CRISTIANO SCHIAVINATO BALDAN

Influência do tempo de irradiação da terapia por ultrassom sobre o tecido conjuntivo no processo de reparação muscular de ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dra. Raquel Aparecida Casarotto

São Paulo
2012

CRISTIANO SCHIAVINATO BALDAN

Influência do tempo de irradiação da terapia por ultrassom sobre o tecido conjuntivo no processo de reparação muscular de ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dra. Raquel Aparecida Casarotto

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Baldan, Cristiano Schiavinato
Influência do tempo de irradiação da terapia por ultrassom sobre o tecido conjuntivo no processo de reparação muscular em ratos / Cristiano Schiavinato Baldan. -- São Paulo, 2012.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Raquel Aparecida Casarotto.

Descritores: 1.Células satélites de músculo esquelético 2.Ferimentos e traumatismos 3.Terapia por ultrassom 4.Colágeno 5.Modalidades de fisioterapia

USP/FM/DBD-401/12

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

- À Deus, que em todos os momentos se fez presente em minha vida, iluminando as minhas decisões, provendo-me saúde para enfrentar os obstáculos e colocando muitas pessoas especiais em meu entorno;
- À Alessandra, minha amada esposa, com quem divido todos os momentos, com quem quero viver o meu futuro, com quem quero tornar-me maduro sem perder a alegria, em quem tenho minha fortaleza ao sair para encarar os desafios e em quem encontro a ternura e a calmaria no retorno ao lar. Sou-lhe muito grato pela paciência com minhas ausências, pela compreensão com minha profissão e pelo apoio incondicional;
- Aos meus amados pais, Walter e Neusa, pela doação de suas vidas para que eu pudesse estudar, ter autoconfiança e alcançar meus objetivos. Além disso, por não me permitirem esquecer de minhas raízes, nem de nossos conceitos familiares;
- À minha amada irmã, Helen, a joia preciosa por quem sou apaixonado e que me faz ficar emocionado sempre que me vem à mente. Um exemplo de dedicação, seriedade, honra e retidão;
- Ao meu primo Paulo, uma pessoa fantástica, ponderada, inteligente e que sempre me incentivou a continuar;
- Aos meus sogros, Raul e Marli, que me receberam como filho;
- Ao grande amigo Alexandre, por me aconselhar em todos os momentos e por ter aberto a mais importante porta de minha vida: a primeira! Esta oportunidade jamais será esquecida e minha gratidão ficará registrada nesta página, para sempre, assim como em meu coração;
- À grade amiga Rosane, uma grande mestre, uma grande mulher, que nunca perdeu a doçura, mesmo nos momentos mais angustiantes;
- Ao grande amigo Gustavo, por estar ao meu lado em momentos bons e nos não tão bons, fazendo valer a verdadeira expressão da palavra amizade;
- Aos grandes amigos Leandro, Andreia, Richard, Rita, Mayra, Renato, Silvana, Luciano e Dumas, por fazerem a minha vida ter ótimos momentos de descontração e alegria, mas também por me fazerem filosofar;

- À grande amiga Beatriz, por toda a paciência e pelos ensinamentos relacionados à minha vida profissional;
- Aos grandes amigos Paschoal, Carlos e Luiz Felipe, pela confiança em meu trabalho, pelas oportunidades e pela paciência nos momentos de ausência;
- Aos meus alunos, pois eles são o grande motivo para que esta caminhada continue;
- Aos meus pacientes, pois tudo isto só tem razão de existir porque eles acreditam que nossa profissão faz a diferença e merecem ser tratados dignamente.

AGRADECIMENTOS

- À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter-me acolhido, ensinado e cedido alguns equipamentos para que meu trabalho pudesse ter chegado ao seu objetivo;
- À Universidade Paulista, por ter cedido o laboratório para a realização das cirurgias e por ter acreditado em mim, desde o primeiro momento. Serei eternamente grato aos ensinamentos que tenho nesta instituição e pelas pessoas que lá conheci;
- À Universidade Metodista de São Paulo, por ter-me apoiado nos momentos em que minha ausência se fez necessária, para que muitos passos na conclusão deste trabalho pudessem acontecer;
- À Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto por ter sido mais que uma orientadora. Sua confiança gratuita foi o grande diferencial para que eu pudesse ter chegado até aqui em minha carreira. Sem dúvidas, sempre levarei este ensinamento comigo, pois se tive uma oportunidade de crescer profissionalmente, esta oportunidade apenas pôde concretizar-se em ações verdadeiras pela compreensão desta pessoa fantástica que, por sua bondade e companheirismo, ensinou-me o verdadeiro significado da palavra inclusão;
- Ao Prof. Dr. Junior, pelo incentivo em todos os momentos, pelas palavras de motivação, pela irmandade, pelas oportunidades de aprendizado neste trabalho e em muitos outros que fizemos juntos e por me ensinar a manter o foco em meu objetivo;
- Ao Prof. Dr. Igor, pelo companheirismo, pelo incentivo, pelas discussões acerca dos conceitos de coerência e retidão, pelas horas incontáveis de laboratório, por confiar em meu trabalho e por me fazer acreditar que seria possível;
- Ao Prof. Thiago, por não medir esforços para que tudo pudesse ser feito em tempo, por me ensinar a trabalhar com o microscópio de luz polarizada, por ter participado das análises das lâminas, por se deslocar à São Carlos gratuita e generosamente várias vezes, em meu auxílio;
- À Dra. Carla, pela supervisão durante as cirurgias e pelos ensinamentos quanto à técnica cirúrgica mais adequada;

- Ao Prof. Dr. Nivaldo, por viabilizar a utilização do microscópio de luz polarizada do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e por ter tido a generosidade de dispor várias horas para nos ensinar a trabalhar com a birrefringência;
- Ao Prof. Dr. Edgard, por acreditar em nosso trabalho e por ter permitido que trabalhássemos no LaMaV-UFSCar;
- À Profa. Dra. Fernanda, pelo esforço empreendido para que as análises das lâminas coradas por picrosirius pudesse ocorrer de forma adequada;
- Às secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiopatologia Experimental), por me atenderem com a máxima cordialidade e disposição, esclarecendo todas as dúvidas acadêmicas que surgiram durante o processo;

EPÍGRAFE

Ah, a vida...
Tão bela e tão repleta de mistérios...
Estes são tantos, que há muitas pessoas em busca de respostas...
Em busca da Verdade...
Após longos caminhos...
Após muita energia investida...
Muitas vezes, após uma vida inteira...
Como num passe de mágica, lá está ela...
A Verdade... Aquela que é a verdadeira Verdade salta-nos aos olhos!
Pelo menos, até o dia seguinte!

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS
RESUMO
SUMMARY/ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. O músculo esquelético 2
1.1.1. Tecido conjuntivo 2
1.1.2. Sarcolema 3
1.1.3. Célula satélite (CS) 3
1.1.4. Correlação neuromuscular 5
1.1.5. O processo da contração muscular 6
1.2. Mecanismos de lesões do músculo esquelético 6
1.3. Classificação clínica das lesões musculares 7
1.4. Reparação de lesões do tecido muscular 8
1.4.1. Fase de Destruição 9
1.4.2. Fase de Reparação e Fase de Remodelagem 12
1.5. Terapia por Ultrassom 19
1.5.1. Produção de ultrassom 20
1.5.2. Efeitos da terapia por ultrassom 20
1.5.3. Estudos sobre a terapia por ultrassom em reparação muscular 24
1.5.4. Influência da terapia por ultrassom no tecido conjuntivo 27
1.5.5. Justificativa 28
2. OBJETIVOS 30
2.1. Objetivos Gerais 31
2.2. Objetivos Específicos 31
3. MÉTODO 32
3.1. Delineamento do Estudo 33
3.2. Amostra 33
3.3. Grupos 33
3.4. Modelo de Lesão Muscular 36
3.5. Dosimetria e aplicação da terapia por ultrassom 40
3.5.1. Equipamento de Ultrassom 41
3.6. Eutanásia e Descarte 42
3.7. Preparação das Amostras para Análise de Birrefringência e Picrosirius 42
3.8. Medidas de Birrefringência 43
3.9. Análise Estatística 44
4. RESULTADOS 45
4.1. Medidas de Birrefringência – Retardo Óptico 46
4.2. Percentual do Colágeno Total 48
5. DISCUSSÃO 50
6. CONCLUSÃO 57
7. REFERÊNCIAS 59
ANEXO 79

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Fluxograma do protocolo de estudo..... 35
Figura 2 - Epilação da face posterior da pata traseira direita..... 36
Figura 3 - Dissecação tecido subcutâneo e exposição do m. gastrocnêmio.....37
Figura 4 - Secção transversal do m. gastrocnêmio..... 38
Figura 5 - Aspecto da sutura no pós-operatório imediato..... 39
Figura 6 - Aplicação da terapia por ultrassom sobre o local cirúrgico..... 40
Figura 7 - Equipamento de ultrassom terapêutico..... 41
Figura 8 - Imagens referentes à observação qualitativa da análise de birrefringência do m. gastrocnêmio de ratos dos diferentes grupos..... 46
Gráfico 1 - Apresentação da média e desvio-padrão do retardo óptico, por grupo.....47
Figura 9 - Imagens referentes à observação qualitativa da análise de birrefringência do m. gastrocnêmio de ratos dos diferentes grupos, corados com Sirius Red e núcleos contracorados com HE..... 48
Gráfico 2 - Média e desvio-padrão do percentual de colágeno total..... 49

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de variância
bHLH	*basic helix-loop-helix*
BNR	Taxa de não-uniformidade do feixe
Pax	*Paired box protein*
CD34	*Cluster of differentiation molecule*
cm	Centímetro
cm/s	Centímetro por segundo
CMP	Células miogênicas precursoras
COX	*Cyclooxygenase*
CS	Célula satélite
Dr.	Doutor
ERA	Área de Radiação Efetiva
FGF	*Fibroblast growth factor*
GFP	*Green fluorescent protein*
HE	Hematoxilina-Eosina
HGF	*Hepatocyte growth factor*
Hz	Hertz
n	Número de sujeitos
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDGF	*Platelet-derived growth factor*
PPRL	Proteoglicano rico em leucina
RO	Retardo óptico
SATA	Média espacial, média temporal
TGF-β	*Transforming growth factor β*
TN-C	Tenascina-C
TNF	*Tumor necrosis factor*
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
W/cm²	Watts por centímetro quadrado
η	Índice de refração
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem
et al.	E outros (autores)

RESUMO

Baldan CS. *Influência do tempo de irradiação da terapia por ultrassom sobre o tecido conjuntivo no processo de reparação muscular de ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a terapia por ultrassom influencia o processo de reparação em ratos submetidos à laceração muscular. A amostra foi composta por 61 ratos Wistar, aleatoriamente distribuídos em 9 grupos: controle, 4LMST (lesão muscular / eutanásia no 4º dia pós-operatório), 7LMST (lesão muscular / eutanásia no 7º dia pós-operatório), 4US2 (lesão muscular / 2 minutos de irradiação ultrassonora por dia / eutanásia no 4º dia), 7US2 (lesão muscular / 2 minutos de irradiação ultrassonora por dia / eutanásia no 7º dia), 4US4 (lesão muscular / 4 minutos de irradiação ultrassonora por dia / eutanásia no 4º dia), 7US4 (lesão muscular / 4 minutos de irradiação ultrassonora por dia / eutanásia no 7º dia), 4US6 (lesão muscular / 6 minutos de irradiação ultrassonora por dia / eutanásia no 4º dia) e 7US6 (lesão muscular / 6 minutos de irradiação ultrassonora por dia / eutanásia no 7º dia). Todos os animais dos grupos 4US2, 7US2, 4US4, 7US4, 4US6 e 7US6 foram irradiados com ultrassom terapêutico de frequência igual a 1 MHz, frequência de repetição de pulso de 100 Hz, pulsos com duração de 2 ms (ciclo de trabalho de 20%), irradiância de 0,5 W/cm^2. A emissão das ondas ultrassonoras ocorreu de forma pulsada. A taxa de não uniformidade do feixe (BNR) foi menor que 6,0 e a área de radiação efetiva (ERA) foi de 0,5 cm^2. A lesão foi realizada por procedimento operatório, de forma a gerar-se uma secção transversal de 1 cm de comprimento e 3 mm de profundidade no músculo gastrocnêmio dos ratos, a partir de 2,5 cm do osso calcâneo. Foram feitas análises de birrefringência e picrosirius. Os animais do grupo 4US4 apresentaram retardo óptico menor que os demais animais sacrificados no 4º dia pós-operatório. Os animais dos grupos 7US4 e 7US6 apresentaram percentual de colágeno total maior que os demais animais lesionados e tratados e o mesmo percentual do apresentado pelo grupo controle. Assim, concluiu-se que a terapia por ultrassom, com tempo de irradiação de 4 e 6 minutos por sessão, aumenta o percentual de colágeno total intramuscular, no local da lesão, quando mantida por, pelo menos 7 dias e diminui o retardo óptico do colágeno situado no local da lesão, no início do processo de reparação tecidual (até o 4º dia pós-operatório), se irradiado por 4 minutos por sessão.

Descritores: células satélites de músculo esquelético; ferimentos; traumatismos; terapia por ultrassom; colágeno; modalidades de fisioterapia.

