

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

JACIRA SOUZA RIBEIRO

**ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO DO
MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR DE RATO: ANÁLISE MORFOLÓGICA,
ORGANIZAÇÃO E DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E EXPRESSÃO DE
FATORES REGULATÓRIOS MIOGÊNICOS**

São Paulo

2015

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

JACIRA SOUZA RIBEIRO

**ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO DO
MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR DE RATO: ANÁLISE MORFOLÓGICA,
ORGANIZAÇÃO E DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E EXPRESSÃO DE
FATORES REGULATÓRIOS MIOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao
programa de Mestrado em Ciências
da Reabilitação da Universidade
Nove de Julho como requisito para
obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel
Agnelli Mesquita Ferrari

São Paulo
2015

Ribeiro, Jacira Souza.

O ultrassom pulsado de baixa intensidade na regeneração do músculo tibial anterior de rato: análise morfológica, organização e deposição de colágeno e expressão de fatores regulatórios miogênicos./ Jacira Souza Ribeiro. 2015.

51 f.

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

Orientador (a): Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Reparo muscular. 2. Ultrassom pulsado de baixa intensidade. 3. Colágeno. 4. Células satélites. 5. Myod e miogenina.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita.

II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 10 de dezembro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): JACIRA SOUZA RIBEIRO

Título da Dissertação: "Efeito do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre a regeneração do músculo esquelético de rato: análise morfológica, remodelamento de colágeno e expressão de fatores regulatórios miogênicos".

Presidente: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROFA. DRA. CRISTIANE MIRANDA FRANÇA



Membro: PROFA. DRA. RITA DE Cássia MARQUETI DURIGAN



RESUMO

O ultrassom pulsado de baixa intensidade (USPBI) tem sido utilizado por promover um reparo muscular de melhor qualidade e menor duração, porém, não há padronização quanto aos parâmetros utilizados na prática clínica. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do USPBI sobre o reparo do músculo esquelético de rato após criolesão. Foram utilizados 45 ratos Wistar, machos, divididos em 3 grupos experimentais: controle; somente lesão; lesionado tratado com USPBI. A aplicação de USPBI foi realizada diariamente após indução da lesão, modo estacionário, pulsado 1:4, frequência 1 MHz, intensidade 0,4 W/cm², durante 3 minutos. Os grupos lesionados foram eutanasiados após 1, 2, 3 e 7 dias da indução da lesão. O músculo tibial anterior (TA) foi removido para análise morfológica e de remodelamento do colágeno, sendo os cortes corados com H&E e Picrosirius Red, respectivamente. As lâminas foram fotografadas e quantificadas com auxílio do programa "Image J". A expressão gênica de MyoD e miogenina foi obtida por PCR em tempo real. Os resultados evidenciaram que o USPBI promoveu modulação da resposta inflamatória, havendo redução do infiltrado inflamatório após 1, 2, 3 e 7 dias, e redução da mionecrose após 7 dias, seguido pelo aumento no número de fibras imaturas após 3 e 7 dias, e aumento dos vasos sanguíneos nos dias 2, 3 e 7 dias. Em relação à deposição de colágeno, os resultados evidenciaram melhor organização das fibras em todos os períodos experimentais, além de aumento da deposição de fibras colágenas no grupo lesionado e tratado após 2 e 3 dias. Além disso, o tratamento com USPBI promoveu aumento da expressão gênica de MyoD após 3 dias e redução após 7 dias. Em relação a expressão de miogenina, o grupo tratado demonstrou aumento da expressão após 7 dias. Em conclusão, o USPBI nos parâmetros utilizados induziu efeitos positivos ao processo de reparo muscular causando redução do processo inflamatório e mionecrose, aumento de fibras jovens vasos sanguíneos maduros, além de modulação de MyoD e miogenina nos diferentes períodos avaliados.

Palavras-chave: Reparo muscular; ultrassom pulsado de baixa intensidade; colágeno; células satélites, MyoD e miogenina.

ABSTRACT

The low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) has been used to promote muscle repair with better quality and in shorter time, however, there is no standardization for the parameters used in clinical practice. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of USPBI on the repair of skeletal muscle of rats after cryoinjury. Male Wistar rats (n=45) were divided into 3 groups: control; only injury; Injured and treated with LIPUS. The LIPUS application was performed daily, using the stationary mode, pulse 1: 4, 1 MHz frequency, intensity 0.4 W / cm² for 3 minutes. The injured groups were euthanized at 1, 2, 3 and 7 days following injury induction. The tibialis anterior muscle (TA) was removed for morphological analysis and collagen remodeling, and the muscle sections stained with H&E and Picrosirius Red, respectively. Then, the slides were photographed and quantified using the program "Image J". The analysis of MyoD and myogenin gene expression was performed using real time PCR. The results showed that the USPBI promoted modulation of inflammatory responses with a decrease of inflammatory infiltrates after 1, 2, 3 and 7 days, and reduction of myonecrosis after 7 days, followed by an increase in the number of immature fibers after 3 and 7 days, and increase of blood vessels on days 2, 3 and 7 days. Regarding the deposition of collagen, the results showed better organization of the fibers in all experimental periods, and increased deposition of collagen fibers in the injured group and treated after 2 and 3 days. In addition, treatment with LIPUS promoted increased gene expression of MyoD reduction after 3 days and after 7 days. Regarding myogenin expression, the treated group showed increased expression after 7 days. In conclusion, the LIPUS induced positive effects on muscle repair process leading to reduced inflammation and myonecrosis, increased in the immature fibers and mature blood vessels, as well as modulation of Myod and miogenin in different periods.

Keywords: Muscle repair; collagen; low-intensity pulsed ultrasound; satellite cells, MyoD and myogenin.

SUMÁRIO

1- Contextualização	10
1.1 Reparo muscular.....	10
1.2 Fases do reparo muscular.....	11
1.3 Matriz extracelular e os colágenos no reparo muscular.....	11
1.4 Ultrassom pulsado de baixa intensidade.....	12
2- Objetivos	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3- Método.....	17
3.1 Aspectos éticos.....	17
3.2 Animais.....	17
3.3 Grupos experimentais.....	17
3.4 Procedimento de criolesão	18
3.5 Procedimento de tratamento com USPBI.....	19
3.6 Eutanásia dos animais e remoção dos músculos.....	19
3.7 Processamento histológico coloração com hematoxiina e Eosina (HE) e PicroSírius Red.....	20
3.8 Análise morfológica quantitativa e qualitativa.....	20
3.9 Análise quantitativa e qualitativa das fibras colágenas.....	20
3.10 Extração e controle de qualidade de RNA total	20
3.11 Síntese do DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real quantitativo (qPCR).....	21
3.12 Análise dos resultados.....	22

4- Resultados.....	23
4.1 – Artigo 1.....	23
4.1.1 Análise dos resultados.....	32
4.1.2 Análise morfológica qualitativa.....	32
4.1.3 Análise morfológica quantitativa.....	32
4.1.4 Deposição e organização de colágeno.....	35
4.1.5 Expressão gênica dos FRMs.....	38
4.1.6 Discussão.....	40
5- Considerações finais.....	44
6- Referências Bibliográficas	45
ANEXOS.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Análise comparativa dos estudos realizados com USPBI.....	13
---	-----------

TABELA 2 - Parâmetros dosimétricos do ultrassom pulsado de baixa intensidade	19
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -. Demonstração do procedimento de aplicação ultrassom pulsado de baixa intensidade.....	18
--	-----------

Figuras do Artigo 1

FIGURA 1 - Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por hematoxilina & eosina (aumento original, 100x)	33
---	-----------

FIGURA 2 – Quantificação dos aspectos morfológicos	34
---	-----------

FIGURA 3 - Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por picroSirius com e sem luz polarizada.....	37
--	-----------

FIGURA 4 - Quantificação da área de fibras de colágeno em porcentagem com relação à área total do músculo	38
--	-----------

FIGURA 5 – Avaliação da expressão gênica dos FRMs MyoD e miogenina nos diferentes grupos experimentais durante o processo de reparo.....	39
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CS – Células satélites

ERA – effective radiation área (área de radiação efetiva)

FRMs – fatores regulatórios miogênicos

J/cm² - Joule por centímetro quadrado

MEC– Matriz extracelular

PCR – Reação em cadeia por polimerase

RNA – ácido ribonucleico

TA – Tibial anterior

W/cm² - Watts por centímetro quadrado

US - Ultrassom

USC – Ultrassom contínuo

USP – Ultrassom pulsado

USPBI– Ultrassom pulsado de baixa intensidade

US+A – Ultrassom associado ao gel de *Arnica Montanna*

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O músculo esquelético é composto por fibras musculares envolvidas em uma matriz extracelular. Possui alta capacidade adaptativa e regenerativa, sendo capaz de responder prontamente a um estímulo incluindo: exercício físico (ROONEY, SI, et al. 2015), imobilização (OKITA, et al. 2009), alterações hormonais (KUCUKGUVEN A, KHALIL R.A. 2013), envelhecimento (ANDERSON, 2000) e lesões como criolesão (RENNÓ et al., 2011; MONTALTI et al., 2013), contusão (MATHEUS et al., 2008; McBRIER et al., 2007; MARKET et al., 2005; WILKIN et al, 2004; RANTANEN et al, 1999; ARTIFON et al., 2012; OKITA et al. 2009), lesão por impacto (MATHEUS et al., 2008), laceração muscular (CHAN et al., 2010; PIEDADE et al., 2008; FREITAS et al., 2007) e incisão muscular (PLENTZ et al., 2008; ALFREDO et al., 2008).

A incidência de lesão muscular evidenciada na prática clínica é bastante elevada, e após uma lesão muscular uma cascata de eventos se inicia de forma a permitir que haja o reparo deste tecido. Inicialmente, ocorre a mionecrose das fibras musculares e, na sequência, infiltração de células inflamatórias, fagocitose das células lesadas, ativação das células satélites (CS) e, por último, a diferenciação das células precursoras miogênicas, as quais vão dar origem à novas fibras musculares (MONTALTI *et al.*, 2013; JARVINEN *et al.*, 2013; RENNO *et al.*, 2011; ALFREDO *et al.*, 2008).

1.1. Células Satélites (CS) e Reparo Muscular

As CS são células mononucleares, localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal, que atuam na manutenção, crescimento e regeneração do músculo. Quando ativadas, as CS passam a proliferar sendo chamadas de mioblastos e estes, por sua vez, se fundem para formar miotubos, que se diferenciam e fundem-se a fibras musculares já existentes ou constituem uma nova fibra muscular, de forma a reparar a célula danificada (MOTOHASHI *et al.*, 2014; BAREJA *et al.*, 2014; JARVINEN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2009).

As CS expressam fatores regulatórios miogênicos (FRMs) que regulam cada etapa do processo de reparo muscular, sendo MyoD e Myf5 relacionados a proliferação e migração de CS e miogenina e MRF4 relacionados a fase de diferenciação em mioblastos (ABUJAROUR *et al.*, 2015; NAGATA *et al.*, 2013).

1.2. Fases do reparo muscular

Após a lesão muscular, há uma invasão de células inflamatórias como os neutrófilos e os macrófagos. Os neutrófilos são os primeiros a chegarem ao sítio de lesão (imediatamente após a lesão, até aproximadamente 24 horas após), sendo substituídos gradativamente pelos macrófagos, por volta de 24 a 48 horas. Os neutrófilos e os macrófagos são responsáveis pela fagocitose do tecido necrosado, e liberam citocinas pró-inflamatórias, enzimas e radicais livres. As citocinas são substâncias capazes de modular a função de várias células envolvidas na regeneração muscular. Estas citocinas modulam as diferentes fases do reparo e outras células envolvidas no reparo, porém se sua síntese persistir pode haver aumento do dano tecidual (SACLIER *et al.*, 2013; TIDBALL & VILLALTA, 2010; VILLALTA *et al.*, 2009; TIDBALL, 2005).

