Grupo 3 - Criolesão tratado com US:** Os animais serão criolesionados no músculo TAD e tratados com UST (n=20);

Os animais dos grupos 2 e 3 serão eutanasiados após 1, 2, 3 e 7 dias da lesão (TIDBALL & VILLALTA, 2010), sendo 5 animais por período totalizando 20 animais por grupo.

Procedimento de criolesão

Os procedimentos cirúrgicos serão realizados de acordo com o descrito por MIYABARA et al. (2005) e MESQUITA-FERRARI et al. (2011). Os animais serão pesados e em seguida anestesiados proporcionalmente à massa corporal com administração intraperitoneal de 100 mg/kg com ketamina a 10% (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 10 mg/Kg com xilazina 2% (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia serão 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 bocal trifacetado. Posteriormente à indução anestésica, os animais serão posicionados em uma superfície plana e realizado a tricotomia da região correspondente ao músculo TA.

O músculo TA será exposto cirurgicamente e submetido ao procedimento de criolesão, que consistirá na aplicação de um bastão metálico de extremidade plana (3 mm de diâmetro) que será previamente resfriado em nitrogênio líquido, diretamente na superfície do músculo TA exposto e mantido nessa posição por 10 segundos. Após o descongelamento da área (30 segundos), o procedimento será repetido na mesma área por mais 10 segundos. Após esse procedimento será realizada a sutura utilizando-se fio de poliamida (5,0) e os animais serão mantidos em caixas plásticas com temperatura ambiente de (37°C) até ficarem conscientes para prevenir a hipotermia, além de serem medicados com analgésico.

O modelo de lesão muscular por meio de crioleão foi o escolhido para este estudo devido ao fato deste ser um modelo no qual se consegue executar uma lesão bem delimitada na superfície ventral do músculo, de forma padronizada e com pouca variabilidade na severidade da lesão (BAPTISTA et al., 2011).

Procedimento de tratamento com US

No grupo que será lesionado e tratado com UST, os animais serão contidos manualmente e serão submetidos ao tratamento diário com US terapêutico Sonomaster Microcontrolled comunicator (KW Eletrônica, Amparo, SP, Brasil) utilizando gel como agente acoplador, modo de aplicação estacionário sobre a área lesionada, no modo pulsado à 1/4, ciclo de trabalho, em frequência de 1MHz, intensidade de 0,4 W/cm², durante 3 minutos (SIGNORI et al., 2011; ARTIFON et al., 2012).

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):

Espécie (nome vulgar, se existir): Wistar (*Rattus norvegicus*)

Procedência: Biotério

Quantidade: 45 machos

Peso: 200-250g

Condições de alojamento e nutrição:

Alimentação: ração para roedores à vontade.

Fonte de água: à vontade.

Lotação: 5 animais por caixa.

Exaustão do ar: sim.

Os animais serão mantidos no biotério da UNINOVE – unidade Vergueiro em caixas plásticas apropriadas, num máximo de 5 animais por caixa, a temperatura ambiente (22°C) e luminosidade controlados com ciclo de 12 horas. A comida e água serão ad libitum em garrafinhas posicionadas na grade da gaiola, a comida estará disponível na grade da gaiola. O Biotério possui exaustor.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:

Estresse intencional; Uso de anestésico e analgésico.

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):

Anestésico: Os animais serão pesados e em seguida anestesiados proporcionalmente à massa corporal com administração intraperitoneal de 100 mg/kg com ketamina a 10% (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 10 mg/Kg com xilazina 2% (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia serão 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 bocal trifacetado.

Fármaco Anestésico	Ketamina
Dose (UI ou mg/kg)	100 mg/ Kg
Via de administração	Intrapерitoneal
Fármaco / relaxante muscular	Xilazina
Dose (UI ou mg/kg)	10 mg/Kg
Via de administração	Intrapерitoneal

Analgésico:

Manter os animais em gaiolas com aquecimento para prevenir hipotermia.

Fármaco	Tramal
Dose (UI ou mg/kg)	5 mg/kg
Via de administração	Intrapерitoneal
Frequência	12/12 hrs por 3 dias

Eutanásia:

Após o período experimental de cada grupo, os animais serão eutanasiados utilizando superdose de anestésico. Em seguida, os animais serão pesados e os músculos TA serão retirados e pesados. O músculo TA será seccionado ao meio, sendo metade da amostra colocada em formol tamponado a 10% para análise histológica e a outra metade armazenada em freezer -70°C até a realização de análise da atividade da MMP-2.