SUMMARY/ABSTRACT

Baldan CS. *Irradiation time effect of ultrasonic therapy on connective tissue related to rat muscular repair process* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

The aim of this study was to analyze the ultrasonic therapy effect on repair process in rats under muscular injury. The sample included 61 Wistar rats, randomly distributed in 9 groups: control, 4LMST (muscular injury / euthanasia in 4th postoperative day), 7LMST (muscular injury / euthanasia in 7th postoperative day), 4US2 (muscular injury / 2 minutes ultrasonic therapy per day / euthanasia in 4th day), 7US2 (muscular injury / 2 minutes ultrasonic therapy per day / euthanasia in 7th), 4US4 (muscular injury / 4 minutes ultrasonic therapy per day / euthanasia in 4th day), 7US4 (muscular injury / 4 minutes ultrasonic therapy per day / euthanasia in 7th day), 4US6 (muscular injury / 6 minutes ultrasonic therapy per day / euthanasia in 4th day), 7US6 (muscular injury / 6 minutes ultrasonic therapy per day / euthanasia in 7th day). All animals from the 4US2, 7US2, 4US4, 7US4, 4US6 and 7US6 groups were irradiated with the same 1 MHz ultrasonic therapeutic frequency, 100Hz pulse repetition frequency, 2 ms pulse duration, 0,5 W/cm^2 intensity. The ultrasonic waves emission occurred as pulsed. The beam nonuniformity rate (NBR) was less than 6.0 and the effective radiation area (ERA) was 0,5 cm^2. The injury was performed through an operative procedure in order to produce a transverse section of 1 cm length and 3 mm deep in rat gastrocnemius muscles, from 2.5 cm of the calcaneus bone. It was realized birefringence and picrosirius analysis. The animals from the group 4US4 showed an optical delay lower than the 4th postoperative euthanasia animals. The animals from the groups 7US4 and 7US6 showed a total collagen percentual higher than the other injured and treated animals and the same percentual of control animals. Therefore, we concluded the ultrasonic therapy, with irradiation times of 4 and 6 minutes per session, increases the total intramuscular collagen, lesion limited, since a 7-day ultrasonic therapy is followed, which is able to diminish collagen optical delay in the lesion, in early tissue repair process (until 4th postoperative day), if irradiated for 4 minutes per session.

Descriptors: Satellite cells, Skeletal muscle; Wounds and injuries; Ultrasonic therapy; Collagen; Physical therapy modalities.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O músculo esquelético

O músculo esquelético representa a maior massa de tecido do corpo[1], constituindo 40% a 45% do peso corporal total. É composto por células musculares, redes organizadas de nervos e vasos sanguíneos e matriz extracelular de tecido conjuntivo. Esta constituição permite a produção de movimento articular, locomoção e suporte para o processo de regeneração que ocorre após a lesão. A base estrutural do músculo esquelético é a fibra muscular[2].

O citoplasma das fibras musculares, chamado de sarcoplasma, contém matriz e organelas celulares, incluindo o aparelho de Golgi, mitocôndrias, retículo sarcoplasmático, gotículas lipídicas, glicogênio e mioglobina. A fibra muscular esquelética é um sincício derivado da fusão de múltiplos mioblastos (células miogênicas precursoras). O mioblasto tem um formato longo, cilíndrico e apresentam miotubos multinucleados que exibem nucleação central. Depois que os mionúcleos partem de uma posição central para uma posição marginalizada (próximo ao sarcolema), as células musculares passam a ser denominadas fibras musculares. De fato, o aparecimento de núcleos centrais no interior de fibras musculares adultas pode ser uma indicação da ocorrência de regeneração muscular[3].

1.1.1. Tecido conjuntivo

Diferentes camadas de tecido conjuntivo envolvem o tecido muscular. O endomísio é a camada de tecido conjuntivo que circunda fibras musculares individuais, enquanto o perimísio envolve os fascículos ou feixes de fibras musculares. O epimísio envolve a camada externa do músculo esquelético. O arranjo das fibras, que é um fator determinante das propriedades contráteis e funcionais do músculo esquelético, pode ser paralelo ou oblíquo ao eixo longitudinal do músculo[3].

Cada fibra muscular apresenta tecido conjuntivo em ambas as extremidades, que a permitem se aderir um tendão ou à fáscia. A esta estrutura é dado o nome de junções miotendíneas[4].

1.1.2. Sarcolema

O sarcolema é a membrana plasmática que envolve cada unidade de fibras musculares. A lâmina basal ou membrana basal, que apresenta espessura entre 100 e 200 nm é composta de uma camada interna, uma lúcida intermediária e a lâmina externa densa. A membrana basal contém uma série numerosa de proteínas, colágeno, fibronectina, laminina e glicoproteínas. Cada fibra muscular contém um grande número de núcleos periféricos. Além disso, as chamadas células satélites estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática e desempenham um papel fundamental no processo de regeneração do músculo[5].

1.1.3. Célula satélite (CS)

As CS's são originárias de somitos[6,7], as esferas da mesoderme paraxial que geram músculo esquelético, derme e esqueleto axial. O progenitor exato que dá origem à estas células continua a ser estudado. As CS's estão presentes em músculos saudáveis de mamíferos adultos como células quiescentes e representam 2,5% a 6% de todos os núcleos de uma determinada fibra muscular. No entanto, quando ativado pelo músculo lesado, elas podem gerar um grande número de novas miofibras em apenas alguns dias[8]. As CS's quiescentes expressam marcadores característicos[9]. No rato, o mais utilizado destes marcadores é o *transcription factor paired Box 7* (Pax7)[10], que é essencial para a especificação e sobrevivência das CS's[11]. Em contraste, Pax3 é expresso apenas em CS's quiescentes de alguns grupos musculares específicos como o diafragma[12]. O gene básico bHLH regulador miogênico fator 5 (Myf5) é expresso na grande maioria das CS's quiescentes, e por esta razão, os ratos que expressam LacZ nuclear

sob o controle do promotor Myf5 (rato Myf5$^{nlacZ/+}$) têm sido úteis para identificar e caracterizar CS's[13]. Muitos outros marcadores foram identificados[14-20].

Alguns desses marcadores de superfície são úteis para isolar populações de CS's "purificadas" por meio de separação de células. Alternativamente, os camundongos transgênicos, como os que expressam GFP sob o controle de promotores que dirigem a expressão de genes que codificam marcadores de CS - por exemplo, o promotor Pax3 - pode ser usado para isolar a CS[17,21,22]. Nos seres humanos, ambos os marcadores de CS's quiescentes e ativadas não correspondem aos do rato e relativamente pouco se sabe sobre eles, devido à dificuldade de obtenção de tecido humano. Por exemplo, embora CD34 seja um marcador de CS's em camundongos, ele não marca CS's no músculo humano [23]. A M-caderina também não é tão consistente como um marcador de CS's em humanos como em camundongos.

Dentre os marcadores mais confiáveis de CS's no músculo humano está o CD56, embora ele também marque linfócitos *natural killer* [24].

1.1.3.1. Ativação das células satélites

Em resposta a uma lesão muscular, CS's são ativadas e começam a proliferar.

Muitos pesquisadores têm mostrado, nos últimos três anos, que as células satélites proliferam após o trauma muscular e originam novas fibras musculares através de um processo equivalente à histogênese muscular no embrião. Após uma lesão focal com degeneração das fibras musculares, há a proliferação de uma ou mais células satélites. Este processo é limitado às áreas onde há necrose de fibras musculares. Células satélites progênicas (mioblastos) começam a se fundir e a formar miotubos multinucleados após de algumas divisões celulares, mas a proliferação de células satélites pode continuar de nove a dez dias, dependendo da gravidade da lesão[3,25,26].

Vários sinais, provenientes de fibras lesadas e de infiltrados celulares, estão envolvidos na ativação da CS, incluindo HGF[27], FGF[28], IGF[29] e NO[30].

A progressão da ativação da CS em direção à diferenciação miogênica é controlada principalmente por Myf5 e diferenciação miogênica 1 (MyoD) e é seguido por fusão das fibras em regeneração[13].

O processo todo leva cerca de sete dias no rato[31]. Neste período as CS's apresentam destinos diferentes, dando origem a algumas células $Pax7^{+}MyoD^{-}$, que retornam à quiescência (para manter o número de células progenitoras), e muitas células $Pax7^{+}MyoD^{+}$, que estão comprometidas com o processo de diferenciação[10].

Além das células satélites, outras células progenitoras encontram-se na lâmina basal, como periócitos, células endoteliais e células intersticiais, que parecem ter algum potencial miogênico *in vitro* e pós-transplantes. A origem destes progenitores ainda não está clara como para as linhagens de células satélites, mas acredita-se que elas podem auxiliar na alimentação das células miogênicas progenitoras[32,33].

1.1.4. Correlação neuromuscular

A função do músculo esquelético está sob o controle de um nervo que penetra em seu ventre, numa região chamada de ponto de motor[3].

Cada fibra muscular é inervados por uma terminação nervosa. O ponto de contato entre as fibras musculares e o nervo é chamado de placa motora terminal da junção neuromuscular ou, simplesmente, placa motora. A junção neuromuscular contém três componentes estruturais importantes: o axônio pré-sináptico, a fenda sináptica e a área pós-sináptica nas fibras musculares. Um único axônio e todas as fibras musculares por ele inervadas constituem uma unidade motora. Tanto o número de fibras musculares de uma unidade motora e quanto o número de unidades motoras existentes por músculo esquelético variam de acordo com o tipo de movimento feito pelo músculo em questão[2].

Na verdade, onde se necessita de controle motor fino e movimentos altamente coordenados, como, por exemplo, nos músculos extraoculares, pode haver apenas dez fibras musculares em cada unidade motora. Isto contrasta com grandes músculos esqueléticos, como o gastrocnêmio, que apresentam até 1000 fibras musculares por unidade motora[3].

1.1.5. O processo da contração muscular

O passo inicial para a contração muscular envolve a liberação de acetilcolina pelos axônios pré-sinápticos na fenda sináptica. A acetilcolina liberada na fenda sináptica se liga aos receptores de acetilcolina das pregas pós-juncionais das fibras musculares (área pós-sináptica) e, consequentemente, despolariza da célula. A despolarização desencadeia um potencial de ação que passa ao longo das fibras musculares, resultando em contração muscular. Após a despolarização da unidade motora, o impulso elétrico passa pelo sarcolema e alcança o interior do músculo, por meio do túbulo transverso. Isso provoca liberação momentânea de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. O cálcio liberado provoca a ligação das proteínas contráteis (actina e miosina) e a geração gradual de força, após a ação da ATPase. O cálcio é liberado pelo retículo sarcoplasmático e se liga à troponina, que é um componente dos filamentos de actina onde a miosina liga-se. Posteriormente ele provoca uma alteração da conformação da troponina. Isso permite a interação entre actina e miosina e, conseqüentemente, a contração muscular. Finalmente, após a contração muscular, a acetilcolina é desativada pela enzima acetilcolinesterase (ou por outras colinesterases menos específicas). Ocorre o relaxamento muscular, o cálcio intracelular é transportado pelos túbulos transversos e a troponina impede a interação entre as moléculas de actina e miosina[34].

1.2. Mecanismos de lesões do músculo esquelético

Lesões musculares são uma das lesões mais comuns do esporte, com uma incidência variando de 10% para 55% entre todas as lesões[2,35,36]. As lesões musculares podem ser causadas por traumas diretos (contusão, contratura e distensão ou laceração)[2,36] ou por causas indiretas (defeitos genéticos inatos ou problemas neurológicos) [37]. Lacerações musculares são as lesões musculares mais incomuns no esporte, já que mais de 90% das lesões de todos os esportes são contusões ou distensões[36]. A contusão muscular ocorre quando um músculo é sujeito a uma súbita força de compressão, tais como um golpe direto no músculo. Este tipo de trauma muscular ocorre tradicionalmente em esportes de contato, enquanto que as distensões relacionam-se à atividades como corrida e salto[2,38], situações em que uma força de tração excessiva sobre o músculo leva a sobrecarga das fibras musculares e, consequentemente, uma ruptura perto da junção miotendínea. Distensões musculares normalmente acometem os músculos superficiais biarticulares, tais como os músculos reto femoral, semitendíneo e gastrocnêmio[2,38-40].

1.3. Classificação clínica das lesões musculares

O quadro clínico de uma lesão muscular, seja ela uma distensão, uma contusão ou uma distensão, depende da gravidade da lesão e a natureza do hematoma. Os vasos sanguíneos intramusculares rompem-se relativamente fácil, como resultado de trauma, gerando hematoma intramuscular ou intermuscular[41].

No caso do hematoma intramuscular, o extravasamento de sangue dentro da fáscia muscular intacta resulta no aumento da pressão intramuscular, que eventualmente comprime e, posteriormente, limita o tamanho do hematoma. Em contrapartida, um hematoma intermuscular desenvolve-se se a fáscia muscular estiver rota e o sangue extravasado tem acesso livre para se propagar nos espaços intersticiais e interfascial sem um significativo aumento da pressão dentro do músculo[41].

De acordo com Jarvinen et al. (2005) [41], a classificação atual de lesões musculares identifica lesões leves, moderadas e graves com base no comprometimento clínico promovido por elas.

As lesões de primeiro grau, lesão leve do tipo distensão ou contusão, representam uma ruptura de apenas algumas fibras musculares com pouco desconforto e inchaço acompanhado de nenhuma ou apenas o mínimo de perda de força e de restrição de movimentos.

As lesões de segundo grau, moderada do tipo distensão ou contusão, por sua vez, apresenta um maior dano do músculo, com uma perda clara da função (capacidade de contração).

Já uma ruptura em toda a seção transversal do músculo resultando em uma perda quase completa da função muscular é considerada uma lesão grave (terceiro grau).

1.4. Reparação de lesões do tecido muscular

A reparação de uma lesão muscular esquelética segue, razoavelmente, um padrão, independentemente da causa subjacente (contusão ou distensão)[40,42].

Três fases são identificadas neste processo[40]:

1. Fase de destruição, caracterizada pela ruptura e consequente necrose das fibras musculares, pela formação de um hematoma entre as porções dos músculos rompidos e pela reação celular inflamatória;

2. Fase de reparação, que consiste na fagocitose dos tecidos necrosados, na regeneração das fibras musculares, na produção concomitante de uma cicatriz de tecido conjuntivo, bem como na neoformação capilar na área lesada e;

3. Fase de remodelação, em que ocorre maturação das fibras musculares regeneradas, contração e reorganização do tecido cicatricial e a recuperação da capacidade funcional do músculo.

Geralmente, as duas últimas fases estão intimamente associadas ou sobrepostas.