1.3. Matriz extracelular e os colágenos no reparo muscular

Durante o reparo muscular, os componentes do tecido conjuntivo também sofrem modificações de forma a permitir que este processo aconteça de forma adequada. No tecido muscular, a matriz extracelular (MEC) é composta por fibronectina, proteoglicanos, laminina, desmina e colágenos tipo I, III e IV (GARG *et al.*, 2015; MANN *et al.*, 2011), e seu remodelamento envolve a síntese e degradação de seus componentes (GARG *et al.*, 2015), sendo estes realizados por enzimas dependentes de cálcio e zinco chamadas metaloproteases de matriz (MMPs) (GARG *et al.*, 2015; HADLER *et al.*, 2011).

O colágeno tipo I está relacionado com resistência e o colágeno do tipo III confere elasticidade ao tecido. O colágeno tipo IV compõe a lâmina externa das fibras musculares, é o componente mais abundante da membrana basal, fornecendo-lhe resistência mecânica (MANN *et al.*, 2011; SERRANO *et al.*, 2005; JAMES, 2005).

O adequado remodelamento da MEC durante a regeneração muscular é de extrema importância uma vez que a fibrose excessiva no tecido muscular representa uma barreira mecânica à migração e fusão celular, limitando a perfusão vascular no local da lesão, impedindo a regeneração normal após lesão deste tecido (CHEN & LI, 2009; MANN *et al.*, 2011; PLENTZ *et al.*, 2008).

1.4. Ultrassom pulsado de baixa intensidade (USPBI)

O USPBI tem sido recurso terapêutico muito utilizado nos últimos 60 anos na prática clínica para promover de forma mais rápida e de melhor qualidade o reparo muscular. Esse recurso fornece energia mecânica, que pode ser transmitida para os tecidos biológicos, como ondas de alta frequência acústicas (FREITAS et al., 2007; NAGATA et al., 2013).

Este recurso opera em uma faixa de 0,1 a 0,7 W/cm² e seus efeitos dependem de diversos fatores físicos tais como: frequência (1 a 3 MHz), intensidade (0, 1 a 3 W/cm²), tempo de exposição (3 a 20 minutos) e estado fisiológico dos tecidos. Devido a esta variedade de parâmetros a serem ajustados, há grande dificuldade na compreensão exata do mecanismo de ação do USPBI nos tecidos biológicos (MONTALTI et al., 2013; FREITAS et al., 2007; ARTIFON et al., 2012; ALFREDO et al., 2008; MATHEUS et al., 2008; PLENTZ et al., 2008; CHESTER et al., 2008).

Os efeitos do US podem ser divididos entre térmicos e não térmicos. Os efeitos térmicos são obtidos pela emissão contínua de ondas sonoras, definido como ultrassom contínuo, provocam uma alteração térmica nos tecidos, resultando em um aquecimento tecidual. Os efeitos não térmicos, são possíveis pela emissão pulsada das ondas sonoras, definido como ultrassom pulsado, resultam do efeito mecânico, levando a alterações como cavitação estável e micromassagem dentro dos tecidos, podendo também gerar calor (FREITAS et al., 2011).

Os resultados dos estudos que utilizaram o US durante o reparo do músculo esquelético estão sumarizados na tabela à seguir:

Tabela 1- Análise comparativa dos estudos realizados com US.

Autor	Músculo Animal Lesão	Frequência Intensidade	Emissão Meio condutor	Tempo aplicação/ Grupos	Efeito/ Resultado
PIEIDADE et al., 2008	Gastrocnêmio, 30 ratos Wistar, laceração muscular	1 MHz/ 0,57 W/cm ²	Pulsado (1:1) Gel de carbopol	5 minutos/sessão, sendo 2, 5 e 12 aplicações (grupos 4, 7 e 14 dias)	Aumento da deposição de fibras de colágeno e melhor organização tecidual, nos grupos 7 e 14 dias.
ARTIFON et al., 2012	Sóleo, 28 ratos, Wistar, imobilização	1 MHz/ 1 W/cm ² ; 0,5 W/cm ² ; 0,2 W/cm ²	Pulsado (não relata ciclo) Não relata meio acoplador	3 minutos /sessão; 5x/semana; 10 dias	Aumento do número de fibras imaturas, no grupo 0,2W/cm ² , em relação aos demais grupos.
PLENTZ et al., 2008	Bíceps femoral, 16 ratos Wistar, incisão muscular	1 MHz/ 0,4 W/cm ²	Pulsado (1:5) Não relata	3 minutos, sendo 3 aplicações (1, 8 e 24 horas após a lesão)	Redução de eritrócitos, após 1 hora. Aumento de Neutrófilos, após 8 horas, e de Eosinófilos, após 24 horas, sugerindo modulação da resposta inflamatória.
PINTO et al., 2008	Tibial anterior, 35 ratos, injeção intramuscular de hidroclorato de bupivacaína	1 MHz/ 0,3 W/cm ²	Pulsado (não consta ciclo) Gel de Carbopol	1x/dia, por 2 e 7 dias (não consta tempo)	Modulação da resposta inflamatória após 7 dias
ALFREDO et al., 2008	Tibial anterior (TA), 40 ratos Wistar, incisão muscular	1 MHz/ 0,5 W/cm ²	Pulsado (1:2) Gel de carbopol e gel de <i>arnica montanna</i>	3 minutos, sendo 3 aplicações, 1/dia. 4 grupos: controle (10), lesados e não tratados; (10), lesados, tratados com US (10); grupo ultrassom com <i>arnica</i> (10).	Melhor organização tecidual em ambos os grupos, com tecido conjuntivo mais organizado e consistente.
OKITA et al., 2009	Sóleo, 22 ratos Wistar, mantidos em imobilização por flexão plantar.	1 MHz/ 1,0 W/cm ²	Contínuo Gel	15 min/sessão 6 x/semana Por 4 semanas	Prevenção da contratura muscular
FREITAS et al., 2007	Gastrocnêmio, 25 ratos Wistar, laceração muscular	Frequência não relatada intensidade e 0,5, 1,0 e 2,0 W/cm ²	Pulsado (não consta o regime) Não relata meio acoplador	O tratamento iniciou-se 12 horas após a lesão, sendo realizada uma aplicação ao dia, por 1, 3 e 5 dias.	Diminuição do estresse oxidativo, em todos os períodos experimentais, o que sugere uma modulação da resposta inflamatória nos grupos tratados com US em comparação ao não tratado.
GOUVÊA et al., 1998	Tibial anterior (TA), 30 Ratos Wistar, Incisão cirúrgica	1 MHz 0,5 W/cm ² Transdutor reduzido (não especifica).	Pulsado (1:5) Não relata. meio acoplador	O tratamento iniciou-se 24 horas após a lesão. Aplicações por 3, 5, 10 e 15 dias, consecutivos.	Favoreceu a regeneração muscular, em todos os períodos experimentais, redução de macrófagos e neutrófilos em 3, 7, 14 e 21 dias.
MENEZES et al., 1999	Reto femoral, 26 coelhos da raça Nova Zelândia, Esmagamento muscular	1 MHz Não relata intensidade	Não relata emissão Uma bolsa de látex cheia de água e gel hidrossolúvel	Início 3 dias após a lesão. As aplicações aconteceram por 10 dias consecutivos	Modulação da resposta inflamatória, com redução dos infiltrados inflamatórios.
KARNES & BURTON, 2002.	Extensor digital longo, 33 ratos Sprague-Dawley, Lesão induzida por eletroestimulação	1 MHz 0,5 W/cm ²	Contínuo Meio subaquático	Início do tratamento imediatamente após a lesão prosseguindo diariamente por 3, 5 ou 7 dias.	Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados aos 3 e 5 dias, mas em 7 dias após a lesão, a força muscular no grupo tratado com ultrassom foi significativamente maior quando comparado ao não tratado.
RENNÓ et al., 2011	Tibial anterior (TA), 35 ratos, Wistar, criolesão.	1,5 MHz 0,3W/cm ²	Pulsado Não relata	20 minutos/sessão, à cada 48 horas, sendo 6 aplicações	O grupo tratado apresentou redução do infiltrado inflamatório e diminuição do edema e das células inflamatórias.
MONTALTI et al., 2013	Tibial anterior, 20 ratos Wistar,	1,5 MHz 0,3 W/cm ²	Pulsado Gel de carbopol	20 minutos/sessão, sendo ao total 3 e 6 sessões (grupos 7 e 13 dias)	Maior deposição de colágeno e melhor alinhamento das fibras no grupo tratado, em comparação ao

	criolesão.				somente lesão.
MATHEUS et al., 2008	Gastrocnêmio. 40 ratas Wistar, contusão muscular	1 e 3 MHz 0,5 W/cm ²	Pulsado (1:5) Gel de carbopol	5 minutos/dia por 6 dias	Aceleração da resposta de reparo muscular, aumento da rigidez, não havendo diferença entre as frequências testadas.
GUIMARÃES S, et al., 2011	Tecido epitelial; 50 ratos; remoção de 1 cm ² da pele.	3 MHz 0,1 W/cm ²	Contínuo ERA 4 cm ²	Início do tratamento imediatamente após a lesão, prosseguindo diariamente por 7 e 14 dias. Sendo 5 grupos (controle, gel, gel + dexapantenol, gel + dexapantenol + US)	Os grupos t7 e 14 dias ratados com US apresentaram maior deposição de colágeno em comparação aos outros grupos.
MARKERT et al., 2005 "	Gastrocnêmio, 20 ratos Wistar, Lesão induzida por contusão muscular	3 MHz 0.1 W/cm ²	Contínuo Não relata meio acoplador.	Início do tratamento 24 horas após a lesão. Por 4 dias, sendo 5 min/sessão	Não houve alteração de massa muscular, número de núcleos por fibra, área de secção transversa e das proteínas contráteis.
MCBRIER et al., 2007	Gastrocnêmio, 36 ratos Wistar, lesão induzida por contusão muscular.	3 MHz 0.3 W/cm ²	Não relata meio acoplador.	Início após 24 horas da lesão, aplicação por 4 dias consecutivos, sendo 5 min/sessão	Diminuição da expressão de RNAm do MGF (mechano-growth factor).
SHU et al. 2012	Gastrocnêmio / 62 ratos SD / Esmagamento do músculo propiciando a lesão	3 MHz / 0,25 W/cm ² , 0,5 W/cm ² , 0,75 W/cm ²	Pulsado (1:5) / Não relata meio acoplador e ERA	5 minutos/sessão 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).	Após análise histológica HE e imunohistoquímica um grande número de núcleos nas fibras musculares indicou uma maior proliferação celular no grupo tratado. A coloração HE mostrou um número menor de células inflamatórias após 4 e 7 dias.
RANTANEN et al., 1999	Gastrocnêmio, 56 ratos Sprague-Dawley, lesão induzida por contusão muscular	3 MHz 1,5 W/cm ²	Pulsado (1:5) Gel de carbopol	Grupo 1 = 1x/dia iniciando após 3 dias após a 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.	Não houve efeitos benéficos significantes relacionado aos aspectos morfológicos durante a regeneração muscular.
WILKIN et al., 2004	Gastrocnêmio, 80 ratos Wistar, lesão induzida por contusão muscular bilateral	3.3 MHz 1,0 W/cm ²	Pulsado (1:5) Não relata agente acoplador	Início do tratamento 6 horas após a lesão, uma aplicação ao dia. 8 grupos de 10 animais cada. Eutanásia após 1,3, 5, 7, 14, 21, 28 e 40 dias.	Não houve alterações na massa muscular, na concentração de proteínas totais e no número de núcleos por fibra, o que sugere que o ultrassom não interferiu no reparo muscular.