Descrição	Superdose de anestésico (4x o volume usado para anestesia)
Substância, dose, via	400 mg/Kg de Ketamina + 40 mg/Kg de Xilazina, via intraperitoneal.

Pertinência e valor científico do estudo proposto:

A ação terapêutica através do ultrassom vem ganhando destaque nas pesquisas atuais. Embora essa técnica seja vastamente utilizada na clínica, são poucos os estudos sobre a mesma. Os resultados apresentados na literatura apontam controvérsias nos parâmetros dosimétricos escolhidos para aplicação, no entanto indicam interferências positivas da técnica em muitos aspectos relacionados ao reparo muscular. Pontuar a ação terapêutica do ultrassom e delimitar um padrão dos parâmetros dosimétricos ganham importância no meio científico. A investigação da ação do ultrassom e os seus efeitos sobre o tecido apresentam lacunas a serem preenchidas por novas descobertas.

Data de Início: 01/10/2014

Data de término: 01/02/2016

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

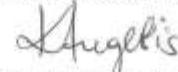
() Não-Aprovado

Comentários:

- Readequar o peso dos animais descrito no formulário ao projeto, no projeto descreve com dois meses de idade e massa corporal 200 ± 15 gramas e no formulário entregue descreve 200/ 250g.

- Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

São Paulo, 23 de setembro de 2014.



Prof. Dra. Kátia De Angelis
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

8.1 Artigo Submissão

MS ID#: JEXBIO/2016/139113

MS TITLE: EFFECT OF LOW INTENSITY PULSED ULTRASOUND ON THE INFLAMMATORY INFILTRATE PRESENT IN SKELETAL MUSCLE AFTER ACUTE INJURY

AUTHORS: Evaldo Moreira da Silva Junior, Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, Cristiane Miranda Franca, Sandra Kalil Bussadori, Nadhia Costa Souza and Kristianne Porta Santos Fernandes

Dear Kristianne Fernandes,

The file(s) for manuscript JEXBIO/2016/139113 have been successfully included on the JEB online submission system.

If you have any problems, please contact the Editorial Office

Thank you for submitting to Journal of Experimental Biology.

Best wishes,

Editorial Office

Journal of Experimental Biology
The Company of Biologists Ltd
Bidder Building
Station Road-
Histon, Cambridge, CB24 9LF
Phone:44 (0)1223 632871
Fax:44 (0)1223 632873

Registered office:The Company Of Biologists Ltd, Bidder Building, Station Road, Histon, Cambridge, CB24 9LF, UK. Registered in England and Wales. Company Limited by Guarantee No. 514735. Registered Charity No. 277992

The information contained in this message and any attachment is confidential, legally privileged and is intended for the addressee only. Any dissemination, distribution, copying, disclosure or use of this message/attachment or its contents is strictly prohibited and may be unlawful. No contract is intended or implied unless confirmed by hard copy.

If you have received this message in error, please inform the sender and delete it from your mailbox or any other storage mechanism.

The Company of Biologists Limited cannot accept liability for any statements made which are clearly the senders' own and not expressly made on behalf of the Company of Biologists Limited or one of their agents.

8.2. Comparação entre os períodos experimentais: lesão x lesão e US x US

→ Os resultados para cada imunomarcação foram submetidos à análise estatística para comparação entre os períodos experimentais nos animais que sofrerem apenas lesão e de modo igual, para os animais que foram lesionados e tratados com US. Essa análise é apresentada a seguir:

- Marcação de neutrófilos (elastase+)

Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA)				Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA)			
The P value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column medians is significantly greater than expected by chance.				The P value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column medians is significantly greater than expected by chance.			
The P value is approximate (from chi-square distribution) because at least one column has two or more identical values.				The P value is approximate (from chi-square distribution) because at least one column has two or more identical values.			
<u>Calculation detail</u>				<u>Calculation detail</u>			
Group	Number of Points	Sums of Ranks	Mean of Ranks	Group	Number of Points	Sums of Ranks	Mean of Ranks
Dia 1 Lesão	42	6150.8	146.44	Dia 1 US	44	5499.5	124.99
Dia 2 Lesão	80	4948.8	60.970	Dia 2 US	27	2175.0	80.556
Dia 3 Lesão	80	2321.8	77.300	Dia 3 US	46	3617.0	78.630
Dia 7 Lesão	80	1987.8	39.180	Dia 7 US	49	1111.5	27.788
Kruskal-Wallis Statistic KW = 111.90 (corrected for ties)				Kruskal-Wallis Statistic KW = 97.716 (corrected for ties)			
<u>Dunn's Multiple Comparisons Test</u>				<u>Dunn's Multiple Comparisons Test</u>			
Comparison	Mean Rank Difference	F value	P value	Comparison	Mean Rank Difference	F value	P value
Dia 1 Lesão vs. Dia 2 Lesão	37.470 ***	P<0.001		Dia 1 US vs. Dia 2 US	44.430 ***	P<0.001	
Dia 1 Lesão vs. Dia 3 Lesão	89.057 ***	P<0.001		Dia 1 US vs. Dia 3 US	46.355 ***	P<0.001	
Dia 1 Lesão vs. Dia 7 Lesão	107.29 ***	P<0.001		Dia 1 US vs. Dia 7 US	97.201 ***	P<0.001	
Dia 2 Lesão vs. Dia 3 Lesão	11.587 ns	P>0.05		Dia 2 US vs. Dia 3 US	1.926 ns	P>0.05	
Dia 2 Lesão vs. Dia 7 Lesão	49.820 ***	P<0.001		Dia 2 US vs. Dia 7 US	32.748 ***	P<0.001	
Dia 3 Lesão vs. Dia 7 Lesão	30.230 **	P<0.01		Dia 3 US vs. Dia 7 US	50.940 ***	P<0.001	

- Marcação de macrófagos (CD68+)

One-way Analysis of Variance (ANOVA)				One-way Analysis of Variance (ANOVA)			
The F value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance.				The F value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance.			
<u>Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test</u> If the value of q is greater than 3.711 then the P value is less than 0.05.				<u>Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test</u> If the value of q is greater than 3.706 then the P value is less than 0.05.			
Comparison	Mean Difference	q	F value	Comparison	Mean Difference	q	F value
lesão 1 dia vs lesão 2 dia	-36.454	24.020 ***	P<0.001	US 1 dia vs US 2 dia	-13.879	12.786 ***	P<0.001
lesão 1 dia vs lesão 3 dia	-24.720	18.073 ***	P<0.001	US 1 dia vs US 3 dia	-3.134	8.756 ***	P<0.001
lesão 1 dia vs lesão 7 dia	-1.706	0.7497 ns	P>0.05	US 1 dia vs US 7 dia	3.495	8.029 ***	P<0.001
lesão 2 dia vs lesão 3 dia	13.594	8.523 ***	P<0.001	US 2 dia vs US 3 dia	5.773	8.319 **	P<0.01
lesão 2 dia vs lesão 7 dia	37.947	23.341 ***	P<0.001	US 2 dia vs US 7 dia	18.284	17.766 ***	P<0.001
lesão 3 dia vs lesão 7 dia	23.413	14.813 ***	P<0.001	US 3 dia vs US 7 dia	13.511	14.895 ***	P<0.001

- Macrófagos M1 (CD80+)

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The F value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.711 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
DIA1 LESAO vs DIA2 LESAO	-5.500	9.058 ***	P<0.001
DIA1 LESAO vs DIA3 LESAO	1.534	2.542 ns	P>0.05
DIA1 LESAO vs DIA7 LESAO	5.335	5.942 ***	P<0.001
DIA2 LESAO vs DIA3 LESAO	7.336	13.013 ***	P<0.001
DIA2 LESAO vs DIA7 LESAO	10.839	18.288 ***	P<0.001
DIA3 LESAO vs DIA7 LESAO	3.501	6.767 ***	P<0.001

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The F value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Huynh Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.326 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
DIA 1 US vs DIA 2 US	4.066	9.417 ***	P<0.001
DIA 1 US vs DIA 3 US	5.209	11.151 ***	P<0.001
DIA 1 US vs DIA 7 US	7.607	15.797 ***	P<0.001
DIA 2 US vs DIA 3 US	0.438	1.129 ns	P>0.05
DIA 2 US vs DIA 7 US	3.048	6.820 ***	P<0.001
DIA 3 US vs DIA 7 US	3.408	6.227 **	P<0.01