1.4.1. Fase de Destruição

1.4.1.1. Ruptura do músculo

Quando um tipo de contusão por força externa promove uma lesão músculoesquelética, a ruptura ocorre no local do impacto ou em áreas adjacentes, enquanto que nas distensões musculares, a lesão geralmente localiza-se em qualquer das áreas próximas à junção miotendínea[2,43-45]. Em um músculo contraído, a lesão por contusão acomete regiões mais superficiais do que em um músculo relaxado, pois neste a ruptura geralmente localiza-se junto ao osso, já que a pressão do impacto é transmitida através das camadas musculares até que o músculo seja comprimido contra a superfície óssea[2,38,44].

1.4.1.2. Necrose de fibras musculares

No músculo lesado, o trauma mecânico destroi a integridade do sarcolema e da lâmina basal, gerando o ingresso de cálcio extracelular[46-48]. As fibras musculares lesadas sofrem necrose por autodigestão mediada pela liberação de proteases intrínsecas[49,50]. Rapidamente, ocorre a formação de edema e hematoma locais após a lesão muscular, além de iniciar o processo de degeneração[42,48,51]. Como as fibras musculares são muito longas, há uma ameaça iminente de que a necrose iniciada no local da lesão estenda-se ao longo de todo o seu comprimento. No entanto, há uma estrutura específica chamada de banda de contração, caracterizada pela condensação de material citoesquelético, que atua como um sistema de "portas corta-fogo." Aproximadamente 62 horas após a lesão, a propagação da necrose é interrompida num local. A banda de contração isola o defeito na membrana plasmática e forma uma barreira protetora para que a membrana plasmática rota seja reparada[42]. Alguns estudos têm demonstrado que vesículas lisossomais inseridas na membrana plasmática rota agem como uma

membrana temporária e desempenham um papel fundamental papel na vedação da membrana plasmática[52,53].

1.4.1.3. Inflamação

Nas lesões das fibras musculares, os vasos sanguíneos do tecido muscular são naturalmente acometidos e, assim, o sangue com as células inflamatórias acessa diretamente o local da lesão[54,55].

A secreção de substâncias como moléculas de adesão (P-selectina, L-selectina e E-selectina), citocinas (IL-8, IL-6, IL-1] e fator de necrose tumoral α (TNF-α) influencia o fluxo sanguíneo local, a permeabilidade vascular e acelera a resposta inflamatória[51,56].

O início do processo inflamatório é mais tarde "ampliado", já que as células satélites e as porções necrosadas das fibras musculares liberam diversas substâncias que servem como quimioatraentes capazes de aumentar o extravasamento de células do processo inflamatório[57-59]. No músculo lesado, os macrófagos e fibroblastos são ativados e produzem mais sinais quimiotáticos (por exemplo, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas) para as células inflamatórias circulantes[58-65].

Além desses fatores de crescimento produzidos, a maioria dos tecidos contêm fatores de crescimento armazenados em forma inativa em suas matrizes extracelulares e poderão utilizadas, se necessário for, na reparação de uma lesão[66]. Estes fatores de crescimento armazenados são produzidos por células residentes normais e inativados por sua forte aderência aos proteoglicanos e outros componentes do matriz extracelular[66]. No entanto, no caso de dano tecidual, o rompimento da integridade do tecido normal resulta na ativação/liberação desses fatores de crescimento aderidos à matriz extracelular e eles começam a direcionar o processo de reparo[66].

Em relação aos fatores de crescimento e citocinas, há evidência direta de que o TNF-α apresenta papel fisiológico na regeneração dos músculos esqueléticos lesionados. A inibição da sua atividade durante o processo de reparação causa um ligeiro déficit na força do músculo esquelético

reparado[67]. Além disso, um grande número de fatores de crescimento e citocinas, tais como os membros das famílias do fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator transformador de crescimento-β (TGF-β), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), interleucina-1β (IL-1β) e IL-6, são conhecidos por serem expressos em músculos esqueléticos lesionados[27,63,65,68-75] e é provável que vários outros fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AA e PDGF-BB) também sejam expressos no músculo lesionado[70]. A expressão destes fatores de crescimento pode ser induzida no músculo esquelético por estímulos fisiológicos (como microtraumas) como alongamento ou carga mecânico[69,76].

Considerando que esses fatores de crescimento são potentes ativadores mitogênicos para numerosos tipos diferentes de células, provavelmente também estão envolvidos na ativação da regeneração das células do músculo lesado[70,71,77]. Alguns destes fatores de crescimento, tais como FGF, IGF-1, IGF-2, TGF-β, HGF, TNF-α, e IL-6, são potenciais ativadores da proliferação de células miogênicas precursoras (CMP ou células satélites)[71]. Alguns deles são também poderosos estimulantes para a diferenciação e a fusão de miotubos em fibras musculares multinucleadas maduras, durante o processo de regeneração[70,71,77].

Em fase muito aguda após uma lesão de um músculo esquelético, leucócitos polimorfonucleares são as células mais abundantes no local da lesão[42,78-80], mas nos primeiros dias, eles são substituídos pelos monócitos. De acordo com os princípios básicos da inflamação, esses monócitos são eventualmente transformados em macrófagos que, em seguida, ativamente engajam-se na proteólise e fagocitose do material necrótico pela liberação de enzimas lisossomais[42,59,81,82]. A fagocitose macrofágica é um processo notavelmente específico para o material necrótico, tanto que os cilindros preservados em torno das porções necróticas da lâmina basal das fibras musculares comprometidas sobrevivem (são deixados intactos) ao ataque dos macrófagos e, consequentemente, servem de matriz no interior da qual as células satélites viáveis iniciam a formação de novos miobfibras[42,73,83].

Neste processo, encontra-se uma demonstração de especificidade e de coordenação fisiológicas ímpares, pois enquanto fagocitam o material necrótico em torno das células satélites, os macrófagos simultaneamente liberam fatores solúveis de sobrevivência para a regeneração destas células[57].

1.4.2. Fase de Reparação e Fase de Remodelagem

Uma vez que a fase de destruição tenha diminuído, a reparação efetiva do músculo lesado inicia-se com dois processos concomitantes (auxiliares e competitivos), a regeneração das fibras musculares rompidas e a formação de uma cicatriz de tecido conjuntivo. Uma progressão equilibrada desses dois processos é um pré-requisito para ótima recuperação da função contrátil do músculo[40,42].

1.4.2.1. Regeneração de fibras musculares

Embora as fibras musculares sejam geralmente consideradas irreversivelmente pós-mitóticas, uma marcante capacidade regenerativa do músculo esquelético é garantida por um mecanismo intrínseco capaz de restaurar o aparelho contrátil lesado. Trata-se de um conjunto reserva de células indiferenciadas, chamado de células satélites, encontrado abaixo da lâmina basal de cada fibra muscular do indivíduo[40,84,85] durante o desenvolvimento fetal[41]. Em resposta à lesão, essas células inicialmente proliferam-se, então, diferenciam-se em mioblastos e, finalmente, fundem-se uns com os outros para formar miotubos multinucleados. Os recém-formados miotubos multinucleados fundem-se com as fibras musculares lesionadas que resistiram ao trauma inicial[83]. Finalmente, as partes regeneradas das fibras musculares adquirem sua forma madura, com estrias transversais e com localização periférica dos mionúcleos[83]. Curiosamente, em resposta à lesão de primeiro grau, as células satélites respondem imediatamente através do início da proliferação, mas devido à suavidade da

lesão e à rapidez da recuperação "intrínseca" das fibras musculares lesadas, a ativação das células satélites interrompe-se antes da formação dos mioblastos[86].

No músculo esquelético maduro, existem (pelo menos) duas grandes populações de células satélites[10,40,84,85,87,88]. As células satélites “clássicas” são aquelas que residem sob a lâmina basal das fibras musculares e que estão prontas para iniciar a diferenciação em mioblastos logo após a ocorrência da lesão muscular. As células-tronco satélite são as que primeiro sofrem divisão celular antes da diferenciação[10,40,85]. Através dessa divisão celular (proliferação), a população-tronco repõe a reserva de células-satélites para possíveis futuras demandas de regeneração[10,85]. Entre esta população de células satélites, parece haver uma subpopulação de células que capazes de se diferenciar além de linhagens miogênicas, pois podem transformar-se em diferentes linhagens mesenquimais[89], assim como em células neurais endoteliais[84,87].

Até recentemente, as células satélites foram presumivelmente a única fonte de mionúcleos na reparação muscular[71]. Entretanto, estudos atuais têm demonstrado a presença de duas diferentes populações de células-tronco pluripotentes que podem contribuir para a regeneração do músculo esquelético lesado: células-tronco residentes não-musculares e células-tronco residentes musculares[71]. Células progenitoras isoladas da medula óssea e vários tecidos mesenquimais, podem se diferenciar em uma linhagem miogênica. As células derivadas de medula óssea não só contribuem para a regeneração de fibras musculares no músculo esquelético lesado, mas também na reconstituição do aglomerado de células satélites em condições de lesão[71]. No entanto, é importante notar que a frequência na qual esses eventos ocorrem parece ser muito baixa (mesmo na lesão), quando comparado com o número de mioblastos derivados de células satélites em regeneração[74,90]. Assim, é discutível se as células-tronco fazem uma contribuição significativa para a regeneração do músculo esquelético lesado[74].

Além das células satélites clássicas que residem sob a lâmina basal, há outra população distinta de células-tronco musculares localizadas extralaminalmente no tecido conjuntivo do músculo esquelético[91]. Em resposta à lesão do músculo esquelético, essas células dão origem prontamente a determinados mioblastos e se diferenciam em miotubos[71].

Depois que os cilindros da antiga lâmina basal são preenchidos com fibras musculares em regeneração, as fibras musculares avançam ainda mais através da abertura na lâmina basal em direção à cicatriz de tecido conjuntivo que se formou entre os cotos das fibras musculares que resistiram à lesão[40,42]. Em ambos os lados da cicatriz do tecido conjuntivo, os cotos das fibras musculares sobreviventes formam vários ramos enquanto tentam perfurar a cicatriz que os separam[42]. No entanto, depois de conseguirem se estender apenas por uma curta distância, os ramos começam a aderir suas extremidades às do tecido conjuntivo, formando mini-junções miotendíneas com a cicatriz. A área cicatricial diminui progressivamente, aproximando as extremidades dos cotos[92], mas ainda é desconhecido se as porções das fibras musculares rotas, posicionadas em lados opostos da cicatriz, conseguirão se fundir ou se alguma lâmina de tecido conjuntivo permanecerá entre delas[92,93].

Tem sido demonstrado que a capacidade regenerativa do músculo esquelético em resposta à lesão é significativamente reduzida com a idade[94]. Essa capacidade diminuída, aparentemente, não pode ser atribuída a uma diminuição do número ou da atividade das células satélites[94], mas sim a uma redução geral na capacidade de regeneração do músculo envelhecido, como cada fase do processo de reparo parece abrandar e deteriorar-se com o envelhecimento[94].

1.4.2.2. Formação da cicatriz do tecido conjuntivo

Imediatamente após uma lesão no músculo esquelético, uma lacuna formada entre as fibras musculares rompidas é preenchida com um hematoma. No primeiro dia, as células inflamatórias (incluindo os fagócitos)

invadem o hematoma e começam a eliminar o sangue coagulado[42,54,60]. A fibrina derivada do sangue e as ligações cruzadas da fibronectina formam um tecido de granulação precoce, uma matriz extracelular inicial que atua como via de transporte e de fixação para os fibroblastos[42] (é sabido que alguns dos fibroblastos do tecido de granulação podem ser derivados de células miogênicas)[95]. Vale ressaltar que este tecido recém-formado fornece ao local da lesão a capacidade inicial de suportar a contração[96-99]. Em seguida, os fibroblastos, iniciam a síntese as proteínas e proteoglicanos da matriz extracelular para restaurar a integridade estrutural do tecido conjuntivo[96-100].

Entre as primeiras proteínas sintetizadas de matriz extracelular estão a tenascina-C (TN-C) e fibronectina[83,96,97,100], que inicialmente transformam-se em fibrilas multiméricas e então formam a superfibronectina com propriedades adesivas bastante ampliadas[101,102].

Ambas (fibronectina e TN-C) possuem propriedades elásticas, sendo capazes de aumentar em várias vezes o próprio comprimento de repouso quando uma carga mecânica é aplicada ao tecido. Alguns autores acreditam que elas proporcionam força e elasticidade precoces para o tecido de granulação jovem do músculo esquelético lesado[47,84,103,104]. A expressão da fibronectina é logo seguida pelo de colágeno tipo III[77,96-100], mas a produção do colágeno tipo I é iniciada somente dois dias mais tarde, embora permaneça elevada por várias semanas[65,77,96-100]. A grande área inicial de tecido de granulação condensa-se de forma bastante eficiente em uma pequena massa de tecido conjuntivo composto principalmente do tipo colágeno tipo I[36,94,97-99,105,106]. Apesar de haver sugestões de que ocorra fibrose geral no músculo esquelético em processo de recuperação[3], a quantidade de tecido conjuntivo intramuscular não é aumentada a menos que o músculo seja completamente imobilizado por um período substancial de tempo[36,97,105].

A cicatriz de tecido conjuntivo produzida no local da lesão é o ponto mais fraco do músculo esquelético recém-lesado após o trauma[42,107], mas sua resistência à tração aumenta consideravelmente com a produção do

colágeno tipo I[97,98,107]. A estabilidade mecânica do colágeno, por sua vez, é atribuível à formação de ligações cruzadas intermoleculares durante a maturação do tecido cicatricial[106]. Aproximadamente 10 dias após o trauma, a maturação da cicatriz chega ao ponto em que já não é a parte mais fraca do músculo lesado, mas se sobrecarregadas, a ruptura geralmente ocorrerá no tecido muscular adjacente, na região das recém-formadas mini-junções miotendíneas, entre fibras musculares regeneradas e o tecido cicatricial. No entanto, ainda será necessário um tempo relativo até que a força do músculo seja completamente restaurada à níveis anteriores à ocorrência da lesão[105,107,108].