Como demonstrado na tabela acima temos o total de 19 artigos que utilizaram ultrassom após uma lesão muscular, variando os parâmetros como descrito à seguir: frequência de 1 à 3 MHz; intensidade de 0,2 à 2,0 W/cm²; tempo de aplicação entre 3 à 20 minutos; músculos escolhidos gastrocnêmio, sóleo, tibial anterior, bíceps e reto femoral; frequência de tratamento de 1 à 40 dias. Destes estudos, 10 utilizaram a frequência de 1 MHz, o que corresponde à 52,7% e 9 utilizaram a frequência entre 1,5 à 3 MHz, o que corresponde à 47,3% dos estudos. Com relação ao modo de aplicação 14 estudos (73,7%) utilizaram o modo pulsado e 5 (26,3%) utilizaram o modo contínuo. Já em

relação a intensidade 15 (79%) utilizaram intensidade baixa, variando entre 0,1 W/cm² à 0,7 W/cm². Em se tratando de modelo de lesão 26% utilizaram o modelo de contusão muscular (5) sendo que 2 (10,4%) utilizaram o modelo de criolesão e maioria destes estudos (32%) analisou os aspectos morfológicos, que incluem infiltrado inflamatório edema, fibras imaturas, deposição de colágeno e alinhamento das fibras colágenas. Os principais músculos avaliados nestes estudos foram o gastrocnêmio (47,4%), o tibial anterior (26,3%) e o sóleo (10,5%). Os resultados evidenciaram que os estudos que utilizaram frequência de 1 MHz e intensidade baixa (0,1 à 0,7 W/cm²), apresentaram melhores respostas quanto aos efeitos, entre eles aspectos morfológicos (aumento do número de fibras musculares, redução de infiltrado inflamatório, diminuição do estresse oxidativo, aumento na deposição das fibras colágenas, redução do edema).

Há grande interesse no estabelecimento de recursos e terapias a serem utilizados na tentativa de proporcionar um processo de reparo muscular de melhor qualidade e menor duração. Desta forma, destaca-se o uso do US terapêutico durante o processo de reparo muscular, no intuito de promover uma regeneração de melhor qualidade, em menor tempo. Embora muito utilizado na prática clínica ainda existe pouco conhecimento no que se refere a efeitos biológicos, mecanismos de ação e protocolos a serem utilizados para modular positivamente a regeneração muscular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Analisar as ações do USPBI sobre o reparo do músculo tibial anterior de rato (TA) após criolesão.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do USPBI durante o processo de reparo muscular após criolesão sobre:
 - Aspectos morfológicos do tecido muscular incluindo: mionecrose, infiltrado inflamatório, presença de novas fibras, edema e vasos maduros.
 - Distribuição e organização do colágeno
 - Expressão gênica dos FRMs: MyoD e miogenina

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

A metodologia utilizada no presente estudo foi conduzida segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996), e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (AN26/2014 – Anexo 2). Este estudo foi realizado no laboratório de pesquisa do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação da UNINOVE.

3.2. Animais

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

3.3. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 03 grupos experimentais:

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

Os animais dos grupos criolesionados foram eutanasiados após 1, 2, 3 e 7 dias da indução da lesão para determinação dos aspectos morfológicos, organização e distribuição de colágeno e expressão gênica de MyoD e miogenina. Os animais do grupo controle foram eutanasiados no primeiro dia do experimento. O grupo sham não foi utilizado neste estudo uma vez que resultados prévios já publicados evidenciaram que não existiram alterações morfológicas importantes devido a incisão e exposição da musculatura.(Alves et al, 2014).

3.4. Procedimento de criolesão

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o descrito por MIYABARA *et al.*, 2005; BAPTISTA *et al.*, 2011 e MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2014, RIBEIRO *et al.* 2015. Os animais foram pesados e, em seguida, anestesiados com administração intraperitoneal de 100 mg/Kg de peso do animal de Ketamina 10% (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 10 mg /Kg peso do animal de Xilazina 2% (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado. Posteriormente, à indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana e realizado a tricotomia da região correspondente ao músculo TA.

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 na superfície ventral do músculo, com características semelhantes, de forma limpa, causando menor variabilidade na severidade da lesão (ALVES *et al.*, 2013; ASSIS *et al.*, 2012; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; BAPTISTA *et al.*, 2010).

3.5. Procedimento de tratamento com USPBI

Nos grupos criolesão tratados com USPBI os animais foram contidos manualmente e submetidos ao tratamento diário com USPBI Sonomaster Microcontrolled Communicator (KW Eletrônica, Amparo, SP, Brasil) utilizando gel de carbopol, CARBOPOL® ETD 2020 NF, como agente acoplador; modo de aplicação estacionário (Fig. 1), sobre a área lesionada; modo pulsado a 1:5, ciclo de trabalho; frequência de 1 MHz; intensidade de 0,4 Wcm²; durante 3 minutos (Tabela 2) (ARTIFON *et al.*, 2012; PLENTZ *et al.*, 2008).

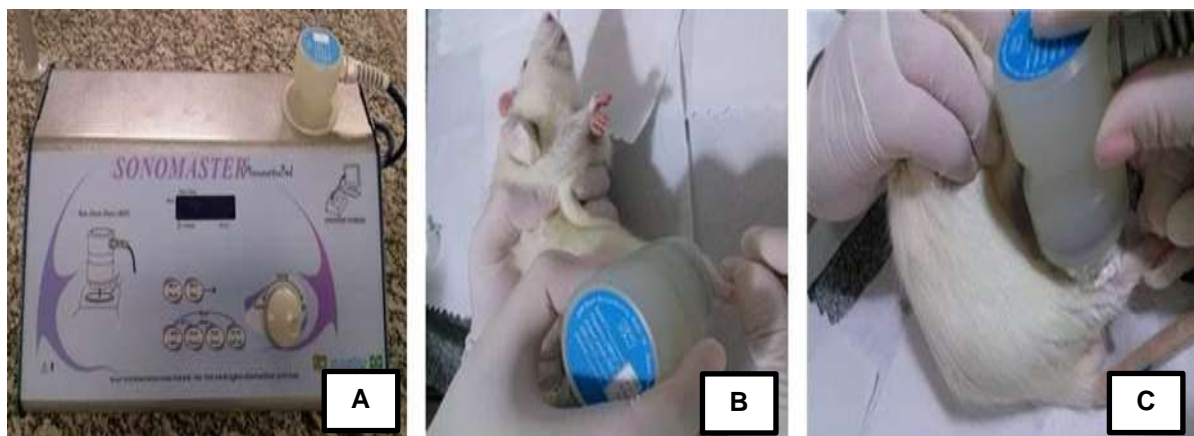


Figura 1: Demonstração do procedimento de aplicação de USPBI. **A.** Equipamento de ultrassom, modelo Sonomaster, marca KW. **B e C.** Aplicação do transdutor sobre a área lesionada.

Tabela 2. Parâmetros dosimétricos do USPBI.

PARÂMETROS	USPBI
Modo de aplicação	Estacionário
Ciclo de trabalho	1:5
Frequência	1 MHz
Intensidade	0,4 W/cm ²
Tempo de aplicação	3 minutos

3.6. Eutanásia dos animais e remoção dos músculos

Após o período experimental de cada grupo, os animais foram eutanasiados utilizando superdose de anestésico, sendo 400 mg /Kg peso do animal de Ketamina à 10% (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 40 mg/Kg de peso do animal de Xilazina à 2% (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Em seguida, os músculos TA foram retirados e pesados. Para o processamento histológico, amostras dos músculos foram coletadas e fixadas durante 24 horas em formol tamponado a 10% pH 6,5. Para o processamento da análise de expressão gênica as amostras foram retiradas e imediatamente armazenadas em freezer a -80°C.

3.7. Processamento histológico: coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e PicroSirius Red

Os tecidos foram desidratados em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 90 minutos cada, passados três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol (Reagen). A impregnação e inclusão em parafina (Sigma, USA) foi efetuada em duas incubações durante 1 hora a 60°C. Os músculos foram clivados e incluídos transversalmente com as porções centrais do fragmento posicionadas mais externamente no bloco. Foram feitos em média 03 cortes de 5 µm de espessura no micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha) após chegar ao nível da lesão muscular. Os cortes foram colocados em lâminas de microscopia desengorduradas e previamente filmadas, silanizadas, mantidos em estufa a

37°C durante 12 horas e submetidos às colorações histológicas de H&E e PicroSirius Red.

3.8. Análise morfológica quantitativa e qualitativa

Para análise quantitativa, cinco áreas (duas centrais e três nas bordas da lesão) correspondentes a 50% da área total da lesão foram fotografadas com auxílio de microscópio de luz convencional (Zeiss Axioplan 2, Alemanha). As imagens foram analisadas por um patologista experiente, sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais, usando o “plugin count cells” do software “Image J” (National Institute of Health - NIH, EUA). Foram contabilizadas as células inflamatórias totais, a mionecrose, os vasos sanguíneos maduros e as fibras musculares imaturas (novas). Pelo menos três lâminas de cada animal foram examinadas e os dados submetidos à análise estatística. Já na análise qualitativa dos cortes corados com H&E, foram descritos os aspectos relacionados ao edema presente ou não, nos diversos grupos.

3.9. Análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas

Cortes histológicos adicionais foram corados com PicroSirius Red (Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguindo o método descrito por JUNQUEIRA et al, 1982 e examinados com auxílio de microscópio de luz polarizada Pol-Interferencial Photomicroscope (Modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram quantificadas pelo programa Image J (National Institute of Health - NIH, EUA), no qual a área relativa ocupada pelas fibras colágenas foi calculada em relação à área total do corte, conforme descrito por HADI et al, 2011.

3.10. Extração e controle de qualidade de RNA total

Para este procedimento foi utilizado 80-100 mg do tecido muscular na região da área lesionada. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido e em seguida homogeneizado em 1 mL do reagente TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), para o isolamento do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Após a lise celular, foi adicionado 300 µL de clorofórmio gelado, incubado em temperatura ambiente por 03 minutos e centrifugação a 10.200 rpm durante 15 minutos a 4°C, para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína) e a fase aquosa

superior contendo o RNA total foi transferida para um novo microtubo. A concentração do RNA total e pureza foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) com comprimento de onda 260 e 280 nm e as amostras foram armazenadas a -80°C. Para análise da integridade do RNA total, 1 µg de RNA foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

3.11. Síntese do DNA Complementar (cDNA) e PCR em tempo real quantitativo (qPCR).

O RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems) para a obtenção do cDNA que foi utilizado para a reação de PCR em tempo real utilizando o “SYBR Green Kit” (Applied Biosystems).

Para este procedimento as amostras foram analisadas em triplicata e as reações realizadas em um termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA). Oligonucleotídeos iniciadores (“primers forward e reverse”) específicos para as os FRMs MyoD (forward: 5'-GGAGACATCCTCAAGCGATGC-3'; reverse: 5'-AGCACCTGGTAAATCGGATTG-3'; produto: 80 pb) e Miogenina (forward: 5'-ACTACCCACCGTCCATTAC-3'; reverse: 5'-TCGGGGCACTCACTGTCTCT-3'; produto: 140 pb) foram usados para a realização deste procedimento.

Para normalização dos dados foram utilizados primers para o gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) (forward: 5'-GCATCCTGGGCTACACTGA-3'; reverse: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3'; produto: 90 pb).

Para a comparação entre os dados entre os grupos (controle e tratado), unidades arbitrárias foram calculadas da seguinte forma:

Unidade Arbitrária = $2^{-\Delta\Delta TC}$,

Sendo $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ amostra} - \Delta CT \text{ controle}$

(CT: “threshold cycle”).

3.12. Análise dos Resultados

Foram obtidos os valores médios e desvio padrão de cada grupo. A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados tiveram distribuição paramétrica e foram submetidos ao teste de variância ANOVA seguido do teste de Tukey. Foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

- 4.1. Artigo 1:** Artigo em preparação a ser submetido para publicação na Revista Muscle & Nerve.

ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE MODULA O PROCESSO DE REPARO MUSCULAR APÓS LESÃO AGUDA.

Título resumido: ultrassom pulsado de baixa intensidade e reparo muscular.

Ribeiro JS¹, Alves AN², Ribeiro BG², Silva E³, Bussadori SK^{4,5}, Silva DFT⁵, França CM^{4,5}, Fernandes KPS⁵, Mesquita-Ferrari RA^{4,5}.

1. Mestranda em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil.
2. Doutorando em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil.
3. Graduando de Fisioterapia, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil.
4. Docente do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil.
5. Docente do Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil.