- Macrófagos M2a (CD206+)

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The F value is < 0.001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.656 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
lesão 1 dia vs lesão 2 dias	-10.058	16.387 ***	P<0.001
lesão 1 dia vs lesão 3 dias	1.936	1.916 ns	P>0.05
lesão 1 dia vs lesão 7 dias	5.171	4.409 **	P<0.01
lesão 2 dias vs lesão 3 dias	10.625	17.780 ***	P<0.001
lesão 2 dias vs lesão 7 dias	20.258	20.387 ***	P<0.001
lesão 3 dias vs lesão 7 dias	3.633	3.282 ns	P>0.05

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The F value is < 0.001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.717 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
US 1 dia vs US 2 dias	-0.151	7.872 ***	P<0.001
US 1 dia vs US 3 dias	-5.426	9.409 ***	P<0.001
US 1 dia vs US 7 dias	0.5902	0.5637 ns	P>0.05
US 2 dias vs US 3 dias	-0.2851	0.2645 ns	P>0.05
US 2 dias vs US 7 dias	3.701	7.601 ***	P<0.001
US 3 dias vs US 7 dias	3.986	6.802 ***	P<0.001

Tabela 3. Efeitos do UST com frequência abaixo de 2 MHz sobre o reparo do músculo esquelético em modelos experimentais.

Autor e ano	Animal / Músculo	Modelo experimental	Frequência / Intensidade / Ciclo de trabalho	Área de radiação efetiva (ERA) / Agente acoplador	Tempo de aplicação	Início e frequência de tratamento	Períodos avaliados	Resultados
Gouvêa et al. (1998)	30 Ratos Wistar / Tibial anterior (TA)	A lesão foi provocada através de uma incisão cirúrgica	1 MHZ / 0.5 W/cm ² Pulsado (1:5)	Aparelho com transdutor reduzido (não específica) e não relata o uso do meio acoplador.	Aplicações de 5 minutos.	Início do tratamento após 24 horas da lesão. Aplicações por 3, 5, 10 e 15 dias.	Grupo 3 dias: tratamento por 3 dias. Grupo 7 dias: tratamento por 5 dias. Grupo 14 dias: tratamento por 10 dias. Grupo 21: tratamento por 15 dias. Os animais foram eutanasiados após 3, 7, 14 e 21 dias, respectivamente	A avaliação histológica revelou nos quatro períodos experimentais que o tratamento com US favoreceu a regeneração muscular promovendo redução no número de fibras necróticas. A análise morfométrica do grupo tratado com US demonstrou um reduzido número de macrófagos e neutrófilos além de um número acentuado de fibroblastos e novas fibras musculares.
Menezes et al. (1999)	26 coelhos da raça Nova Zelândia / Reto da coxa	A lesão foi induzida por esmagamento do músculo	1 MHz / 0,5 W/cm ² Pulsado (1:5)	ERA de 4 cm ² Uma bolsa de látex cheia de água e gel hidrossolúvel entre a pele e o látex.	Aplicações de 5 minutos.	Inicio 3 dias após a lesão. As aplicações aconteceram por 10 dias consecutivos	Metade dos animais receberam aplicação de ultrassom no lado direito, e a outra metade no lado esquerdo. O lado oposto foi mantido como controle. Os animais foram eutanasiados 3 dias após o fim do tratamento.	Ensaios mecânicos de tração mostraram que os músculos tratados com US demonstraram melhor performance nos ensaios mecânicos durante o período de reparo muscular
Karnes & Burton (2002)	33 ratos Sprague-Dawley / Extensor digital longo	Lesão induzida por contração utilizando eletrostimulação (150 Hz, 21 ciclos/min)	1 MHz / 0.5 W/cm ² / Contínuo	Aparelho com transdutor de 5 cm. As ondas foram propagadas em meio subaquático	Aplicações de 5 minutos ao dia.	Início do tratamento imediatamente após a lesão prosseguindo diariamente por 3, 5 ou 7 dias.	Animais foram distribuídos em 5 grupos. O tratamento foi aplicado 1 vez ao dia por 3 dias (n=7), 5 dias (n=8), 7 dias (n=7) a lesão, controle lesionado (n=7) e controle de feridas sem tratamento (4).	A avaliação do índice funcional (força muscular) foi realizada e os resultados mostraram não existir diferença entre os grupos tratados e não tratados nos períodos de 3 e 5 dias, porém após 7 dias de tratamento a força muscular foi maior no grupo tratamento quando comparado ao grupo controle.
Freitas et al. (2007)	25 ratos Wistar /Gastrocnêmico	Lesão induzida por laceração muscular.	Não relata frequência / 0,5, 1,0 e 2,0 W/cm ² Pulsado (não consta o regime)	Não relata.	Não relata.	Início do tratamento após 12h da lesão. Uma aplicação ao dia, por 1, 3 e 5 dias. Os animais foram mortos por decapitação.	5 grupos: (1) grupo sham; (2) o controle da lesão muscular sem tratamento ; (3) lesão muscular e UTS (0,5W/cm ²); (4) lesão muscular e UST (1,0W/cm ²); (5) lesão muscular e UST (2,0W/cm ²).	O tratamento com US gerou diminuição da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) após 1 (1 e 2 W/cm ²), 3 (0,5; 1 e 2 W/cm ²) e 5 (2 W/cm ²) dias; da produção de catalase (período de 1 dia, 2 W/cm ²) e de super óxido dismutase (SOD) após 1 (0,5; 1 e 2 W/cm ²) e 5 (1 e 2 W/cm ²) dias de tratamento.