Embora a maioria das lesões do músculo esquelético repare-se sem a formação de uma funcionalmente incapacitante cicatriz fibrosa, a proliferação dos fibroblastos pode por vezes, ser excessiva, resultando na formação de um tecido cicatricial denso dentro do músculo lesado. Em tais casos, associado com trauma muscular grave ou em casos particulares de recidivas, a cicatriz pode criar uma barreira mecânica que atrasa consideravelmente ou mesmo restringe completamente a regeneração das fibras musculares em toda a fissura da lesão[105,108]. Estudos experimentais têm demonstrado que a aplicação direta de qualquer pequeno proteoglicano rico em leucina (PPRL), decorina, agente antifibrótico suramina ou interferon-γ inibe a formação da cicatriz no músculo esquelético lesado[109-111]. Suramina, decorina e interferon-γ são inibidores específicos de TGF-β[73,109,112], um fator de crescimento que pode ser o responsável pela formação de cicatriz durante a reparação do músculo esquelético. Além da inibição de TGF-β, decorina e outros PPRLs não somente ligam colágenos diferentes, mas também regulam a fibrilogênese e a montagem de fibrilas de colágeno tipo I[113-115].

1.4.2.3. Vascularização do músculo lesado

Um processo essencial para a regeneração de um músculo lesado é vascularização da área acometida[116-118]. A restauração do suprimento

vascular à área lesada é o primeiro sinal de regeneração e um pré-requisito para a posterior recuperação morfológica e funcional[116]. Os capilares brotam dos vasos sanguíneos sobreviventes para o centro da área lesada a dim de fornecer adequada concentração de oxigênio, permitindo produção de energia pelas vias aeróbias do metabolismo que será útil para a regeneração das fibras musculares[117]. Miotubos jovens têm poucas mitocôndrias e apenas uma capacidade moderada para o metabolismo aeróbio, mas apresentam grande potencial anaeróbio. No entanto, durante a fase final da regeneração, o metabolismo aeróbico constitui a via principal de energia para as fibras musculares multinucleadas. Este processo também fornece uma explicação dos motivos pelos quais a regeneração das fibras musculares não avança para além do estágio de formação dos finos miotubos, a menos que ocorra uma suficiente invasão capilar que assegure o fornecimento de oxigênio necessário para o metabolismo aeróbio[116].

1.4.2.4. Regeneração dos nervos intramusculares

Semelhante ao processo de vascularização, a regeneração dos músculos esqueléticos também pode ser interrompida pela regeneração incompetente dos nervos intramusculares[96,119-121]. A regeneração das fibras musculares segue até a fase dos miotubos mesmo na ausência de inervação, mas haverá atrofia se a reinervação não ocorrer[119]. Em caso de desnervação neurogênica (ruptura de axônio), a reinervação exige o crescimento de novos axônios distais à ruptura. Considerando-se que os axônios são normalmente rompidos dentro ou próximo ao músculo, a reconexão mioneural pode ser rapidamente restabelecida[40].

1.4.2.5. *Adesão de fibras musculares à matriz extracelular*

Quando fibras musculares são violadas, a continuidade tendão-músculo-tendão é interrompida no local de ruptura e a força de contração não pode ser transmitida através da abertura formada entre as extremidades

rotas, que são afastadas durante a contração[41]. As extremidades das fibras musculares em regeneração, na tentativa de perfurar o tecido cicatricial, mantêm uma aparência de cone em crescimento por um período de tempo relativamente longo durante a regeneração[42,83], período este durante o qual estas terminações não podem se anexar à cicatriz. Em vez disso, a fibras musculares em regeneração reforçam a sua adesão à matriz extracelular, pelas porções laterais, tanto pela parte em reparação, quanto pelas áreas intactas[122-124]. Esta adesão lateral reforçada reduz tanto o movimento das extremidades da fibra comprometida como a tração sobre a cicatriz ainda frágil, reduzindo assim o risco de recidivas e permitindo uma utilização do músculo lesado antes da reparação estar finalizada. Curiosamente, parece que o estresse mecânico é um pré-requisito para a aderência lateral, uma vez que alguns estudos experimentais têm mostrado que este fenômeno não ocorre na ausência deste estresse[125,126].

Mais tarde, durante o processo de regeneração, as adesões fortes presentes nas extremidades das fibras musculares que foram lesionadas são semelhantes às adesões das moléculas das junções miotendíneas normais (grupos de moléculas associadas à integrina e à distrofina)[107,123,125-127]. Assim, a unidade tendão-fibras musculares-tendão original torna-se substituída por duas unidades sucessivas tendão-fibras musculares-mini-junções miotendíneas separadas por uma cicatriz. Estas duas unidades contraem sincronicamente, já que ambas foram reinervadas pelo mesmo nervo[119]. No lado da matriz extracelular das novas mini-junções miotendíneas, moléculas elásticas e aderentes foram altamente expressas para absorver as forças geradas pelas contrações musculares[83,104]. Tendo restabelecido uma adesão terminal firme destas mini-junções miotendíneas, as fibras musculares não mais precisam reforçar as adesões laterais, de forma que as altas taxas de expressão das integrinas no sarcolema lateral diminuem. A cicatriz interposta gradualmente diminui, promovendo a aproximação das extremidades das fibras musculares rotas até que elas possam apresentar entrelaçamentos, embora muito provavelmente sem reunirem-se completamente[92,107,123].

1.5. Terapia por Ultrassom

Ultrassom é um tipo de som e todas as formas de som consistem de ondas que transmitem energia por compressão e rarefação. É chamado de ultrassom o som com frequências superiores à 20 KHz. Esta definição é baseada nos limites da audição normal humana, uma vez que os humanos podem ouvir sons cujas frequências estejam entre 16 Hz e 20 KHz. Sons com frequências superiores a estas são chamados de ultrassom[128].

Normalmente, os equipamentos de ultrassom terapêutico apresentam frequências entre 0,7 e 3,3 MHz para maximizar a absorção de energia em profundidades de 2 a 5 cm de tecido mole[128]. No Brasil, o mais comum é encontrarem-se equipamentos com 1 e 3 MHz de frequência.

As ondas ultrassonoras viajam através dos materiais e gradualmente a sua intensidade vai diminuindo como resultado da atenuação. Estas ondas causam uma leve movimentação circular no material por onde passam, mas elas não conduzem este material junto consigo[128].

Há uma variedade de efeitos físicos do ultrassom e estes podem ser classificados como térmicos e não-térmicos. O aumento da temperatura dos tecidos é o efeito térmico. Correntes acústicas, ondas estacionárias, micromassagem e cavitação, que podem alterar a permeabilidade das membranas, são os chamados efeitos não-térmicos[129].

Em resumo, ultrassom é uma onda sonora de alta frequência que pode ser descrita pela intensidade, modo de emissão, frequência, ciclo de trabalho, frequência de repetição, área de radiação efetiva e razão de não-uniformidade do feixe. Ele invade o tecido biológico e é atenuado em decorrência da absorção, reflexão e refração. A atenuação é maior em tecidos ricos em colágeno. Quanto maior a frequência de emissão das ondas ultrassonoras, maior será a atenuação. O coeficiente de atenuação é tecido e frequência específico[130].

Ultrassom em modo contínuo é geralmente usado para produzir efeitos térmicos, enquanto que em modo pulsado buscam-se os efeitos não-

térmicos. Ambos os efeitos podem ser utilizados para se chegar mais rapidamente aos objetivos terapêuticos, desde que o ultrassom seja aplicado em situações clínicas adequadas e no momento apropriado[131].

1.5.1. Produção de ultrassom

O ultrassom é gerado pela aplicação de corrente elétrica alternada de alta frequência a um cristal presente no transdutor do equipamento de emissor de ultrassom. Este cristal é confeccionado por material que apresente propriedades piezoelétricas, ou seja, ele responderá expandindo-se e contraindo-se na mesma frequência em que a corrente alterna a sua polaridade. Quando o cristal expande, ele comprime o material em frente a ele e quando ele contrai, há a rarefação no material em questão. Esta alternância compressão-rarefação é a onda ultrassônica[132].

1.5.2. Efeitos da terapia por ultrassom

Como já apresentado anteriormente, o ultrassom promove uma variedade de efeitos biofísicos. Ele pode aumentar a temperatura de tecidos superficiais e profundos e apresenta alguns efeitos não-térmicos. Estes efeitos têm sido considerados separadamente, embora em algumas situações eles aconteçam concomitantemente[131].

O ultrassom contínuo tem o maior efeito sobre a temperatura dos tecidos, embora os efeitos não-térmicos também ocorrem neste modo de emissão das ondas. Por este motivo, alguns autores preferem utilizar o termo “efeitos mecânicos” em substituição ao termo “efeito não-térmico”. Embora o ultrassom pulsado seja aplicado em ciclos de trabalho de 5%, 10%, 20% ou 50% e, normalmente, com baixa intensidade, considerando a média espacial e a média temporal (SATA), o mesmo é capaz de produzir alterações irrelevantes de temperatura nos tecidos, enquanto há a emissão de pulsos (período *on* em emissões pulsadas)[129]. Já foi demonstrado[133] que o ultrassom contínuo com uma intensidade de 0,5 W/cm² promoveu o

mesmo aumento de temperatura no músculo gastrocnêmio de seres humanos (a 2 cm de profundidade) que o ultrassom pulsado com ciclo de trabalho de 50% e intensidade de 1 W/cm², ambos aplicados por 10 minutos e frequência de 3 MHz. Vale ressaltar que a intensidade SATA foi a mesma para as aplicações contínua e pulsada.

1.5.2.1. Efeitos térmicos

Em 1930 foi demonstrado pela primeira vez que a irradiação com ultrassom terapêutico poderia promover aumento da temperatura tecidual. Pelo aquecimento tecidual, o ultrassom pode acelerar a taxa metabólica[131], reduzir ou controlar a dor[134] e o espasmo muscular[135], alterar a velocidade de condução nervosa[135], aumentar o fluxo sanguíneo[136] e aumentar a extensibilidade dos tecidos moles[137]. O ultrassom alcança mais profundamente e aquece menores áreas que os agentes de aquecimento superficial. Aquece preferencialmente tendões, ligamentos, cápsulas articulares e fáscia muscular, tendo em vista a grande quantidade de colágeno presente nestes tecidos[131].

Além do tipo de tecido e da frequência de emissão do ultrassom, a intensidade e a duração do tratamento também influenciam no aquecimento tecidual[128].

A velocidade com que o transdutor é movido sobre a superfície corporal não gera tal influência, conforme foi demonstrado por Weaver et al. (2006)[138], que mantiveram os mesmos parâmetros de emissão do ultrassom (frequência de 1 MHz, modo contínuo, intensidade de 1,5 W/cm², durante 10 minutos), mas modificaram a velocidade de movimentação do transdutor entre os grupos avaliados (2 a 3, 4 a 5 ou 7 a 8 cm/s).

Ao se compararem irradiações de tecidos com grandes concentrações de colágeno com 1 e 3 MHz de frequência, observa-se que em frequências maiores a capacidade de penetração é menor, embora haja maior aquecimento dos tecidos. A irradiação com 3 MHz é mais indicada para o aquecimento de tecidos em profundidades de 1 a 2 cm, enquanto que a

irradiação com 1 MHz de frequência é mais indicada para tecidos que apresentem até 5 cm de profundidade, embora, de acordo com Hayes et al. (2004)[139], o ultrassom de 3 MHz mostrou-se mais eficiente no aquecimento da panturrilha (temperatura aferida a 2,5 cm de profundidade), que o ultrassom de 1 MHz, ambos sendo irradiados com intensidade de 1,5 W/cm². Este achado sugere que ultrassom com 3 MHz é eficiente para aquecimento de tecidos levemente mais profundos do que se pensava até então.

Em média, acredita-se que a temperatura de tecidos moles *in vivo* aumente cerca de 0,2ºC por minuto, sob a irradiação com oferta de 1 W/cm² de intensidade de ultrassom, à 1 MHz. Este aquecimento não é uniforme, tendo em vista que há variações na emissão da intensidade do ultrassom, diferentes tipos de tecidos com diferentes coeficientes de atenuação, diferentes áreas clínicas a serem tratadas e reflexões entre as superfícies de tecidos vizinhos. As maiores temperaturas são geradas nas interfaces teciduais, onde a reflexão é maior. Mover o transdutor durante o tratamento auxilia na equalização da distribuição do calor e minimiza o surgimento de áreas excessivamente quentes ou frias[128].

Se a intensidade utilizada for alta, o paciente poderá se queixar de dor profunda, proveniente do superaquecimento do periósteo. Por isso, nestas situações, orienta-se que seja diminuída a intensidade aplicada para reduzir os riscos de queimaduras[131].

1.5.2.2. Efeitos não-térmicos do ultrassom

O ultrassom apresenta uma série de efeitos sobre os processos biológicos que não estão relacionados ao aquecimento tecidual. Estes efeitos são resultantes de efeitos mecânicos do ultrassom, incluindo cavitação, ondas estacionárias, micromassagem e correntezas acústicas. Quando o ultrassom é oferecido no modo pulsado (com ciclo de trabalho igual ou inferior a 20%), o aquecimento gerado durante a emissão das ondas é dissipado no momento de não emissão, resultando em alterações quase imperceptíveis da temperatura. Alguns estudos têm realizado intensidades

muito baixas de ultrassom contínuo para averiguar a existência prioritária dos efeitos mecânicos[140].

Tem-se demonstrado que o ultrassom com baixa intensidade promove o aumento dos níveis de cálcio intracelulares[141] e o aumento da permeabilidade da pele e da membrana celular[142]. Fyfe e Chahl (2004)[143] afirmam que o ultrassom aumenta a degranulação de mastócitos, com liberação de histamina. Tal afirmação foi realizada após se comparar o número de mastócitos degranulados, em tornozelos de ratos submetidos à entorse.

O uso do ultrassom tem sido associado também ao aumento da atividade macrofágica[144], aumento da síntese protéica por fibroblastos[145] e células residentes em tendões[146]. O ultrassom de baixa intensidade tem demonstrado agir sobre o aumento da síntese de óxido nítrico em células endoteliais[147,148], o aumento do fluxo sanguíneo em fraturas de cachorros[149] e em músculo isquêmico de ratos. Além disso, tem-se demonstrado o efeito deste recurso sobre o aumento da síntese de proteoglicanos pelos condrócitos[150-153].