Autor correspondente: Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari. Av. Francisco Matarazzo, 612, Água Branca, São Paulo, SP, Brasil. CEP. 05001-100. Fone: (11) 3665-9325, fax: (11) 3365-9301 e-mail- raquel.mesquita@gmail.com

Resumo

O ultrassom pulsado de baixa intensidade (USPBI) tem sido utilizado por promover um reparo muscular de melhor qualidade e menor duração, porém, não há padronização quanto aos parâmetros utilizados na prática clínica. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do USPBI sobre o reparo do músculo esquelético de rato após criolesão. Foram utilizados 45 ratos Wistar, machos, divididos em 3 grupos experimentais: controle; somente lesão; lesionado tratado com USPBI. A aplicação de USPBI foi realizada diariamente após indução da lesão, modo estacionário, pulsado 1:4, frequência 1 MHz, intensidade 0,4 W/cm², durante 3 minutos. Os grupos lesionados foram eutanasiados após 1, 2, 3 e 7 dias da indução da lesão. O músculo tibial anterior (TA) foi removido para análise morfológica e de remodelamento do colágeno, sendo os cortes corados com H&E e Picrosirius Red, respectivamente. As lâminas foram fotografadas e quantificadas com auxílio do programa "Image J". A expressão gênica de MyoD e miogenina foi obtida por PCR em tempo real. Os resultados evidenciaram que o USPBI promoveu modulação da resposta inflamatória, havendo redução do infiltrado inflamatório após 1, 2, 3 e 7 dias, e redução da mionecrose após 7 dias, seguido pelo aumento no número de fibras imaturas após 3 e 7 dias, e aumento dos vasos sanguíneos nos dias 2, 3 e 7 dias. Em relação à deposição de colágeno, os resultados evidenciaram melhor organização das fibras em todos os períodos experimentais, além de aumento da deposição de fibras colágenas no grupo lesionado e tratado após 2 e 3 dias. Além disso, o tratamento com USPBI promoveu aumento da expressão gênica de MyoD após 3 dias e redução após 7 dias. Em relação a expressão de miogenina, o grupo tratado demonstrou aumento da expressão após 7 dias. Em conclusão, o USPBI nos parâmetros utilizados induziu efeitos positivos ao processo de reparo muscular causando redução do processo inflamatório e mionecrose, aumento de fibras jovens vasos sanguíneos maduros, além de modulação de MyoD e miogenina nos diferentes períodos avaliados.

Palavras-chave: Reparo muscular; ultrassom pulsado de baixa intensidade; colágeno; células satélites, MyoD e miogenina.

Abstract

The low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) has been used to promote muscle repair with better quality and in shorter time, however, there is no standardization for the parameters used in clinical practice. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of USPBI on the repair of skeletal muscle of rats after cryoinjury. Male Wistar rats (n=45) were divided into 3 groups: control; only injury; Injured and treated with LIPUS. The LIPUS application was performed daily, using the stationary mode, pulse 1: 4, 1 MHz frequency, intensity 0.4 W / cm² for 3 minutes. The injured groups were euthanized at 1, 2, 3 and 7 days following injury induction. The tibialis anterior muscle (TA) was removed for morphological analysis and collagen remodeling, and the muscle sections stained with H&E and Picrosirius Red, respectively. Then, the slides were photographed and quantified using the program "Image J". The analysis of MyoD and myogenin gene expression was performed using real time PCR. The results showed that the USPBI promoted modulation of inflammatory responses with a decrease of inflammatory infiltrates after 1, 2, 3 and 7 days, and reduction of myonecrosis after 7 days, followed by an increase in the number of immature fibers after 3 and 7 days, and increase of blood vessels on days 2, 3 and 7 days. Regarding the deposition of collagen, the results showed better organization of the fibers in all experimental periods, and increased deposition of collagen fibers in the injured group and treated after 2 and 3 days. In addition, treatment with LIPUS promoted increased gene expression of MyoD reduction after 3 days and after 7 days. Regarding myogenin expression, the treated group showed increased expression after 7 days. In conclusion, the LIPUS induced positive effects on muscle repair process leading to reduced inflammation and myonecrosis, increased in the immature fibers and mature blood vessels, as well as modulation of Myod and miogenin in different periods.

Keywords: Muscle repair; collagen; low-intensity pulsed ultrasound; satellite cells; MyoD; myogenin.

Introdução

Os músculos esqueléticos são tecidos dinâmicos, compostos por fibras musculares envoltas em uma matriz extracelular, com alta capacidade adaptativa e regenerativa, capazes de responder prontamente a um estímulo incluindo o exercício físico, imobilização, alterações hormonais e lesões por diferentes causas, por exemplo criolesão^{1,2}, contusão³. A incidência de lesões musculares evidenciada na prática clínica é bastante elevada, e após uma lesão muscular uma cascata de eventos se inicia de forma a permitir que haja a regeneração deste tecido. Inicialmente ocorre a mionecrose das fibras musculares e na sequência infiltração de células inflamatórias, fagocitose das células lesadas, ativação das células satélites (CS) e, por último, a diferenciação das células precursoras miogênicas, as quais vão dar origem à novas fibras musculares^{1,2, 7, 8}. Durante estas fases, as CS expressam fatores transcricionais (fatores regulatórios miogênicos - MRFs) que regulam cada etapa, sendo MyoD e Myf5 relacionados a proliferação e migração de CS e Miogenina e MRF4 relacionados a fase de diferenciação destas células musculares^{12, 13}.

Após a lesão muscular há uma invasão de células inflamatórias neste local, sendo este infiltrado composto por vários tipos de células, como os neutrófilos e os macrófagos. Os neutrófilos são os primeiros a chegarem ao sítio de lesão (imediatamente após a lesão, até aproximadamente 24 horas após), sendo substituídos gradativamente pelos macrófagos, por volta de 24 à 48 horas^{14, 15}.

Durante o reparo muscular os componentes do tecido conjuntivo (TC) também sofrem modificações de forma a permitir que este processo aconteça de forma adequada. Este tecido é composto de células e de matriz extracelular, cujos componentes se remodelam para melhor atender a demanda tecidual. No tecido muscular a MEC é composta por fibronectina, proteoglicanos, laminina e colágenos, tipo I, III e IV^{18, 19}, e seu remodelamento, envolve a síntese e degradação de seus componentes, sendo estes realizados por enzimas dependentes de cálcio e zinco chamadas metaloproteases de matriz (MMPs)^{18, 20}. O adequado remodelamento da MEC durante a regeneração muscular é de extrema importância uma vez que a fibrose excessiva no tecido muscular representa uma barreira mecânica à migração e fusão celular, limitando a perfusão vascular no local da lesão, impedindo a regeneração normal após lesão deste tecido^{11, 19, 23}.

Um recurso terapêutico muito utilizado nos últimos 60 anos, na prática clínica, para promover de forma mais rápida e de melhor qualidade o reparo muscular é o ultrassom pulsado de baixa intensidade. Este é uma forma de energia mecânica, que pode ser transmitida para os tecidos biológicos, como ondas de alta frequência acústica ^{3, 13}.

Este opera em uma faixa de 0,1 à 0,7 W/cm². Os efeitos do USPBI dependem de diversos fatores físicos tais como: frequência, entre 0,75 à 3 MHz; intensidade, que varia de 0, 1 à 3W/cm²; tempo de exposição, variando entre 3 e 20 minutos e estado fisiológico dos tecidos. Devido a esta variedade de parâmetros a serem ajustados, há grande dificuldade na compreensão exata do mecanismo de ação do US nos tecidos biológicos ^{2, 3, 5, 6, 8, 23, 24}. Os efeitos do USPBI podem ser divididos entre térmicos e não térmicos. Os efeitos térmicos, ou seja, emissão contínua de ondas sonoras, definido como ultrassom contínuo (USC), provocam uma alteração térmica nos tecidos, resultando em um aquecimento tecidual. Os não térmicos, ou seja, emissão pulsada das ondas sonoras, definido como ultrassom pulsado (USP), resultam do efeito mecânico da energia do US, levando a alterações como cavitação estável e micromassagem dentro dos tecidos, podendo também gerar calor ²⁵.

Há grande interesse no estabelecimento de recursos e terapias a serem utilizados na tentativa de proporcionar um processo de reparo muscular de melhor qualidade e menor duração. Desta forma, destaca-se o uso do US terapêutico durante o processo de reparo muscular, no intuito de promover uma regeneração de melhor qualidade, em menor tempo. Embora muito utilizado na prática clínica ainda existe pouco conhecimento no que se refere a efeitos biológicos, mecanismos de ação e protocolos a serem utilizados para modular positivamente a regeneração muscular.

Materiais e Métodos

A metodologia utilizada no presente estudo foi conduzida segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996), e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animais da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (AN0026/2014). Este estudo foi realizado no laboratório de pesquisa do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação da UNINOVE.

Animais

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

Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 03 grupos experimentais:

Controle: Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento, havendo somente remoção do músculo tibial anterior (TA) ($n=5$);

Criolesão sem tratamento: Os animais foram apenas criolesionados no músculo tibial anterior direito (TAD), e não receberam tratamento com US ($n=20$);

Criolesão tratado com US: Os animais foram criolesionados no músculo TAD e tratados com US ($n=20$);

Os animais dos grupos lesionados foram eutanasiados após 1, 2, 3 e 7 dias da lesão para tornar possível a determinação dos aspectos morfológicos e síntese de colágeno e para a expressão de FRMs. Os animais do grupo controle foram eutanasiados no primeiro dia do experimento.

Procedimento de criolesão

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o descrito por MIYABARA *et al.*, 2005; BAPTISTA *et al.*, 2011 e MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011. Os animais foram pesados e em seguida anestesiados proporcionalmente à massa corporal com administração intraperitoneal de ketamina 10% (100 mg/Kg de massa do animal - Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e xilazina 2% (10 mg/Kg de massa do animal - Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina com a agulha Ultra-Fine® (regular), comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado. Posteriormente à indução anestésica, os animais

foram posicionados em uma superfície plana e realizado a tricotomia da região correspondente ao músculo TA.

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 na superfície ventral do músculo, com características semelhantes, de forma limpa, causando menor variabilidade na severidade da lesão (ALVES *et al.*, 2013; ASSIS *et al.*, 2012; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; BAPTISTA *et al.*, 2010).

Procedimento de tratamento com USPBI

Nos grupos criolesão tratados com USPBI os animais foram contidos manualmente e submetidos ao tratamento diário com USPBI Sonomaster Microcontrolled Communicator (KW Eletrônica, Amparo, SP, Brasil) utilizando gel de carbopol, CARBOPOL® ETD 2020 NF, como agente acoplador; modo de aplicação estacionário, sobre a área lesionada; modo pulsado a 1:5, ciclo de trabalho; frequência de 1 MHz; intensidade de 0,4 Wcm²; durante 3 minutos (ARTIFON *et al.*, 2012; PLENTZ *et al.*, 2008).

Eutanásia dos animais e remoção dos músculos

Após o período experimental de cada grupo, os animais foram eutanasiados utilizando superdose de anestésico (400 mg/Kg de massa do animal de Ketamina à 10% - Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil e 40 mg/Kg de massa do animal de Xilazina à 2% - Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Em seguida, os animais foram pesados e os músculos TA retirados e pesados. Para o processamento histológico, amostras dos músculos foram coletadas e fixadas durante 24 horas em formol tamponado a 10% pH 6,5. Para o processamento da análise de expressão gênica as amostras foram retiradas e imediatamente armazenadas em freezer a -80°C.

Processamento histológico: coloração com H&E e PicroSirius Red

Os tecidos foram desidratados em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 90 minutos cada, passados três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol (Reagen). A impregnação e inclusão em parafina (Sigma, USA) foi efetuada em duas incubações durante 1 hora a 60°C. Os músculos foram clivados e incluídos transversalmente com as porções centrais do fragmento posicionadas mais

externamente no bloco. Foram feitos em média 03 cortes de 5 µm de espessura no micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha) após chegar ao nível da lesão muscular. Os cortes foram colocados em lâminas de microscopia desengorduradas e previamente filmadas, silanizadas, mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas e submetidos às colorações histológicas de hematoxilina e eosina (H&E) e PicroSirius red.