Plentz et al. (2008)	16 ratos / Bíceps femoral	Receberam incisão e divulsão em 50% do conteúdo muscular.	1 MHz / 0.4 W/cm ² / Contínuo	Aparelho com cabeçote de 3 cm. Não relata uso de meio acoplador.	As aplicações tiveram duração de 3 minutos	As aplicações iniciaram 1, 8 e 24 horas após a lesão, sendo 3 aplicações.	Os animais foram divididos em grupo controle (GC=8) e grupo experimental (G1=8)..	As análises sanguíneas apontaram redução dos eritrócitos após 1h, aumento dos neutrófilos após 8h e dos eosinófilos após 24h no grupo tratado com relação aos animais que não receberam o tratamento.
Pinto et al. (2008)	35 ratos / Tibial anterior (TA)	Injeção intramuscular de hidrocloreto de bupivacaína	1 MHz / 0.3 W/cm ² Pulsado (não consta o regime)	ERA de 1 cm ² Foi utilizado gel de carbocal como meio acoplador.	Uma aplicação ao dia (não consta tempo).	As aplicações se iniciaram 24 horas após a lesão. As aplicações aconteceram por 2 e 7 dias.	Os animais foram divididos em 7 grupos : Controle (GC n = 5), o controlo da inflamação de 2 dias (CI2 , n = 5), o controlo da inflamação de 7 dias (CI7 , n = 5). Tratamento a laser de dois dias (LT2, n = 5). O tratamento com ultrassom de dois dias (TUS2 n = 5). Laser tratamento de sete dias (LT7 , n = 5). O tratamento com ultrassom 7 dias (TUS7 n = 5).	A análise histológica por meio de coloração HE e o resultado sugeriu que tanto o tratamento com laser como com ultrassom apresentaram ação anti-inflamatória, no entanto só a fototerapia pareceu ter efeito em todos os períodos observados enquanto que o US foi capaz de induzir o declínio da resposta inflamatória somente após 7 dias de tratamento.
Piedade et al. (2008)	30 ratos Wistar /Gastrocnêmico	Lacerção muscular	1 MHz / 0.57 W/cm ² Pulsado (50%)	ERA de 3,5 cm ² Utilizado gel como meio acoplador.	Cada sessão teve a duração de 5 minutos ao dia	Início 2 dias após a lesão. Sendo 2, 5 e 12 aplicações respectivamente para os grupos 4, 7 e 14 dias	Os animais foram divididos em 6 grupos, controle 4, 7 e 14 dias. Grupos tratamento de 4, 7 e 14 dias.	Observou-se, através da análise histológica, uma maior área de tecido em regeneração após 4 dias de tratamento com US quando comparada ao grupo não tratado. Nos períodos de 7 e 14 dias não foram relatadas diferenças significativas no padrão de reparo mas o tratamento com US pareceu favorecer a organização estrutural do tecido lesionado.
Alfredo et al. (2008)	40 ratos Wistar / Tibial anterior (TA)	Lesão muscular através de incisão cirúrgica	1 MHz / 0.5 W/cm ² Pulsado (1:2)	Gel como agente acoplador.	Cada aplicação teve duração de 3 minutos.	O tratamento teve início 24hs após a lesão.	Foram formados 4 grupos. As aplicações foram repetidas à cada 24hs e por 3 dias.	A análise histológica por HE no quarto dia após a lesão revelou que o tecido conjuntivo tornou-se mais organizado e havia uma quantidade maior de células inflamatórias (sem especificação de seu subtipo) após nos músculos tratados com ultrassom.
Okita et al. (2009)	22 ratos Wistar Sóleo	Os animais foram mantidos com imobilização em flexão plantar para obtenção da lesão muscular.	1 MHz / 1.0 W/cm ² Contínuo	Era de 0,4 cm Gel a base de água	Aplicações tiveram duração de 15 minutos	Início após 24 horas após a lesão.	Os animais foram separados em grupo controle (n=5) e grupo tratamento (n=17). O tratamento foi realizado 1 vez ao dia, durante 4 semanas.	A análise histológica (HE) e morfológica das amostras demonstraram que o tratamento com US foi capaz de melhorar a organização das fibras colágenas no endomídeo dos músculos lesionados