Todos estes efeitos têm sido encontrados com o uso de ultrassom pulsado, cujo aumento de temperatura não é encontrado, portanto considerados frutos dos efeitos mecânicos do ultrassom[144,154]. As maiores mudanças nos níveis de cálcio intracelular estão relacionados ao ultrassom pulsado à 20% de ciclo de trabalho e intensidades entre 0,5 e 0,75 W/cm^2[141,155].

As respostas dos níveis de atividade celular e do sistema vascular ao ultrassom são muito importantes para o processo de reparação tecidual. O aumento dos níveis de cálcio intracelular pode alterar a atividade enzimática das células e estimular sua a síntese e secreção de proteínas, incluindo proteoglicanos[156], porque os íons cálcio agem como sinais químicos (segundo mensageiro) para as células. A vasodilatação devido a liberação de óxido nítrico e o consequente aumento do fluxo sanguíneo podem acelerar o processo de reparação pela oferta de nutrientes essenciais para a região[128].

A ação do ultrassom sobre a resposta macrofágica pode explicar sua utilidade no processo inflamatório, já que estas são as células dominantes nesta fase do processo de reparação tecidual, assim como pelo aumento da permeabilidade de das membranas celulares[142].

1.5.3. Estudos sobre a terapia por ultrassom em reparação muscular

Rantanen et al. (1999)[157] avaliaram se o ultrassom exerce influência sobre a regeneração muscular. Avaliaram a velocidade da proliferação de células satélites e de fibroblastos, da formação de miotubos e da recapilarização depois de uma contusão muscular experimental no músculo gastrocnêmio de ratos. Os músculos lesados foram tratados com ultrassom pulsado, com emissão de pulsos com duração de 2 ms, intervalados em 8 ms (ciclo de trabalho de 20%), frequência de 3 MHz e intensidade 1,5 W/cm². Um transdutor pequeno (10 mm de diâmetro) emitiu ultrassom por 6 minutos, por técnica estacionária, ou seja, o transdutor não se movimentou durante o tratamento. Um gel de ultrassom comercialmente disponível foi usado como agente de acoplamento. Os animais foram submetidos à eutanásia no 4º, 7º e 10º dias após o momento da lesão. Os autores demonstraram que o ultrassom pulsado aumentou o número de CS's no 3º e 4º pós-operatórios, aumentou a proliferação fibroblástica no 6º, 7º e 10º dias pós-operatório, mas não apresentou efeitos sobre a recapilarização e as áreas recobertas por miotubos.

Karnes et al. (2002) [158] avaliaram o efeito do ultrassom contínuo na reparação do músculo esquelético lesado por repetidas contrações excêntricas. Os animais dos grupos experimentais receberam ultrassom contínuo, 1 MHz, 0,5 W/cm², diariamente, por 5 minutos. A eutanásia ocorreu no 3º, 5º e 7º dias pós-lesão. Os resultados deste estudo demonstraram que sete sessões consecutivas de ultrassom terapêutico contínuo melhoram significativamente a produção de força máxima dos músculos que foram lesionados pela contração excêntrica repetida.

Fischer et al. (2003)[159] avaliaram o efeito do ultrassom terapêutico sobre a síntese de proteínas contráteis no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos à lesão por contusão traumática. Os animais foram irradiados com ultrassom contínuo ou pulsado (dependendo do grupo experimental em que estiveram aleatoriamente alocados), com frequência de 870 KHz, intensidade de 1 W/cm², durante 5 minutos. A primeira aplicação ocorreu 48 horas após o trauma e seguiram-se diariamente até o 7º dia pós-lesão. Os autores concluíram que o ultrassom pulsado favorece a síntese de proteínas contráteis no processo de reparação de lesão muscular aguda.

Wilkin et al. (2004)[160] avaliaram se o a terapia por ultrassom influenciaria a massa muscular, a concentração total de proteínas e a área de secção transversal da fibra muscular de ratos submetidos à contusão traumática. Além disso, avaliaram o número de núcleos por fibra muscular e a densidade nuclear entre os animais irradiados e não-irradiados. Os animais foram irradiados pelo ultrassom pulsado, com frequência de 3,3 MHz, intensidade de 1 W/cm², ciclo de trabalho de 20%, durante 5 minutos, durante 7 dias consecutivos a partir do dia da lesão. Eles concluíram que o ultrassom pulsado, nas doses propostas em seu estudo, não alterou os marcadores biológicos examinados no processo de reparação muscular pós-contusão.

Markert et al. (2005) [161] avaliaram os efeitos da terapia por ultrassom e de exercícios sobre os mesmos biomarcadores musculares avaliados por Wilkin et al (2004) [160]. Os músculos submetidos à contusão traumática foram irradiados, após 24 horas da indução da lesão, por ultrassom contínuo, com frequência de 3 MHz, intensidade de 0,1 W/cm², diariamente, por 4 sessões, durante 5 minutos e concluíram que, alterando-se alguns parâmetros dosimétricos do ultrassom e associando-o ou não à exercícios, não há efeitos sobre a massa muscular, a concentração total de proteínas e a área de secção transversal da fibra muscular de ratos submetidos à contusão traumática.

McBrier et al. (2007)[162] examinaram a influência da terapia por ultrassom sobre a expressão de mRNA de MGF em músculos contundidos.

Os músculos foram irradiados com ultrassom contínuo, com frequência de 3,3 MHz, intensidade de 0,3 W/cm², diariamente (após 24 horas da indução da lesão), por 4 dias consecutivos. Observaram que os grupos tratados com ultrassom apresentaram diminuição da expressão de mRNA de MGF, que é um importante fator de crescimento associado à proliferação de células satélites.

Piedade et al. (2008)[163] avaliaram quantitativamente o equilíbrio entre a presença de células miogênicas e deposição de colágeno em músculos de ratos experimentalmente lacerados. Além disso, realizaram a morfometria local para identificar qual a área ocupada pelo tecido conjuntivo cicatricial e avaliaram a expressão da desmina através de procedimento imunoistoquímico. Os músculos foram irradiados com ultrassom pulsado, com frequência de 1 MHz, intensidade de 0,57 W/cm², 100 Hz de frequência de repetição, ciclo de trabalho de 50%, por 5 minutos, a partir de 48 horas da indução da lesão, diariamente, por 2, 5 ou 12 dias. Concluíram que o ultrassom aumentou a fração de área ocupada por colágeno fibrilar, aumentou a fração de área de células musculares regeneradas (mioblastos e miotubos) e aumentou a expressão de desmina no processo de reparação muscular.

Também em 2008, Matheus et al.[164] avaliaram o comportamento das propriedades mecânicas de músculos submetidos à lesão aguda por impacto e tratados com ultrassom. A irradiação ocorreu com ultrassom pulsado, utilizando as frequências de 1 e 3MHz (dependendo do grupo experimental), intensidade de 0,5W/cm², frequência de repetição de 100 Hz, ciclo de trabalho de 20%, durante 5 minutos, por 6 dias consecutivos, sendo que a primeira irradiação ocorreu 24 após a indução da lesão. Concluíram que a intervenção terapêutica por meio do ultrassom promoveu não influenciou o alongamento no limite máximo, mas melhorou o suporte de carga no limite máximo e a rigidez dos músculos lesionados, indicando, assim, recuperação parcial destes músculos. Não foi observada diferença entre as propriedades mecânicas do grupo tratado com ultrassom de diferentes frequências.

Rennó et al. (2011)[165] compararam a influência da laserterapia de baixa intensidade e do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre a expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) no processo de reparação de músculos submetidos à criolesão. Os animais irradiados com ultrassom, receberam ondas mecânicas emitidas com frequência de 1,5 MHz, intensidade de 0,03 W/cm², ciclo de trabalho de 20%, por 6 sessões diárias, consecutivas, de 20 minutos de duração, com técnica estacionária de aplicação. Os autores concluíram que tanto a laserterapia como a terapia por ultrassom diminuíram a expressão de COX-2 no processo de reparação muscular.

1.5.4. Influência da terapia por ultrassom no tecido conjuntivo

Alguns autores têm investigado o efeito da terapia por ultrassom sobre a organização do colágeno[166].

Está documentado que este recurso aumenta resistência à tração do tendão calcâneo reparado cirurgicamente[167], assim como incrementa a resistência dos tendões[168].

A terapia por ultrassom administrada numa fase precoce do processo de reparação promove a restauração da resistência mecânica e do alinhamento do colágeno em tendões[169].

Maiti et al. (2006)[170], usando um modelo tenorrafia do tendão flexor digital superficial, revelaram que a irradiação pulsada de ondas ultrassonoras, a uma intensidade de 1 W/cm^2, melhora o edema inflamatório, a dor e acelera a capacidade de sustentação de peso.

Papatheodorou et al. (2009)[171] revelaram que o ultrassom pulsado, a uma intensidade de 30 mW/cm^2, aumenta a taxa de cicatrização da interface enxerto tendíneo/osso, *in vivo,* através do aumento da expressão de biglicano e colágeno tipo I. Além disso, observaram a regulação da expressão de VEGF, que pode ser um mecanismo responsável por acelerar a reparação da junção osso/tendão.

O aumento da síntese de colágeno e de proteínas gerais por fibroblastos são mecanismos propostos para justificar como a terapia por ultrassom pode acelerar a cicatrização[172].

Doan et al. (1999)[173] afirmam que o aumento da síntese proteica pode ocorrer pelo aumento na expressão de IL-1 e VEGF, encontrado após irradiar um tecido com intensidades de 0,1 a 0,4 W/cm² de ultrassom, com frequência de 1 MHz.

Em um estudo *in vitro*, De Deyne e Kirsch-Volders (1995)[174] mostraram que, após a exposição ao ultrassom, os fibroblastos da pele tendem a sofrer mitose, indicando maior proliferação celular.

Deise et al. (2009)[174] propõem que o ultrassom pulsado, com intensidade entre 0,2 e 0,6 W/cm² poderia reforçar a distribuição dos filamentos do citoesqueleto em células L929, bem como aumentar a atividade retículo endoplasmático e a síntese de proteínas.

Além disso, a emissão de ultrassom em modo contínuo ou pulsado aumenta a expressão de proteínas e a síntese de colágeno tipo I e III. O mecanismo molecular envolvido, possivelmente está relacionado ao aumento da expressão do TGF-β, que é membro da família das citocinas com efeito pleiotrópico sobre os fibroblastos, guiando a migração destas células e o depósito da matriz[146].

1.5.5. Justificativa

Pelo disposto neste capítulo, pode-se considerar que:

- ✓ as lesões musculares são muito comuns;
- ✓ as lesões de grau 3 podem apresentar quantidades importantes de tecido conjuntivo depositado no local da lesão para a formação de cicatriz;
- ✓ a cicatriz traz prejuízos funcionais e aumenta os índices de recidiva;
- ✓ a terapia por ultrassom tem sido um recurso de eleição para o tratamento destas lesões por fisioterapeutas em todo o mundo;

- ✓ este recurso tem sido estudado e tem apresentado efeitos sobre a síntese proteica, a síntese de colágeno e o depósito de colágeno;
- ✓ há estudos que avaliaram a expressão de desmina, a expressão de COX-2, a proliferação de CS's e miotubos, a capacidade de suporte de tensão e a resistência musculares pós-tratamento, mas não há estudos sobre o possível efeito do ultrassom terapêutico sobre o tecido conjuntivo no processo de reparação muscular;
- ✓ não há estudos que avaliem a infuência do tempo de tratamento por ultrassom, em cada sessão;

Desta forma, julgou-se importante avaliar se este recurso terapêutico influenciaria o processo de reparação muscular, no que concerne a síntese e liberação do colágeno, assim como sua organização.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar se a terapia por ultrassom influencia o tecido conjuntivo no processo de reparação muscular em ratos submetidos à laceração muscular.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se a terapia por ultrassom influencia o percentual de colágeno total intramuscular, no local da lesão;

- Avaliar se a terapia por ultrassom influencia a organização do colágeno depositado no local da lesão;

- Avaliar se o tempo da terapia por ultrassom, por sessão, apresenta influência sobre o percentual de colágeno total no local da lesão;

- Avaliar se o tempo da terapia por ultrassom, por sessão, apresenta influência no retardo óptico do colágeno depositado no local da lesão;

3.MÉTODO

3.1. Delineamento do Estudo

Este trabalho do tipo experimental, intervencional, cego, randomizado e controlado, foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP), aprovado e registrado sob o protocolo 293/2011.

3.2. Amostra

A amostra foi composta por 61 ratos Wistar EPM1 (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, com peso corporal variando entre 280 e 320 g, provenientes do Biotério Central da UNIFESP/EPM. Os animais durante 15 dias aclimatando-se ao ambiente, antes do início do experimento. Foram acondicionados em gaiolas individuais, com ração comercial e água *ad libitum* durante todo o experimento, em ciclos de claro-escuro de 12 horas, com temperatura constante de 22°C, umidade do ar de 65% (±10) e controle de ruídos. Houve alterações, na alimentação, somente 6 horas antes do experimento, quando se restringiu a oferta de alimentos sólidos.

Todos os procedimentos atenderam às Normas Éticas para Experimentação Animal do Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL-COBEA) e a legislação nacional atual sobre Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Federal 11.794, de 9 de outubro de 2008).

3.3. Grupos

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 9 grupos, como se segue (Figura 1).

Grupo controle (n= 5): os animais não foram submetidos a qualquer tipo de procedimento e foram submetidos à eutanásia no 7º dia pós-operatório.

Grupo 4LMST (n= 7): os animais foram submetidos ao trauma e à contensão, conforme os grupos tratados, mas não receberam irradiação ultrassônica. Foram submetidos à eutanásia no 4º dia pós-operatório.

Grupo 7LMST (n= 7): os animais foram submetidos ao trauma e à contensão, conforme os grupos tratados, mas não receberam irradiação ultrassônica. Foram submetidos à eutanásia no 7º dia pós-operatório.