Análise morfológica quantitativa e qualitativa

Para análise quantitativa, cinco áreas (duas centrais e três nas bordas da lesão) correspondentes a 50% da área total da lesão foram fotografadas com auxílio de microscópio de luz convencional (Zeiss Axioplan 2, Alemanha). As imagens foram analisadas por um patologista experiente, sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais, usando o plugin count cells do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA). Foram contabilizadas as células inflamatórias totais, a mionecrose, os vasos sanguíneos e as fibras musculares imaturas (novas), por área. Pelo menos três lâminas de cada animal foram examinadas e os dados submetidos à análise estatística. Já na análise qualitativa dos cortes corados com H&E, foram descritos em relação ao edema presente ou não, nos diversos grupos.

Análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas

Cortes adicionais foram corados com Picrosírius Red (Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguindo o método descrito por JUNQUEIRA *et al*, 1982 e examinados com auxílio de microscópio de luz polarizada Pol-Interferencial Photomicroscope (Modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram analisadas pelo programa Image J (National Institute of Health - NIH, EUA), no qual a área relativa ocupada pelas fibras colágenas foi calculada em relação à área total do corte, conforme descrito por HADI *et al*, 2011.

Extração e controle de qualidade de RNA total

Para este procedimento foi utilizado 80-100 mg do tecido muscular macerado em nitrogênio líquido e em seguida homogeneizado em 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), para o isolamento do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Após a lise celular, será adicionado 300 µL de clorofórmio gelado, incubado em temperatura ambiente por 03 minutos e centrifugação a 10.200 rpm durante 15 minutos a 4°C, para separação das

diferentes frações (DNA, RNA e proteína) e a fase aquosa superior contendo o RNA total será transferido para um novo microtubo. A concentração do RNA total e pureza foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) com comprimento de onda 260 e 280 nm e as amostras foram armazenadas a -80°C. Para análise da integridade do RNA total, um µg de RNA foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

Síntese do DNA Complementar (cDNA) e PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

O RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems) para a obtenção do cDNA que foi utilizado para a reação de PCR em tempo real utilizando o “SYBR Green Kit” (Applied Biosystems). Para este procedimento as amostras foram analisadas em triplicata e as reações realizadas em um termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA). Oligonucleotídeos iniciadores (“primers forward e reverse”) específicos para as os FRMs MyoD (forward: 5'-GGAGACATCCTCAAGCGATGC-3'; reverse: 5'-AGCACCTGGTAAATCGGATTG-3'; produto: 80 pb) e Miogenina (forward: 5'-ACTACCCACCGTCCATTAC-3'; reverse: 5'-TCGGGGCACTCACTGTCTCT-3'; produto: 140 pb) foram usados para a realização deste procedimento. Para normalização dos dados foram utilizados primers para o gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) (forward: 5'-GCATCCTGGGCTACACTGA-3'; reverse: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3'; produto: 90 pb). Para a comparação entre os dados entre os grupos (controle e tratado), unidades arbitrárias foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Unidade Arbitrária} = 2^{-\Delta\Delta CT},$$

Sendo $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ amostra} - \Delta CT \text{ controle}$ (CT: “threshold cycle”).

Análise estatística

Foram obtidos os valores médios e desvio padrão de cada grupo. A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para determinar diferenças

significantes entre todos os grupos experimentais e controle adotando o nível de significância de $p \leq 0,05$.

Resultados

Análise morfológica qualitativa

Na análise morfológica qualitativa verificou-se que os músculos do grupo controle apresentaram aspecto histológico normal com presença de fibras com núcleos periféricos, sem sinais de lesão ou processo inflamatório, como esperado (Fig. 1 A). Os grupos lesionados sem tratamento após 1, 2 e 3 dias, demonstraram edema entre as fibras musculares, com moderado a intenso infiltrado inflamatório, respectivamente. Estas apresentaram-se em grande parte necróticas (mionecrose) (Fig. 1 B, 1 D, e 1 F). Os grupos tratados com USPBI demonstraram redução do edema, nos respectivos períodos 1, 2 e 3 dias. O grupo 7 dias não apresentou edema (Fig. 1 H e 1 I).

Análise morfológica quantitativa

Na análise morfológica quantitativa evidenciou-se que o USPBI promoveu redução do infiltrado inflamatório (Fig. 1 B a 1 I) em todos os períodos avaliados ($p<0,01$), e redução da mionecrose após 7 dias ($p<0,01$), no grupo tratado, em relação ao somente lesionado (Fig. 1 H e 1 I). Além disso foi observado que nos grupos criolesionados submetidos à USPBI houve um aumento significativo ($p<0,01$) dos vasos sanguíneos nos períodos 2, 3 e 7 dias, (Fig. 1 D a 1 I), associado ao aumento do número de fibras imaturas (novas) nos períodos 3 e 7 dias ($p<0,01$) (Fig. 1 F a 1 I) quando comparado aos respectivos períodos que não receberam tratamento. O grupo controle apresentou diferença significativa com relação à todos os grupos analisados ($p<0,01$).

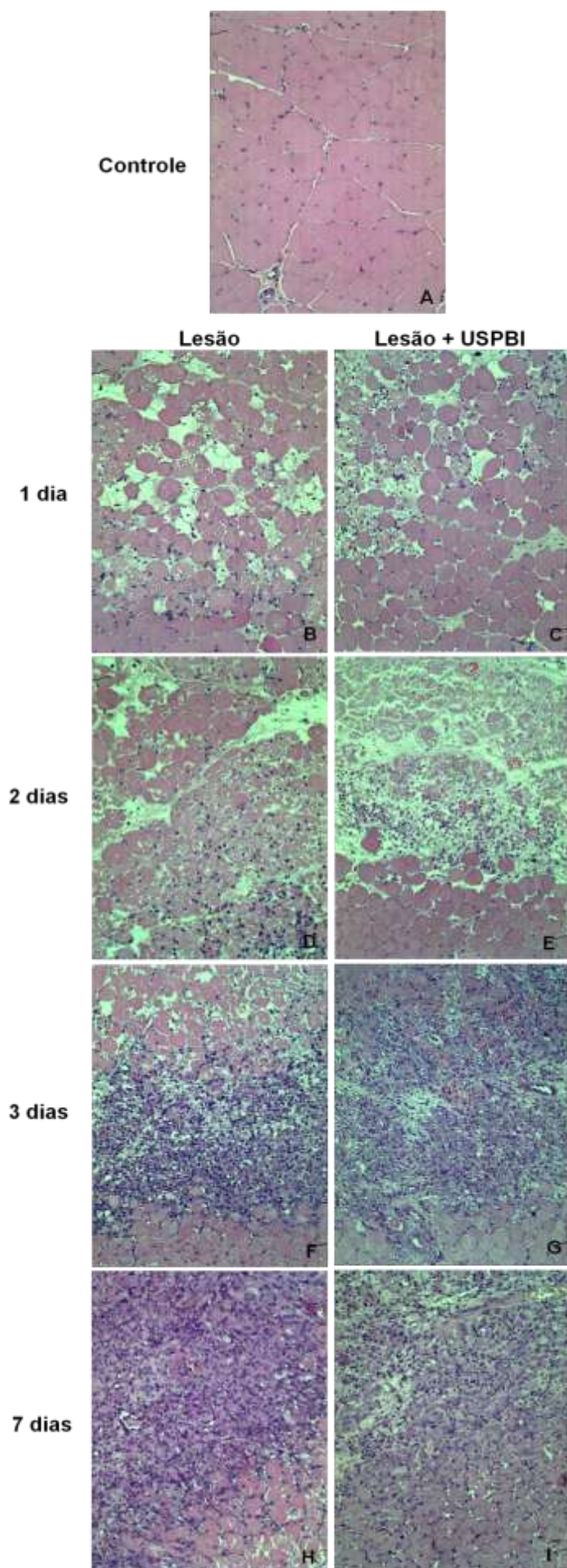
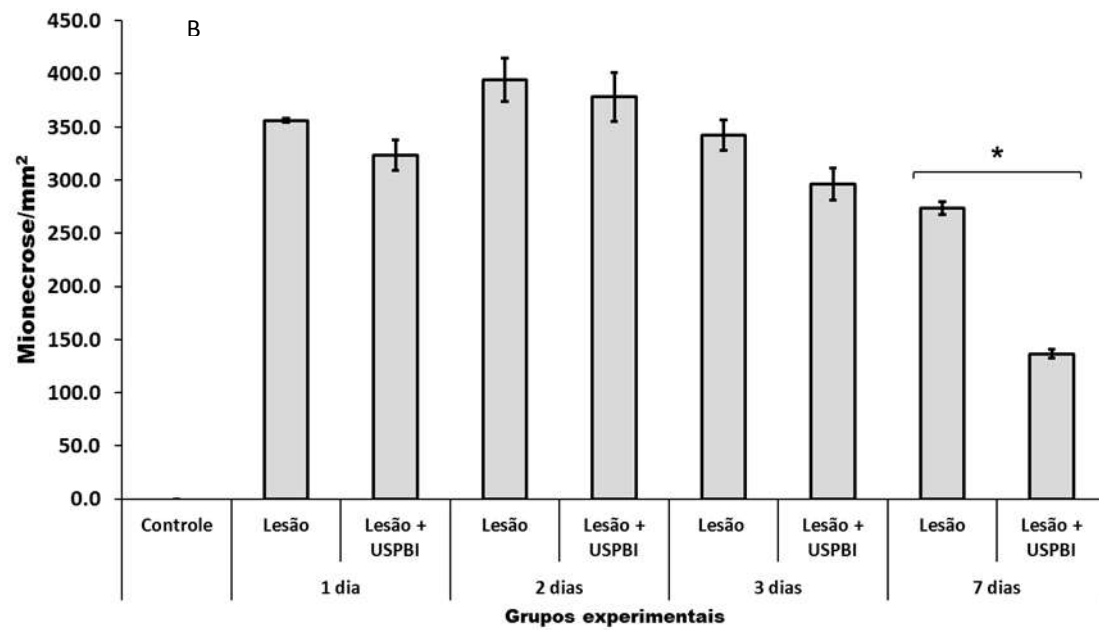
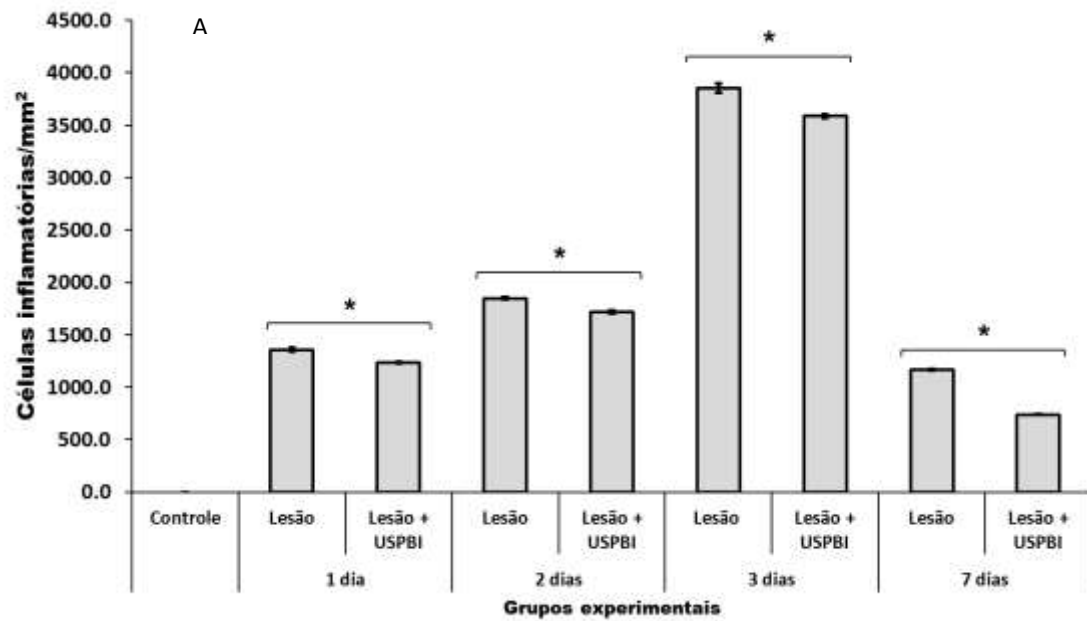


Figura 1: Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por hematoxilina & eosina (aumento original, 100x). (A) Músculo controle exibindo morfologia normal. (B) Criolesionado após 1 dia. (C) Criolesionado submetida ao USPBI após 1 dia, ambas mostrando edema e mionecrose. (D) Criolesionado sem tratamento após 2 dias com edema, mionecrose e infiltrado inflamatório. (E) Criolesionado submetido à USPBI após 2 dias com edema, mionecrose e infiltrado inflamatório. (F e G) Criolesionado sem tratamento e tratado com USPBI, respectivamente, após 3 dias mostrando vasos sanguíneos e edema. (H e I) Criolesionado sem tratamento e submetido à USPBI, respectivamente, após 7 dias, mostrando fibras imaturas e vasos sanguíneos.