Chan et al. 2010	40 camundongos / Gastrocnêmico	Lesão muscular por laceração	1,5 MHz / 30mW/cm ² / Pulsado	ERA de 0,1 cm ² / Gel de acoplamento	Sessões de 20 minutos, realizadas sobre a cultura celular obtida através do músculo do animal.	Início 24 horas após a lesão. Aplicações conforme os grupos: 7, 14, 21 e 28 dias.	Os animais foram divididos em 5 grupos: controle, 7, 14, 21 e 28 dias. Todos os animais foram sacrificados 4 semanas após a lesão.	A análise histológica através da coloração com HE mostrou uma maior regeneração nas fibras musculares nos grupos tratados com US quando comparados aos respectivos grupos controle.
Rennó et al. (2011)	35 ratos / Tibial Anterior (TA)	Criolesão	1,5 MHz / 30mW/cm ² Pulsado	Não informa	Cada sessão teve duração de 20 minutos.	Início 24hs da lesão, repetido à cada 48 horas, num total de 6 sessões.	Os animais foram separados em 4 grupos.	Tanto o tratamento com LBI quanto o com US foram capazes de reduzir a intensidade do quadro inflamatório e a imunomarcação da enzima ciclooxygenase 2 (COX-2) quando comparados aos resultados obtidos nos animais lesionados e não tratados
Artifon et al. (2012)	28 ratos Wistar / Sóleo	Lesão muscular por imobilização do membro inferior posterior, em flexão máxima, por 15 dias consecutivos	1 MHz / 1 W/cm ² , 0,5 W/cm ² e 0,2 W/cm ² Pulsado	Não informa	As sessões tiveram duração de 3 minutos.	5 vezes por semana durante 10 dias intervalos aos finais de semana)	Os animais foram separados em 4 grupos: GA (Grupo Alongamento):sem intervenção terapêutica; GAUS 1,0 (Grupo Alongamento e UST de 1,0W/cm ² ; GAUS 0,5 (Grupo Alongamento e UST de 0,5W/cm ²): GAUS 0,2 (Grupo Alongamento e UST de 0,2W/cm ² .	Não houve diferença entre os animais tratados com alongamento e US e os que receberem somente alongamento.
Montalti et al. (2013)	20 ratos Wistar / Tibial Anterior (TA)	Criolesão	1,5 MHz / 30mW/cm ² Pulsado	ERA de 2,5 cm ² Gel	Sessões de 20 minutos cada.	O tratamento iniciou-se 24 horas após a lesão. As aplicações ocorreram a cada 48hs, sendo 3 sessões por semana (3 e 6 aplicações).	Foram formados 2 grupos (GC e GT), ambos os grupos foram divididos em 2 sub grupos (n=5), que foram sacrificados 7 e 13 dias após a lesão. o primeiro de 7 dias e o segundo de 13 dias.	Após análise histológica observaram uma melhor organização estrutural do tecido muscular nos animais tratados com US após 13 dias. Não houve diferença entre a disposição das fibras de colágeno. A expressão de COX-2 foi avaliada por imunohistoquímica e demonstrou que tanto nos animais tratados por 7 como 13 dias houve aumento de sua expressão..