Grupo 4US2 (n= 7): os animais foram submetidos ao trauma e à irradiação por ultrassom, durante 2 minutos. Este procedimento foi realizado por 4 dias consecutivos, sendo que foram realizadas 2 sessões de irradiação, tendo em vista que esta irradiação teve início 24 horas após a lesão e que nenhum animal foi irradiado no dia da eutanásia. Os animais foram submetidos à eutanásia no 4º dia pós-operatório.

Grupo 7US2 (n= 7): os animais foram submetidos ao trauma e à irradiação por ultrassom, durante 2 minutos entre os dias 2 e 5 pós-lesão, sendo que foram realizadas 5 sessões de irradiação, tendo em vista que esta irradiação teve início 24 horas após a lesão e que nenhum animal foi irradiado no dia da eutanásia. Os animais foram submetidos à eutanásia no 7º dia pós-operatório.

Grupo 4US4 (n= 7): os animais foram submetidos ao trauma e à irradiação por ultrassom, durante 4 minutos. Este procedimento foi realizado por 4 dias consecutivos, sendo que foram realizadas 2 sessões de irradiação, tendo em vista que esta irradiação teve início 24 horas após a lesão e que nenhum animal foi irradiado no dia da eutanásia. Os animais foram submetidos à eutanásia no 4º dia pós-operatório.

Grupo 7US4 (n= 7): os animais foram submetidos ao trauma e à irradiação por ultrassom, durante 4 minutos entre os dias 2 e 5 pós-lesão, sendo que foram realizadas 5 sessões de irradiação, tendo em vista que esta irradiação teve início 24 horas após a lesão e que nenhum animal foi irradiado no dia da eutanásia. Os animais foram submetidos à eutanásia no 7º dia pós-operatório.

Grupo 4US6 (n= 7): os animais foram submetidos ao trauma e à irradiação por ultrassom, durante 6 minutos. Este procedimento foi realizado

por 4 dias consecutivos, sendo que foram realizadas 2 sessões de irradiação, tendo em vista que esta irradiação teve início 24 horas após a lesão e que nenhum animal foi irradiado no dia da eutanásia. Os animais foram submetidos à eutanásia no 4º dia pós-operatório.

Grupo 7US6 (n= 7): os animais foram submetidos ao trauma e à irradiação por ultrassom, durante 6 minutos entre os dias 2 e 5 pós-lesão, sendo que foram realizadas 5 sessões de irradiação, tendo em vista que esta irradiação teve início 24 horas após a lesão e que nenhum animal foi irradiado no dia da eutanásia. Os animais foram submetidos à eutanásia no 7º dia pós-operatório.

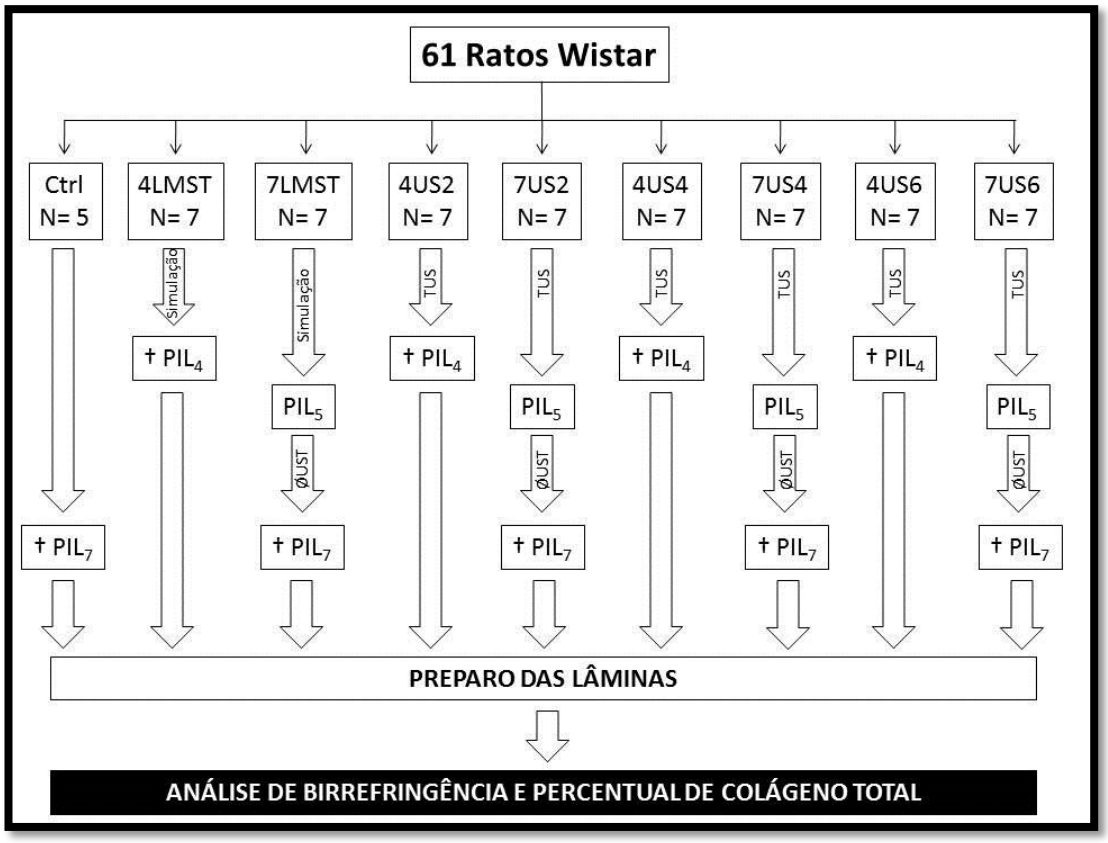

Figura 1 - Fluxograma do protocolo de estudo. Legenda: Ctrl= controle; TUS= terapia por ultrassom; † PIL_4= eutanásia no 4º dia pós-lesão induzida; PIL_5= 5º dia pós-lesão induzida; ØUST= sem irradiação ultrassônica; † PIL_7= eutanásia no 7º dia pós-lesão induzida;

3.4. Modelo de Lesão Muscular

O modelo de contusão seguiu os procedimentos utilizados em estudo prévio [163].

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia pela injeção intraperitonial de 100 mg/Kg de Ketamina e 20 mg/Kg de Xilazina. A anestesia foi feita apenas no momento pré-operatório, ou seja, os animais não foram submetidos à este procedimento em nenhum outro momento. Para controle analgésico foi utilizado butorfanol (1,0 mg/kg), intramuscular, em dose única.

Foi realizada a epilação da face posterior da pata traseira direita, sobre a panturrilha dos animais (Figura 2).

Figura 2 - Epilação da face posterior da pata traseira direita.

Após este procedimento foi realizada a antissepsia da região com Polvidine® e realizada a incisão e o descolamento da pele com o auxílio de uma lâmina de bisturi.

Em seguida, o tecido subcutâneo foi dissecado, para se obter melhor exposição do m. gastrocnêmio (Figura 3).

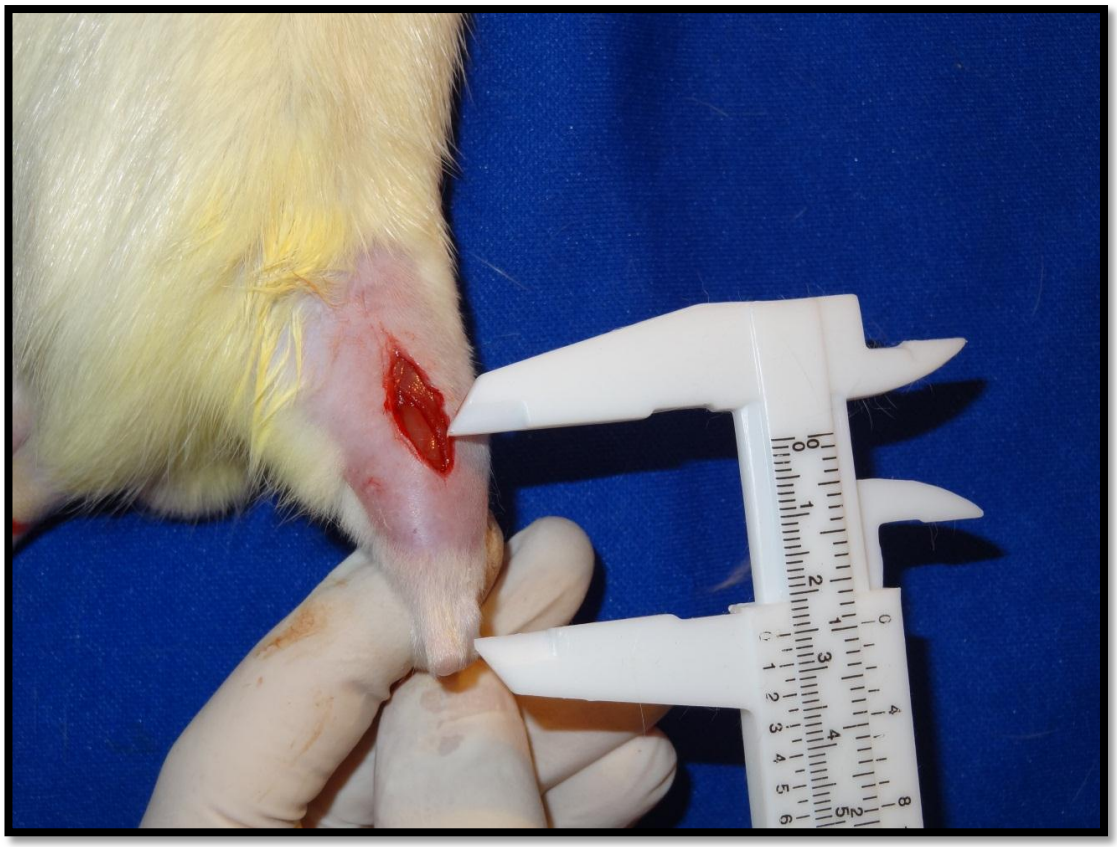

Figura 3 - Dissecação tecido subcutâneo e exposição do m. gastrocnêmio.

O local da lesão foi padronizado para todos os animais que foram posicionados com extensão máxima de quadril e flexão de 90º de tornozelo. Com auxílio de um bisturi, foi feita uma secção transversal de 1 cm de comprimento e, aproximadamente, 3 mm de profundidade (figura 4), a partir de 2,5 cm do osso calcâneo, ao lado do feixe vásculo-nervoso (artéria poplítea e nervo tibial). Todas as medidas foram realizadas com auxilio de um paquímetro.

Figura 4 - Secção transversal do m. gastrocnêmio.

O sangramento foi controlado por compressão para posterior sutura da pele, com pontos simples, utilizando-se fios de náilon monofilamentar 4-0 (Figura 5).

Figura 5 - Aspecto da sutura no pós-operatório imediato.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com atividades ilimitadas.

3.5. Dosimetria e aplicação da terapia por ultrassom

Todos os animais dos grupos 4US2, 7US2, 4US4, 7US4, 4US6 e 7US6 foram irradiados com ultrassom terapêutico de frequência igual a 1 MHz, frequência de repetição de pulso de 100 Hz, pulsos com duração de 2 ms (ciclo de trabalho de 20%), irradiância de 0,5 W/cm^2 (SATA). A emissão das ondas ultrassonoras ocorreu de forma pulsada. A taxa de não uniformidade do feixe (BNR) foi menor que 6,0 e a área de radiação efetiva (ERA) é de 0,5 cm^2.

Para favorecer a condutibilidade, das ondas mecânicas do ultrassom, foi realizada a epilação da região tratada e utilizado gel acoplante a base de água entre o transdutor e a pele do animal, gel este disponível comercialmente.

Durante a aplicação, os ratos foram estabilizados em um contensor, com o membro traseiro esquerdo completamente estendido e a pata mantida em flexão plantar (Figura 6).

Figura 6 - Aplicação da terapia por ultrassom sobre o local cirúrgico.

Durante a sonificação, cujo procedimento foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador, o qual desconhecia os grupos que estavam sendo manipulados em cada momento,o transdutor foi movimentado continuamente, a fim de se distribuir uniformemente a energia sobre a área lesionada e se impedir a formação de ondas estacionárias.

3.5.1. Equipamento de Ultrassom

Para o experimento foi utilizado um aparelho de Ultrassom Terapêutico (Sonacel Bioset® – Rio Claro - Brasil) (Figura 7), cujo desenho do transdutor, de área 0,5 cm^2, foi especialmente desenvolvido para melhor adequar o transdutor ao membro posterior do rato e ao tamanho da lesão. Esse cabeçote possui formato cônico para dirigir as ondas produzidas pelo aparelho.

O aparelho foi calibrado previamente aos experimentos utilizando-se de uma balança acústica modelo UPM – DT1.

Figura 7 - Equipamento de ultrassom terapêutico.

3.6. Eutanásia e Descarte

No dia previsto, os animais foram submetidos à eutanásia, em câmara de CO_2.

Imediatamente à eutanásia, as amostras dos músculos gastrocnêmios da pata traseira direita dos animais foram colhidas.

O descarte dos animais foi realizado de acordo com as Normas de Boas Práticas de Produção de Animais de Laboratórios e Biossegurança, ou seja, após a eutanásia, os animais foram acondicionados em sacos plásticos identificados com símbolo de risco biológico e levados ao freezer (-20ºC) onde permaneceram até a devida coleta, que foi feita pela prefeitura (Coleta de Resíduos Infectantes), em carros especiais e levados ao incinerador público.

3.7. Preparação das Amostras para Análise de Birrefringência e Picrosirius

Para a avaliação quali-quantitativada regeneração muscular, os músculos removidos foram submetidos à fixação em formol a 10% diluído em tampão fosfato de sódio (PBS – 0,1M, pH 7,4). O fixador ficou em contato com a peça por 12 horas à temperatura ambiente. Após o período de fixação, as peças foram convenientemente desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo xilol e impregnadas pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 60°C .

Após a inclusão do tecido, foram obtidos quatro cortes seriados de 5µm, utilizando-se um micrótomo manual (LEICA - RM 2145). Montaram-se os cortes em lâminas histológicas, contendo uma fina camada de albumina e numeradas conforme a ordem de corte.