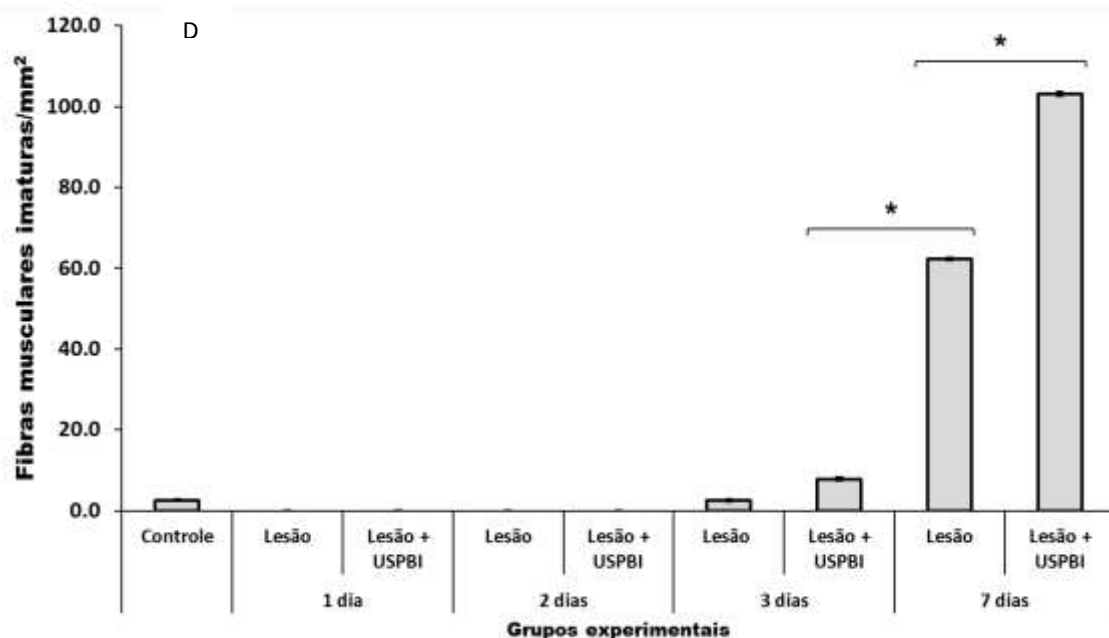
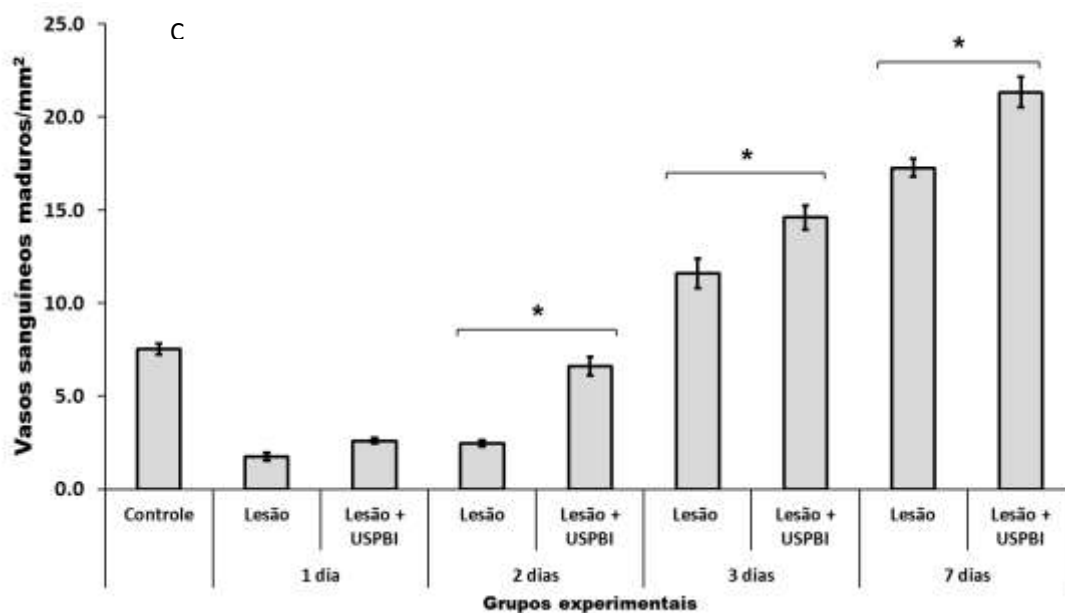


Figura 2: Efeitos do UST sobre o número total de células inflamatórias (A); mionecrose (B); vasos sanguíneos maduros (C) e fibras imaturas (D). Os valores estão expressos em média e desvio padrão (ANOVA/Tukey). * $p < 0,01$ comparado com o grupo criolesionado sem tratamento.

Deposição e organização de colágeno

A análise feita utilizando coloração de PicroSirius Red permitiu verificar que o grupo controle apresentou distribuição uniforme e organizada das fibras colágenas na região de endomísio e perimísio (Fig. 3 A). Após 1, 2 e 3 dias, a distribuição do colágeno foi semelhante nos grupos com e sem USPBI, com fibras dispersas no local infiltrado por células inflamatórias e no espaço celular das fibras de necrosadas (Fig. 3 B, C, D, E e G). No grupo 7 dias, as fibras de

colágeno começaram a apresentar maior organização em feixes em ambos grupos, tratado e não tratado com USPBI (Fig 3 H e I). No grupo criolesionado sem tratamento foi observada distribuição difusa e desorganizada do colágeno predominantemente nas regiões de endomísio e perimísio (Fig. 3 B, D, F e H). Já o grupo submetido à USPBI apresentou maior organização dos feixes de colágeno dispostos de forma compacta, principalmente na região do perimísio no grupo 7 dias (Fig. 3 C, E, G e I).

A quantificação da área de deposição de colágeno por imagens analisadas sob luz polarizada demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados após 1 e 7 dias, lesionados e tratados ou não com USPBI ($p>0,05$). Contudo, observou-se um aumento significativo na deposição de colágeno nos grupos criolesionados submetido à USPBI após 2 e 3 dias em comparação aos grupos criolesionados sem tratamento nos mesmo períodos de avaliação ($p<0,01$).

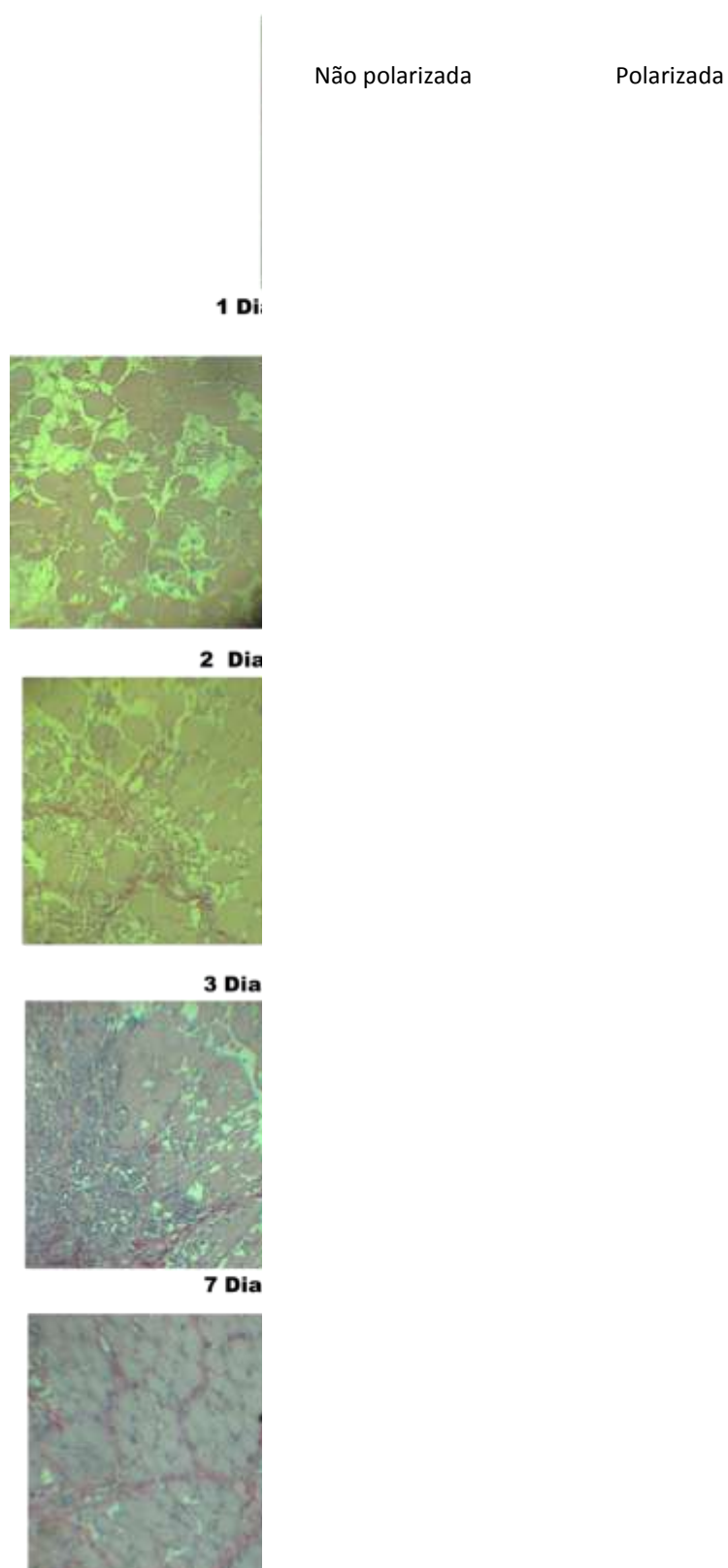


Figura 3: Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por Picrosírius com e sem luz polarizada (aumento original, 400x). Figuras ilustrativas das imagens usadas na quantificação da porcentagem de fibras colágenas por área utilizando a microscopia de luz polarização.

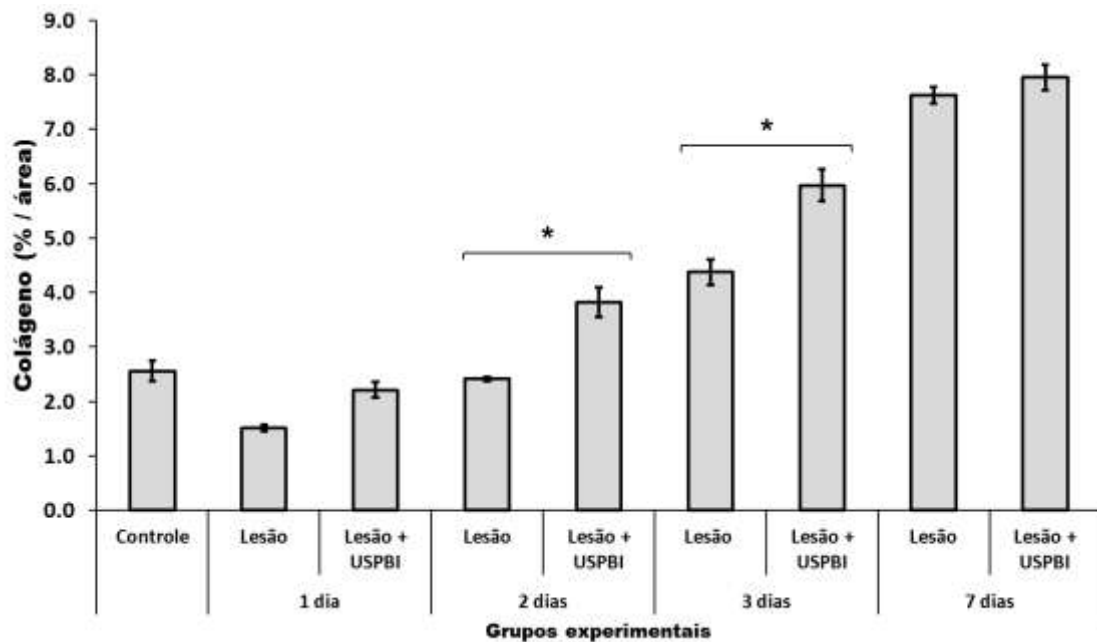


Figura 4: Quantificação da área de fibras de colágeno no TA em porcentagem com relação à área total do músculo. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (ANOVA / Tukey). * $p < 0,01$ quando comparado com os demais grupos experimentais.