Tabela 4. Efeitos do UST com frequência acima de 3 MHz sobre o reparo do músculo esquelético em modelos experimentais.

Autor e ano	Animal / Músculo	Modelo experimental	Frequência / Intensidade / Ciclo de trabalho	Área de radiação efetiva (ERA) / Agente acoplador	Tempo de aplicação	Início e frequência de tratamento	Períodos avaliados	Resultados
Rantanen et al. (1999)	56 ratos Sprague-Dawley /Gastrocnêmico	A lesão muscular foi provocada por uma contusão muscular.	3 MHz / 1,5 W/cm ² / Pulsado (20%)	Aparelho com transdutor reduzido (1 cm) e gel como agente acoplador.	As aplicações foram de 6 minutos	Inicio após 6 horas (grupo 2) e após 3 dias (grupo 1) da lesão.	Grupo 1 = 1x/dia iniciando após 3 dias da lesão com eutanásia aos 4, 7 e 10 dias. Grupo 2 = 2 dias consecutivos de tratamento e 1 dia de repouso iniciando 6 horas após lesão com sacrifício após 1, 3, 6 e 9 dias.	A proliferação de células satélites nas fases iniciais da regeneração foi aumentada (até 96%) com o tratamento com US, porém não houve efeito sobre a produção de miotubos. A proliferação de fibroblastos se manteve intensa por períodos de 7 e 10 dias nos animais tratados com US, o que só aconteceu no período de 3 a 4 dias nos animais não tratados.
Wilkin et al. (2004)	80 ratos Wistar /astrocnêmico	Lesão induzida por contusão muscular bilateral	3.3 MHz / 1,0 W/cm ² Pulsado (20%)	Não relata	Aplicações de 5 minutos.	Inicio do tratamento 6 horas após a lesão, uma aplicação ao dia, durante 7 dias.	Os animais foram separados em 8 grupos de 10 animais cada. Eutanásia após 1,3, 5, 7, 14, 21, 28 e 40 dias.	Não foram encontradas diferenças na massa muscular, na concentração de proteínas totais e no número de núcleos por fibra na área de secção entre os músculos tratados e não tratados.
Markert et al. (2005)	20 ratos Wistar /Gastrocnêmico	Lesão induzida por contusão muscular	3 MHz / 0.1 W/cm ² / Contínuo	Aparelho com transdutor de 1 cm. Não relata meio acoplador.	Aplicações de 5 minutos ao dia.	Inicio do tratamento 24 horas após a lesão. Por 4 dias.	Os animais foram separados em 4 grupos, incluindo grupo o controle.	Os animais tratados com US não demonstraram alteração na massa muscular, concentração de proteínas contráteis, número de núcleos por fibra e densidade de mionúcleos com relação aos músculos lesionados e que não receberam tratamento
McBrier et al. (2007)	36 ratos machos Wistar /Gastrocnêmico	Lesão induzida por contusão muscular.	3 MHz / 0.3 W/cm ² Contínuo	Aparelho com transdutor de 2 cm. Não relata meio acoplador.	Aplicações de 5 minutos ao dia.	Inicio após 24 horas da lesão, aplicação por 4 dias consecutivos.	Os animais foram eutanasiados 1, 2, 3 e 4 dias após a lesão.	Diminuição da expressão de RNAm de MGF e ausência de alteração de massa nos músculos gastrocnêmicos de ratos

Shu et al. 2012	62 ratos SD / Gastrocnêmico	Esmagamento do músculo propiciando a lesão	3 MHz / 0,25 W/cm ² , 0,5 W/cm ² , 0,75 W/cm ² Pulsado (20%)	Não informa	As aplicações tiveram duração de 5 minutos.	As sessões se iniciaram 24 horas após a lesão.	14 ratos fizeram parte do controle e 48 dos grupos tratamento (divididos em 4 grupos de 12 ratos cada).	A análise histológica por HE após 4 e 7 dias mostrou um quadro inflamatório menos intenso e com menor número de células inflamatórias em todos grupos tratados com US quando da comparação com o grupo não tratado. Aos 14 dias os grupos tratados e o não tratado apresentaram aspectos teciduais similares.
--------------------	--------------------------------	---	---	-------------	--	--	---	--