As lâminas foram submetidas à 2 situações diferentes. Aquelas:

- Não-coradas, foram analisadas através de microscópio de luzpolarizada. A finalidade deste procedimento foi analisar a

organização das fibras de colágeno nos músculos por meio da medição da birrefringência[175] e;

- Coradas por *Sirius Red*, (núcleos contra-corados com hematoxilina) foram analisadas através de microscópio de luz polarizada, pois o aumento da birrefringência do colágeno promovida pela colaração de picrosirius é específica para colágeno e apresenta padrões distintos de agregação física: fibras colágenas muito finas são destacadas com fraca birrefringência (como as presentes em tecido de granulação precoce), enquanto as fibras grossas de colágeno, destacam-se por forte birrefringência (característica de lesões fibróticas maduras)[163,176].

As lâminas coradas por picrosirius foram analisadas em microscópio óptico equipado por um polarizador de luz acoplado a um analisador de imagem. O sistema utilizado consistia de uma câmera CCD Sony acoplada a um microscópio Olympus, a partir do qual as imagens puderam ser visualizadas no monitor. Por sistema digital inserido em um computador (Pentium 3000 MHz), as imagens foram processadas, empregando o programa Image ProPlus. Foram selecionados, aleatoriamente, 5 campos da região da lesão muscular, visualizados sob um aumento de 400 vezes. A área total medida pelo analisador em cada campo foi de 68.265.680 mm². O colágeno presente no campo analisado foi medido pela seleção de tonalidades birrefringentes correspondentes às bandas colagênicas polarizadas, com posterior medida da área digitalizada.

3.8. Medidas de Birrefringência

A propagação desigual da luz através de um objeto é a medida de birrefringência. Esta medida avalia a densidade e organização do material analisado e é utilizada para avaliar a organização e estrutura dos feixes de colágeno. A finalidade deste procedimento foi analisar a organização, o estado de agregação e o alinhamento das fibras de colágeno nos tendões, por meio da medição da birrefringência[177-179]. As lâminas de cada grupo

foram imersas em água destilada cujo índice de refração é de **η** = 1,333, por 30 minutos, para análise de birrefringência. O retardo óptico (RO) foi medido utilizando um microscópio de luz polarizada da marca LEICA®, com objetiva pol.10X/0,22, condensador 0.9, compensador de Sénarmont λ/4, luz monocromática λ= 546 nm, obtida por meio de um filtro de interferência LEICA®, do LaMaV (Laboratório de Materiais Vítreos do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar). Esse tipo de análise tem sido utilizado para mensurar o grau de organização das fibras colágenas de forma quantitativa em diversos estudos. As medidas resultantes em graus foram transformadas em nanometro (nm) multiplicando-seos graus por 3,03. O total de birrefringência das fibras de colágeno foi medido após embebição em água destilada. Para realizar as medições ao longo do eixo do músculo gastrocnêmio, o eixo longitudinal das fibras de colágeno foi orientado a 45° da direção de propagação da luz de transmissão. Nesta posição, as fibras de colágeno apresentam o maior RO. As medidas foram feitas em cinco diferentes pontos da área central dos tendões que correspondem à área da lesão[177-181]. Os dados de birrefringência foram colhidos de forma cega, por dois avaliadores previamente treinados e independentes.

3.9. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de distribuição através do Teste de Kolmogorov-Smirnov. Por apresentarem distribuição normal, foram submetidas à Análise de Variância *one-way* (ANOVA). Por fim, foi realizado o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer.

4. RESULTADOS

4.1. Medidas de Birrefringência – Retardo Óptico

Os dados demonstraram distribuição normal ao Teste de Kolmogorov-Smirnov e apresentaram diferença significante entre os grupos ($p < 0,0001$) de acordo com a Análise de Variância *one-way* (ANOVA), quando comparados os retardos ópticos de todos os grupos.

Ao realizar a análise histológica qualitativa por meio da microscopia de luz polarizada é possível definir o padrão de normalidade com relação à organização de fibras colágenas (Figura 8). Para tal, deve-se observar o brilho das imagens, quadro a quadro.

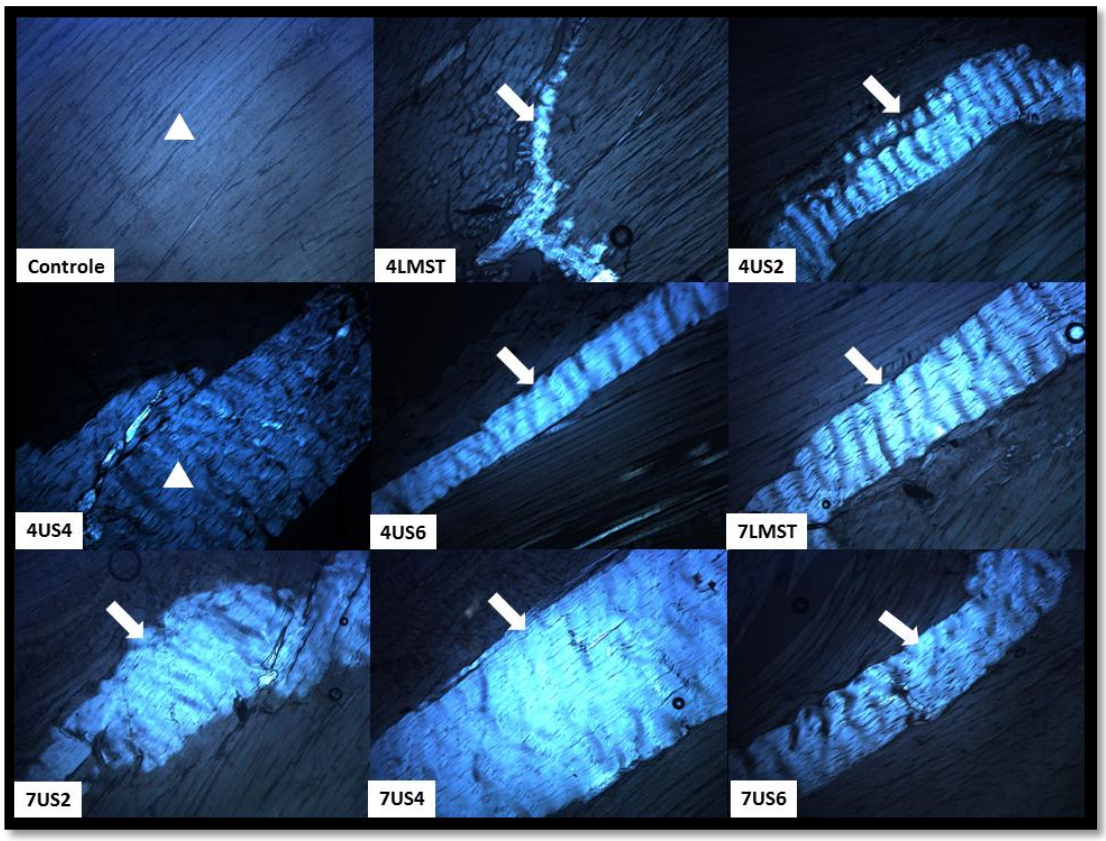

Figura 8 - Imagens referentes à observação qualitativa da análise de birrefringência do m. gastrocnêmio de ratos dos diferentes grupos, captadas por um microscópio de luz polarizada da marca LEICA®, com objetiva pol.10X/0,22, condensador 0.9, compensador de Sénarmont λ/4, luz monocromática λ= 546 nm, obtida por meio de um filtro de interferência LEICA®(100x).As espécimes foram posicionadas com o eixo longitudinal dos músculos em 45º com a normal. A seta branca aponta para áreas de maior brilho, enquanto as cabeças de seta branca evidenciam áreas de menor brilho.

Comparando-se as imagens da Figura 8, é possível observar que o brilho do tecido conjuntivo referente aos músculos dos animais dos grupos Controle e 4US4 é menor ao apresentado pelos demais grupos, indicando maior organização do colágeno.

As médias do retardo óptico por grupo e o resultado do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer podem ser visibilizados no Gráfico 1.

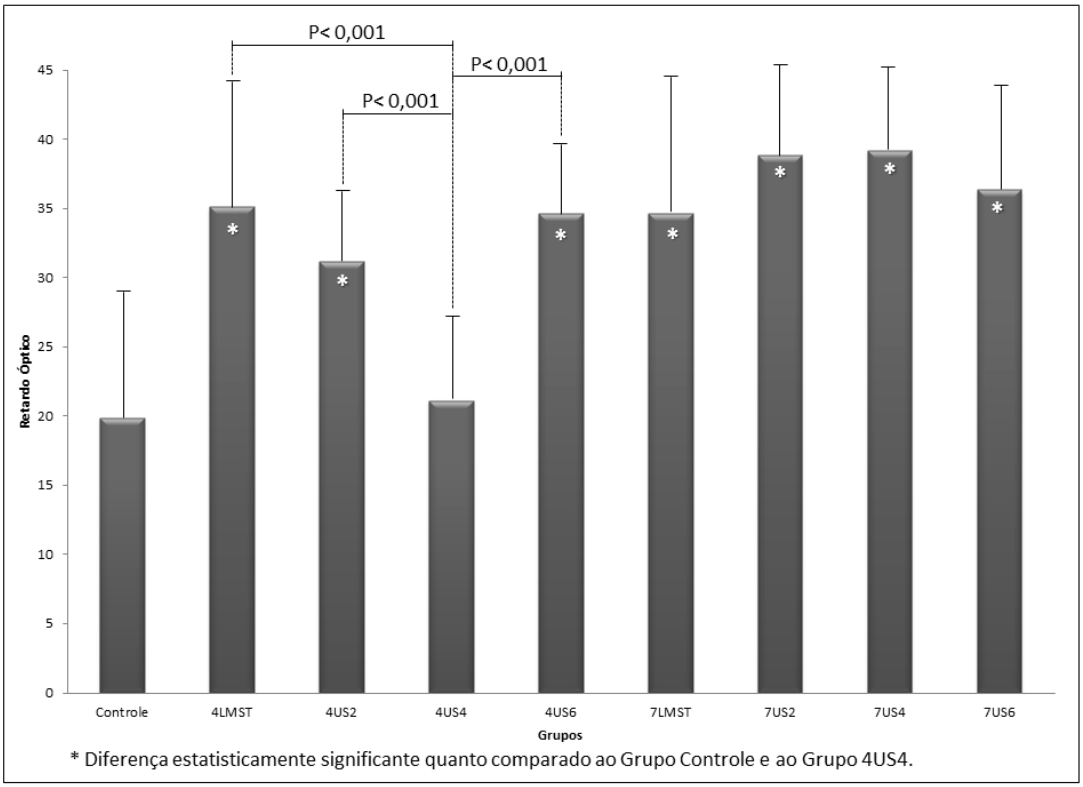

Gráfico 1 - Apresentação da média e desvio-padrão do retardo óptico, por grupo.

De acordo com o Gráfico 1, é possível identificar que os grupos Controle e 4US4 apresentaram menor retardo óptico que os demais grupos. Quando se realiza uma comparação dos dados entre os grupos de animais submetidos à eutanásia no 4º dia pós-operatório e o controle, pode-se observar que o grupo 4US4 não apresentou diferença estatisticamente significante com relação ao controle, fato que não ocorreu com os demais grupos.

Ao realizar-se a comparação dos dados entre os grupos de animais submetidos à eutanásia no 7º dia pós-operatório e o controle, todos os animais submetidos à cirurgia apresentaram diferenças estatisticamente significantes com relação ao controle. controle.

4.2. Percentual do Colágeno Total

Os dados demonstraram distribuição normal ao Teste de Kolmogorov-Smirnov e apresentaram diferença extremamente significante entre os grupos ($p < 0,0001$) de acordo com a Análise de Variância *one-way* (ANOVA), quando comparados os percentuais de colágeno total de todos os grupos.

A Figura 9 apresenta as imagens das lâminas cujos músculos foram corados com Sirius Red e seus respectivos núcleos contra corados com HE.

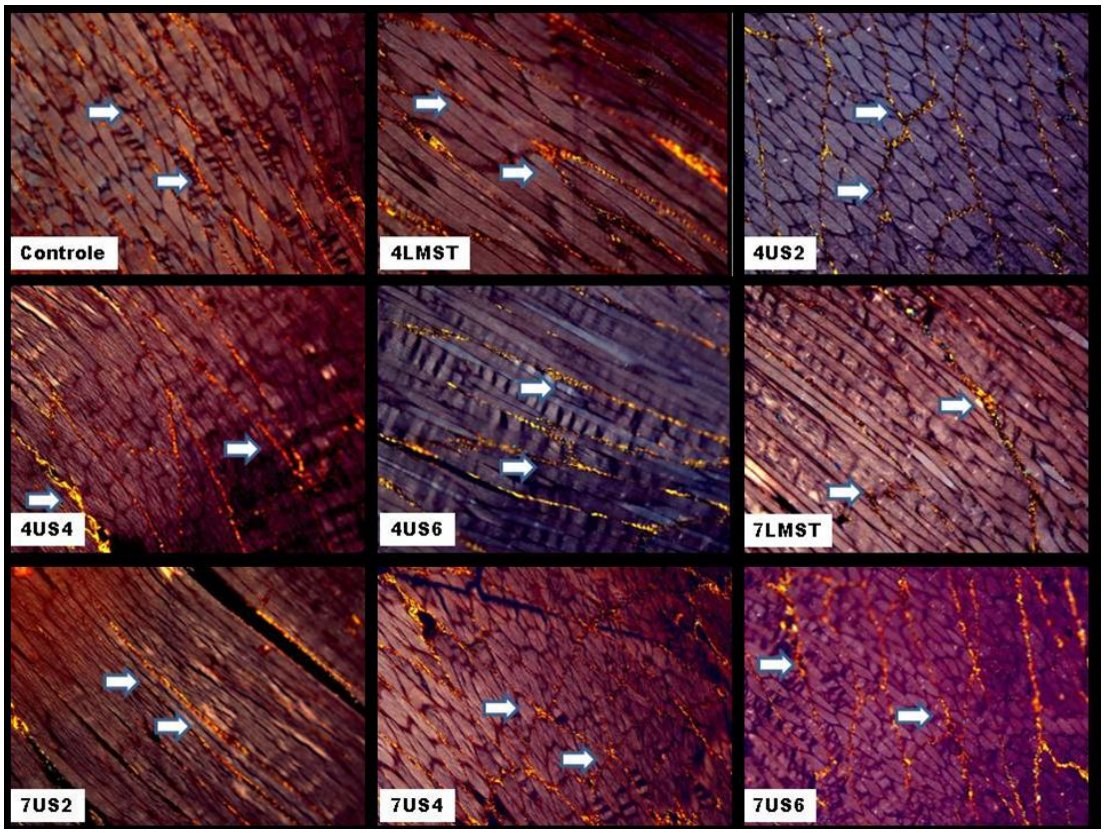

Figura 9 - Imagens referentes à observação qualitativa da análise de birrefringência do m. gastrocnêmio de ratos dos diferentes grupos, corados com Sirius Red e núcleos contracorados com HE. As setas evidenciam a presença de colágeno (coloração alaranjada mais brilhante) no local da lesão. Aumento: 400x.