Expressão gênica de FRMs

A análise de expressão gênica dos FRMs permitiu evidenciar que após 3 dias houve um aumento de mRNA de MyoD no grupo tratado com USPBI em relação ao grupo não tratado. Já em 7 dias houve redução deste FRM no grupo USPBI em relação ao grupo não tratado do mesmo período (Fig. 5).

Em relação a expressão de miogenina foi possível verificar um aumento no grupo USPBI em relação ao grupo lesionado sem tratamento. Nos demais períodos não houve diferença na expressão deste (Fig.5).

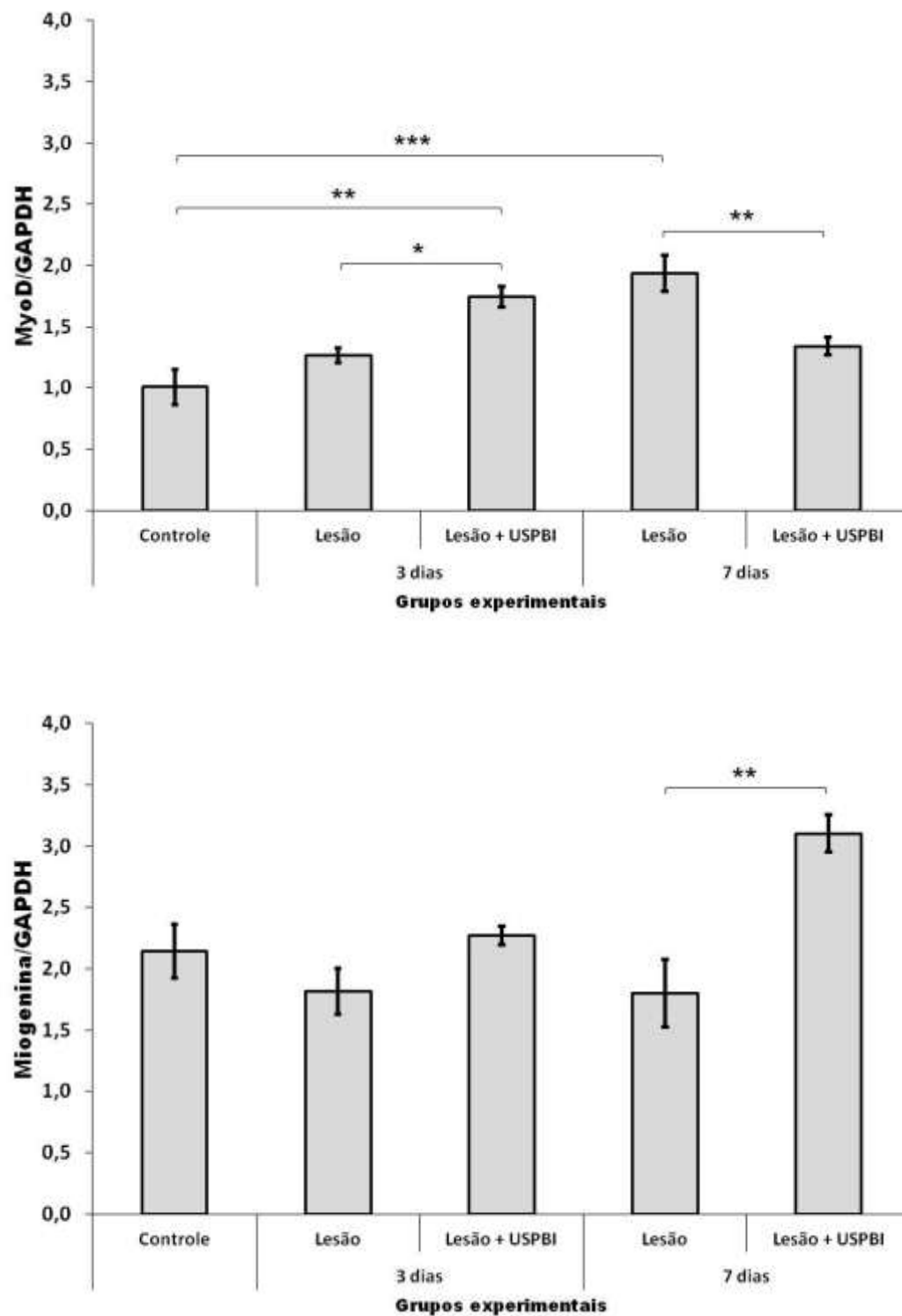


Figura 5: Quantificação da expressão gênica dos FRMs (MyoD e Miogenina). Os valores estão expressos como média e desvio padrão (ANOVA / Tukey).

Discussão

O ultrassom (US) apresenta inúmeras respostas sobre a modulação do processo inflamatório e sobre o reparo do músculo esquelético de ratos, após lesão aguda, conforme avaliado em diversos estudos ^{1, 2, 3, 5, 7, 18, 19, 20, 25, 26, 27,28,29}. Porém os protocolos estudados apresentam inúmeras divergências quanto ao mecanismo de ação e parâmetros à serem utilizados.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que houve uma modulação do processo inflamatório, nos grupos tratados com USPBI, promovendo uma redução do infiltrado inflamatório em todos os períodos experimentais e da mionecrose após 7 dias, aumento no número de vasos maduros após 2, 3 e 7 dias, associado com aumento no número de fibras imaturas após 3 e 7 dias.

Achados estes que corroboram com o descrito por ARTIFON et al., 2012, observaram que o US (1MHz; pulsado; 0,2 W/cm², 0,5 W/cm² e 1,0 W/cm²; por 3 minutos) aumentou o número de fibras imaturas, no grupo 0,2 W/cm² em comparação aos grupos tratados com US nas intensidades 0,5 W/cm² e 1,0 W/cm².

No tecido muscular esquelético, a família de colágeno é de suma importância para o processo de reparo muscular, manutenção da integridade das fibras musculares e adequada relação de força, durante a contração muscular ^{19, 21}.

PIEDEDE et al., 2008, utilizaram o US (ERA 2,5 cm²; F: 1,5 MHz, I: 30 mW/cm²; Modo: pulsado; tempo 20 min/sessão, por 7 ou 13 dias), demonstrou efeitos sobre a síntese de colágeno, evidenciando um aumento na deposição das fibras durante o processo de reparo, após criolesão em tibial anterior, e melhor alinhamento das mesmas. Neste estudo os grupos 7 e 13 dias apresentaram maior quantidade de fibras de colágeno depositadas e um melhor alinhamento das mesmas, quando comparado com o grupo controle, e melhor alinhamento e distribuição das fibras colágenas em todos os períodos experimentais, nos grupos tratados com USPBI, dados estes que corroboram com nossos achados.

RENNÓ et al, 2011 avaliaram o efeito do US (intensidade 0,3 W/cm²; frequência 1,5 MHz; Modo pulsado; tempo 20 min/sessão, modo estacionário) e laser de baixa potência (830 nm; 107 W/cm²; 50 J/cm²; 30 mW; T=47s) por 11 dias, durante o processo de reparo, após induzirem lesão por criolesão em tibial anterior (TA) e seus resultados evidenciaram que tanto o grupo US como

o grupo laser demonstraram redução da lesão tecidual, com redução do infiltrado inflamatório e edema.

Estudos têm evidenciado um efeito do USPBI na aceleração do processo de regeneração muscular^{1, 2, 3, 4, 7, 18, 20, 25, 27, 29}. Desta forma no presente estudo foi avaliada a expressão de FRMs relacionados as diferentes fases do processo de reparo para investigar o possível efeito modulatório do USPBI neste aspecto. Os resultados demonstraram que este recurso terapêutico modulou a expressão destes induzindo especialmente um aumento de MyoD após 3 dias e miogenina após 7 dias em relação ao grupo não tratado evidenciando uma antecipação da expressão destes e, junto com os demais resultados encontrados, uma modulação positiva do processo de reparo no que se refere a questão temporal.

Em conclusão, o USPBI nos parâmetros utilizados induziu efeitos positivos ao processo de reparo muscular causando redução do processo inflamatório e mionecrose, aumento de fibras musculares imaturas e de vasos sanguíneos maduros, além de modulação de MyoD e miogenina nos diferentes períodos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Renno, A.C.M.; Toma, R.L.; Feitosa, S.M.; Fernandes, K.; Bossini, O.S.; Oliveira, P.; Parizotto, N.; Ribeiro, D.A. Comparative Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Low-Level Laser Therapy on Injured Skeletal Muscle. *Photomedicine and Laser Surgery*; 29 (1): 5-10, 2011
2. Montalti, C.S.; Souza, N.V.K.L.; Rodrigues, N.C.; Fernandes, K.R.; Toma, R.L.; Renno, A.C.M. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on injured skeletal muscle. *Braz J Phys Ther.*; 17(4):343-350, 2013.
3. Freitas, L.S.; Freitas, T.P.; Silveira, P.C.; Rocha, L.G.; Pinho, R.A.; Streck, E.L. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell Biology International*. 31:482-488, 2007.
4. 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*. 18: 341-344, 2012.
5. Matheus, J.P.C.; Oliveira, F.B.; Gomide, L.B.; Milani, J.G.P.O.; Volpon, J.B.; Shimano, A.C. Efeitos do ultrassom terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. *Rev Bras Fisioter*. 12: 241-7, 2008.

6. Jarvinen, T.A.H.; Jarvinen, M.; Kalimo, H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*.; 3 (4): 337-345, 2013
7. Alfredo, P.P.; Anaruma, C.A.; Pião, A.C.; João, S.M.A.; 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*. 15 (3):273-9, 2008
8. Motohashi, N and Asakura, A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Frontiers in cell and developmental biology*. Stem Cell Research. vol 2 art 1 pag 1 -11, 2014.
9. Abujarour, R.; Valamehr, B. Generation of skeletal muscle cells from pluripotent stem cells: advances and challenges. *Frontiers in cell and developmental and biology*. Vol 3 art 29 pag 1-5, May 2015.
10. Nagata, k.; Nakamura, T.; Fujihara, S.; Tanaka, E. Ultrasound Modulates the Inflammatory Response and Promotes Muscle Regeneration in Injured Muscles. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 41, No. 6, pp. 1095–1105 DOI: 10.1007/s10439-013-0757-y, 2013.
11. Tidball, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.288:R345-R353,2005.
12. Saclier, M.; Cuvellier, S.; Magnan, M.; Mounier, R.; Chazaud, B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS Journal* 280 4118–4130, 2013
13. 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.
14. Garg, K.; Corona, B.T and Walters, T.J. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. *Frontiers in pharmacology*. volume 6 | Article 87 pag 1-9, 2015.
15. Mann, C.J.; Perdiguero, E.; Kharraz, Y.; Aguilar, S.; Pessina, P.; Serrano, A.L.; et al. Review: Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle*. 1(1):21. doi: 10.1186/2044-5040-1-21, 2011.
16. Hadler-olsen, E.; Fadnes B.; Sylte, I.; Uhlin-hansen, L.; Winberg, J.O. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health. *FEBS Journal* 278: 28-45, 2011.
17. James, A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med*.11: 1-6, 2005.
18. 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 contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. *Revista Brasileira de Fisiotapia*,2008.
19. Chester, R.; Costa, C. M.; Shepstone, L.; Cooprec, A.; Donellc, S. Eccentric calf muscle training compared with therapeutic ultrasound for chronic Achilles tendon pain—A pilot study. *Manual Therapy*.13: 484–491, 2008.

20. Freitas, T.P.; Freitas, L.B.S.; Streck, E.L. Ultra-som terapêutico no mecanismo de cicatrização: uma revisão. *Arquivos Catarinenses de Medicina*. 40(1): 89-93, 2011.
21. Miyabara, E.H.; Martin, J.L.; Griffin, T.M.; Moriscot, A.S.; Mestril, R. Over expression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *J Physiol Cell Physiol*. 290(4): 1128-1138, 2006.
22. Mesquita-Ferrari R.A; Martins, M.D; Silva, J.A; Da Silva, T.D; Piovesan R.F; Pavesi, V.C et al (2011) Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 26:335-40.
23. Baptista, J; Martins, M; Pavesi, V; Bussadori, S; Fernandes, K.P.S; Mesquita-Ferrari RA (2010) Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling following injury in rats. *Photomed Laser Surg* 29:12-7.
24. Junqueira, L.C; Montes, G.S; Sanchez, E.M (1982) The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry* 74:153-6.
25. 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: 403–411, 2008
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. ROONEY, S.I.; TOBIAS, J.W.; BHATT, P.R.; KUNTZ, A.F.; SOSLOWSKY, L.J. Genetic Response of Rat Supraspinatus Tendon and Muscle to Exercise. *PLoS One*. 2015 Oct 8;10(10):e0139880. 10.1371.0139880. 2015.

5. Considerações finais

Neste estudo, buscou-se avaliar o efeito do USPBI sobre a regeneração do músculo esquelético de ratos, após lesão aguda, aliando aos dados obtidos por meio de pesquisa bibliográfica sobre a utilização do ultrassom em modelos experimentais de lesão aguda. Contudo, verifica-se que até o presente momento não há suporte científico para a utilização deste recurso no tratamento de lesões musculares, devido à carência de estudos em modelos animais e de estudos clínicos randomizados e controlados. Os presentes achados demonstram que o USPBI foi capaz de promover uma redução no número de células inflamatórias totais e da mionecrose, aumento dos vasos sanguíneos maduros e fibras imaturas, além de promover uma melhor distribuição e organização das fibras colágenas e modulação da expressão gênica de MyoD e Miogenina. Portanto, estes achados são importantes para a realização de novos estudos, a fim de proporcionar melhores entendimentos sobre os aspectos celulares e moleculares envolvidos no processo de reparo muscular, após aplicação do USPBI.

6. Referências bibliográficas

ABUJAROUR, R.; VALAMEHR, B. Generation of skeletal muscle cells from pluripotent stem cells: advances and challenges. **Frontiers in cell and developmental and biology**. Vol 3 art 29 pag 1-5, May 2015.

ALFREDO, P.P.; ANARUMA, C.A.; PIÃO, A.C.; JOÃO, S.M.A.; 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**. 15 (3):273-9, 2008

ALVES, A.N; FERNANDES, K.P.S; MELO, A.V; YAMAGUCHI, R.Y; FRANÇA, C.M; TEIXEIRA, D.F. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair processo f the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers med sci*, 2013

ALVES, A. N. ; FERNANDES, K. P. S. ; MELO, C. A. V. ; YAMAGUCHI, R. Y. ; França, C. M. ; TEIXEIRA, D. F. ; Bussadori, S. K. ; NUNES, F. D. ; MESQUITA-FERRARI, R. A. . Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers in Medical Science* , v. 29, p. 813-821, 2014.

ANDERSON, J.E. A Role for Nitric Oxide in Muscle Repair: Nitric Oxide–mediated Activation of Muscle Satellite Cells. **Molecular Biology of the Cell** Vol. 11, 1859–1874, May 2000

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**.18: 341-344, 2012.

BAREJA, A.; HOLT, J.A.; LUO, G.; CHANG, C.; LIN, J.; HINKEN, A.C.; FREUDENBERG, J.M.; KRAUST, W.E.; EVANS, W.J.; BILLIN, A.N.; Human and Mouse Skeletal Muscle Stem Cells: Convergent and Divergent Mechanisms of Myogenesis. **Plos One**. 9:1-12, 2014

BAPTISTA, J; MARTINS, M; PAVESI, V; BUSSADORI, S; FERNANDES, K.P.S; MESQUITA-FERRARI, R.A Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling following injury in rats. **Photomed Laser Surg** 29:12-7, 2010.

CHARGE, S.B.P; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regeneration of muscle regeneration. **American physiological society**. V.84, pg. 209-238, 2004

CHEN, X.; and LI, Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adhesion & Migration*. **Landes Bioscience**. 3:4, 337-341, 2009

CHESTER, R.; COSTAC, M.; SHEPSTONED, L.; COOPREC, A.; DONELL, S. Eccentric calf muscle training compared with therapeutic ultrasound for chronic Achilles tendon pain—A pilot study. **Manual Therapy**.13: 484–491, 2008.

FREITAS, L.S.; FREITAS, T.P.; SILVEIRA, P.C.; ROCHA, L.G.; PINHO, R.A.; STRECK, E.L. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. **Cell Biology International**. 31:482-488, 2007.

FREITAS, T.P.; FREITAS, L.B.S.; STRECK, E.L. Ultra-som terapêutico no mecanismo de cicatrização: uma revisão. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. 40(1): 89-93, 2011.

GARG, K.; CORONA, B.T and WALTERS, T.J. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. **Frontiers in pharmacology**. volume 6 | Article 87 pag 1-9, 2015.

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

HADI, A.M; MOUCHAERS, K.T; SCHALIJ, I; GRUNBERG, K.; MEIJER, G.A; VONK-NOORDEGRAAF, A et al. Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. **Cell Oncol (Dordr)** 34:343-54, 2011.

HADLER-OLSEN, E.; FADNES B.; SYLTE, I.; UHLIN-HANSEN, L.; WINBERG, J.O. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health. **FEBS Journal** 278: 28-45, 2011.

INNOCENZI, A.; LATELLA, L.; MESSINA, G.; SIMONATTO, M. MARULLO, F.; BERGHELLA, L.; POIZAT, C.; et al. An evolutionarily acquired genotoxic response discriminates MyoD from Myf5, and differentially regulates hypaxial and epaxial myogenesis. **EMBO reports**. 12 (2): 164-172, 2011.

JAMES, A. Airway remodeling in asthma. **Curr Opin Pulm Med**.11: 1-6, 2005.

JARVINEN, T.A.H.; JARVINEN, M.; KALIMO, H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**.; 3 (4): 337-345, 2013

JUNQUEIRA, L.C; MONTES, G.S; SANCHEZ, E.M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry** 74:153-6, 1982.

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

KUCUKGUVEN A, KHALIL R.A. Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins. **Curr Drug Targets**. 2013 Mar;14(3):287-324.

MANN, C.J.; PERDIGUERO, E.; KHARRAZ, Y.; AGUILAR, S.; PESSINA, P.; SERRANO, A.L.; et al. Review: Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skelet Muscle**. 1(1):21. doi: 10.1186/2044-5040-1-21, 2011.

MATHEUS, J.P.C.; OLIVEIRA, F.B.; GOMIDE, L.B.; MILANI, J.G.P.O.; VOLPON, J.B.; SHIMANO, A.C. Efeitos do ultrassom terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. **Rev Bras Fisioter**. 12: 241-7, 2008.

MCBRIER NM, LEKAN JM, DRUHAN LJ, DEVOR ST, MERRICK MA. Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. **Arch Phys Med Rehabil**. 2007;88:936-40.

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

MESQUITA-FERRARI, R.A, MARTINS, M.D; SILVA, J.A. Jr; DA SILVA,T.D; PIOVESAN, R.F; PAVESI, V.C et al. Effects of low-level laser therapy on

expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process.

Lasers Med Sci 26:335-40, 2011.

MIYABARA, E.H.; MARTIN, J.L.; GRIFFIN, T.M.; MORISCOT, A.S.; MESTRIL, R. Over expression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **J Physiol Cell Physiol.** 290(4): 1128-1138, 2006.

MONTALTI, C.S.; SOUZA, N.V.K.L.; RODRIGUES, N.C.; FERNANDES, K.R.; TOMA, R.L.; RENNO, A.C.M. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on injured skeletal muscle. **Braz J Phys Ther.**; 17(4):343-350, 2013.

MOTOHASHI, N and ASAKURA, A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. Frontiers in cell and developmental biology. **Stem Cell Research.** vol 2 art 1 pag 1 -11, 2014.

NAGATA, K.; NAKAMURA, T.; FUJIHARA, S.; TANAKA, E. Ultrasound Modulates the Inflammatory Response and Promotes Muscle Regeneration in Injured Muscles. **Annals of Biomedical Engineering**, Vol. 41, No. 6, pp. 1095–1105 DOI: 10.1007/s10439-013-0757-y, 2013.

OKITA M, NAKANO J, KATAOKA H, SAKAMOTO J, ORIGUCHI T, YOSHIMURA T. Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle. **Ultrasound Med Biol.** 2009;35:237-44.

PIEDEDE, 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: 403–411, 2008

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 contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**,2008.

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.** 27(1):54-9, 1999

RENNO, A.C.M.; TOMA, R.L.; FEITOSA, S.M.; FERNANDES, K.; BOSSINI ,O.S.;OLIVEIRA,P.; PARIZOTTO, N.; RIBEIRO,D.A. Comparative Effects of

Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Low-Level Laser Therapy on Injured Skeletal Muscle. **Photomedicine and Laser Surgery**; 29 (1): 5-10, 2011.

RIBEIRO, B. G. ; VITOR, E. C. ; CARDOSO, V. O. ; ARTILHEIRO, P. P. ; BUSSADORI, S. K. ; Fernandes, K.P.S. ; MESQUITA-FERRARI, R.A. . Ultrassom terapêutico na atividade mitocondrial e diferenciação de células musculares C2C12. *ConScientiae Saúde (Online)*, v. 13, p. 429-435, 2014.

ROONEY, S.I.; TOBIAS, J.W.; BHATT, P.R.; KUNTZ, A.F.; SOSLOWSKY, L.J. Genetic Response of Rat Supraspinatus Tendon and Muscle to Exercise. **PLoS One**. 2015 Oct 8;10(10):e0139880. 10.1371.0139880. 2015.

SACLIER, M.; CUVELLIER, S.; MAGNAN, M.; MOUNIER, R.; CHAZAUD, B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. **FEBS Journal** 280 4118–4130, 2013

SERRANO,A.,;L, CÁNOVES, P.M. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. **Experimental cell research**, 316:3050-3058, 2010

SHI, X; GARRY, D.J. Muscle injury: review of experimental models. **J. electromyogr kinesiol**, 2013

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

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.

VATANSEVER, F; RODRIGUES, N.C; ASSIS, L.L; PEVIANI, S.S; DURIGAN, J.L; MOREIRA, F.M., et al. Low intensity laser therapy accelerates muscle regeneration in aged rats. **Photon lasers med**. v-1, n-4, p 287-297, 2012

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

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**. 25:73-7, 2004.

Anexo 1: Protocolo de aprovação para uso de animais de experimento, emitido pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA).



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/escuro) 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 bisel 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 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 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.

Exatidão 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 bisel trifacetado.

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

Analgésico:

Manter os animais em gaiolas com aquecimento para prevenir hipotermia.

Fármaco	Tramal
Dose (UI ou mg/kg)	5 mg/kg
Via de administração	Intraperitoneal
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.

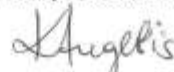
☐ () Não-Aprovado

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

Anexo 2: Submissão do artigo científico.**Muscle & Nerve**

Muscle and Nerve

Low intensity pulsed ultrasound can modulate muscle repair process after acute injury.

Journal:	<i>Muscle and Nerve</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ribeiro, Jacira Fernandes, Kristianne; Universidade Nove de Julho, Alves, Agnelo; Universidade Nove de Julho, Mestrado em Ciências da Reabilitação Ribeiro, Beatriz Silva, eriton Mesquita-Ferrari, Raquel; Universidade Nove de Julho,
Keywords:	muscle repair, skeletal muscle, acute injury, ultrasound, collagen, myogenic regulatory factors

SCHOLARONE™
Manuscripts