É possível observar que os grupos Controle, 7US4 e 7US6 apresentam maior trama de colágeno no local da lesão.

A média e o desvio-padrão dos percentuais de colágeno total por grupo e o resultado do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer podem ser visibilizados no Gráfico 2.

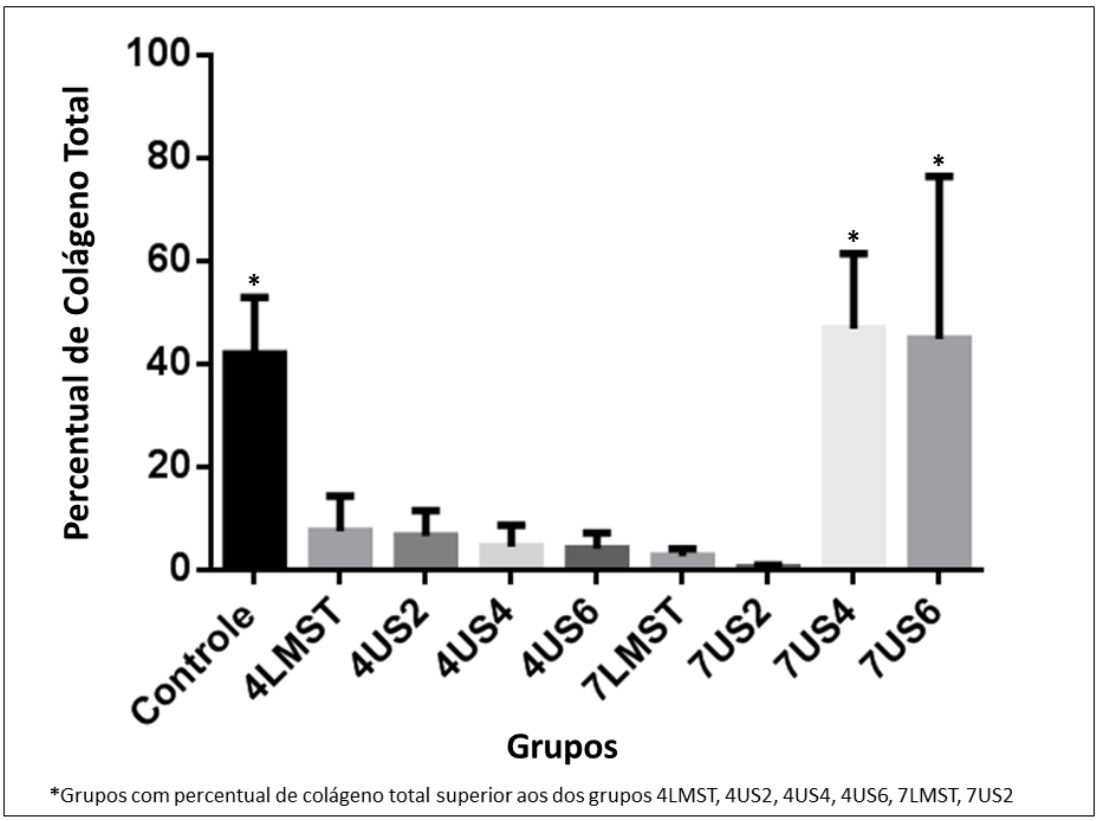

Gráfico 2 - Média e desvio-padrão do percentual de colágeno total.

5. DISCUSSÃO

Lesões musculares são lesões comuns no esporte, com incidência variando de 10% a 55% entre todas as lesões[2,35,36]. Elas podem ser causadas por traumas diretos (contusão, tensão ou laceração)[2,36] ou por causas indiretas (defeitos genéticos inatos ou problemas neurológicos)[37]. Uma lesão muscular apresenta tempos variados de reparação, dependendo da causa, músculo, da dimensão da lesão e características individuais dos sujeitos comprometidos. Um estudo com velocistas demonstrou que o tempo necessário para que músculos posteriores da coxa que sofreram laceração tivessem as mesmas condições de um nível pré-lesão pode estar entre 15 e 35 semanas, dependendo do comprometimento adicional do tendão proximal[182,183]. A incidência deste tipo de lesão e o tempo necessário para a recuperação deste comprometimento foram os principais fatores que motivaram a realização deste estudo.

No entanto, para que fosse possível estudar se o ultrassom terapêutico influencia a organização do colágeno, tornou-se necessário utilizar-se de um modelo experimental para se adquirirem resultados reprodutíveis e confiáveis, uma vez que é necessário padronizar-se o tipo de lesão, já que, como discutido anteriormente, a causa da lesão, o tipo da mesma, o músculo comprometido, as características individuais do sujeito e a extensão da lesão são fatores preponderantes na evolução do processo de reparo. Existem diferentes protocolos de lesão muscular. Encontram-se na literatura protocolos que geram lesões musculares do tipo contraturas através da utilização de estimulação elétrica[158], contusões musculares[38,157,161,162,184], lesão por resfriamento[165] e laceração cirúrgica[163]. Neste estudo optou-se por realizar a laceração cirúrgica, uma vez que o objetivo está relacionado à avaliar se o ultrassom terapêutico tem alguma influência na organização do colágeno. Como é sabido que a deposição de colágeno é maior em lesões de maior extensão, considerou-se que este protocolo de lesão seria o mais adequado para se analisarem as variáveis requeridas.

Imediatamente após a ocorrência de lesão no músculo esquelético, uma lacuna formada entre as fibras musculares rompidas é preenchida com um hematoma. A fibrina derivada do sangue e as ligações cruzadas da

fibronectina formam um tecido de granulação precoce, com o papel de uma matriz extracelular inicial que atua como via de transporte e de fixação para os fibroblastos[42]. Em seguida, os fibroblastos, iniciam a síntese as proteínas e proteoglicanos da matriz extracelular para restaurar a integridade estrutural do tecido conjuntivo[42,96-99,106].

A expressão da fibronectina é logo seguida pelo de colágeno tipo III[77,96-100], mas a produção do colágeno tipo I é iniciada somente dois dias mais tarde, embora permaneça elevada por várias semanas[42,65,77,97-99,106].

A cicatriz de tecido conjuntivo produzida no local da lesão é o ponto mais fraco do músculo esquelético recém-lesado após o trauma[42,107], mas sua resistência à tração aumenta consideravelmente com a produção do colágeno tipo I[97,106,107]. A estabilidade mecânica do colágeno, por sua vez, é atribuível à formação de ligações cruzadas intermoleculares durante a maturação do tecido cicatricial[106].

Este é um dos fatores que é utilizado para se justificar o uso do ultrassom terapêutico nos processos de reabilitação de indivíduos que sofreram lesões musculares, pois alguns autores[185] afirmam que este recurso favorece a síntese e a agregação do colágeno. Este recurso é muito utilizado nestas situações clínicas, mas não havia na literatura nenhum estudo proposto a avaliar se a organização de colágeno em lesões musculares seria influenciada pela energia mecânica do ultrassom. Como é sabido, a organização das fibras colágenas, assim como a sua agregação, melhora as condições funcionais do tecido cicatricial.

Jarvinen (1975)[105], Lehto et al (1985a)[97] e Jarvinen e Lehto (1993)[36] afirmam que a quantidade de tecido conjuntivo intramuscular não é aumentada após uma lesão a menos que o músculo seja completamente imobilizado por um período substancial de tempo. No entanto, há propostas de que ocorra fibrose geral no músculo esquelético em processo de recuperação[3]. Valendo-se da contrariedade dos pontos de vista citados, foi considerado importante avaliar, neste estudo, se seria possível observar alguma alteração dos elementos constitutivos relativos à presença de tecido conjuntivo no tecido muscular após o procedimento operatório em ratos que

não foram imobilizados e a quantificação do percentual de colágeno total na área comprometida através de lâminas coradas por picrosirius.

O nível de organização das fibras de colágeno no local da lesão é quantificado no microscópio de luz polarizada, de acordo com o RO. A intensidade do brilho na imagem de birrefringência revela o nível de agregação das fibras de colágeno[178]. Durante o processo de reparação tecidual existe uma tendência de diminuir o valor do RO[177]. Por isso, neste estudo, optou-se por avaliar o nível de organização das fibras de colágeno pela análise da birrefringência.

A dose é a variável mais estudada pelos pesquisadores[186,187] e há indicações que doses menores são mais efetivas para o reparo tecidual[188]. Os dados da literatura não trazem uma definição sobre o tempo de sonificação para a realização do tratamento mais adequado. Entre os estudos que avaliaram os efeitos do ultrassom terapêutico sobre o processo de reparação de músculos de ratos utilizaram-se de tempos de sonificação por terapia de 5[158,160,161,163], 6[157] e 20[165] minutos.

Os parâmetros dosimétricos utilizados neste estudo (intensidade, modo de emissão, frequência de emissão, frequência de *burst* e ciclo de trabalho) foram determinados de acordo com a frequência em que os mesmos aparecem nos estudos prévios acerca do uso do ultrassom terapêutico no processo de reparação muscular. Nos grupos experimentais em que houve a emissão de ultrassom, os tempos de sonificação foram alterados nos diferentes grupos, pois esta foi a variável eleita para ser estudada.

Segundo alguns autores[189,190], a duração do tratamento depende da área da lesão. Oakley (1978)[189] sugere que seja utilizado um ou dois minutos por área do transdutor e os tempos de tratamento subsequentes devem ser aumentados em 30 segundos. Assim, neste estudo, foram utilizadas as razões de 1, 2 ou 3 minutos por área de lesão, perfazendo-se tempos absolutos de 2, 4 ou 6 minutos, tendo-se em vista que a área de lesão era equivalente ao dobro da área de radiação efetiva (ERA). Este estudo corrobora as afirmações de Oakley (1978) [189], uma vez que o grupo 4US4 apresentou menor índice de colágeno total e melhor alinhamento das

fibras colágenas no músculo dos ratos. Este resultado permite que sejam apontadas duas hipóteses. A primeira refere-se ao fato de, possivelmente, a terapia por ultrassom ter favorecido a proliferação das SC's, assim como sua agregação e formação de mioblastos, seguido da formação de miotubos. Desta maneira, haveria uma maior taxa de regeneração no local da lesão, fazendo com que, funcionalmente, não houvesse a necessidade de haver grandes quantidades de colágeno depositadas. Por outro lado, pode-se imaginar que as ondas ultrassônicas poderiam ter sido tão eficientes na organização do colágeno, a ponto de gerar uma cicatriz com a mesma organização do tecido conjuntivo original. Mas, esta segunda hipótese parece ser menos provável, tendo-se em vista que o colágeno constituinte do tecido muscular, sem lesão, é diferente do colágeno constituinte da matriz cicatricial.

A intensidade de 0,5 W/cm² seguiu o utilizado por Karnes e Burton (2002)[158] e Matheus et al. (2008)[164], o modo de emissão ultrassônica pulsada deriva das pesquisas de Rantanen et al. (1999)[157], Fischer et al. (2003)[159], Wilkin et al (2004)[160], Piedade et al (2008)[163], Matheus et al (2008)[164] e Rennó et al (2011)[165]. A frequência de emissão de 1 MHz embasou-se nos experimentos de Karnes e Burton (2002)[158], Piedade et al (2008)[163] e Matheus et al (2008)[164]. A frequência de *burst* de 100 Hz e o ciclo de trabalho de 20% seguiu o proposto por Rantanen et al (1999)[157], Wilkin et al (2004)[160] e Matheus et al (2008)[164].

Foram identificados menores percentuais de colágeno total em todos os animais sacrificados no 4º dia pós-operatório. Este dado corrobora as afirmações de Järvinen (1975)[105], Lehto et al (1985a)[98] e Järvinen e Lehto (1993)[36] referente à inexistência de aumento de tecido conjuntivo no sítio de lesão desde que não haja imobilização do músculo acometido. No entanto, foi observado que, entre os animais que foram submetidos à lesão, somente aqueles que receberam tratamento de 4 minutos de ultrassom por dia apresentaram valores de RO iguais aos animais do grupo controle. Este fato pode sugerir que, com os parâmetros dosimétricos adotados, para uma irradiação de duração de 4 minutos, o colágeno depositado apresentou

maior organização. Porém, os grupos tratados com 2 ou 6 minutos apresentaram RO's maiores que os encontrados nos grupos Controle e 4US4. Considerando-se estes dados, pode-se sugerir que a submissão do tecido muscular lesionado a 2 minutos diários de tratamento por ultrassom seja insuficiente para se encontrar alterações significativas na organização do colágeno e que, se for realizado um tratamento com 6 minutos diários, poderia haver um aquecimento tecidual, de acordo com Gallo et al (2004)[133], suficiente para potencializar o processo inflamatório agudo, prejudicando a deposição organizada do colágeno pelos fibroblastos.

Referente aos animais eutanasiados no 7º dia pós-operatório, somente os componentes dos grupos 7US4 e 7US6 apresentaram os mesmos percentuais de colágeno total que o grupo controle. Os animais dos demais grupos apresentaram menores percentuais de colágeno total. Estes dados sugerem que que o tratamento diário por ultrassom, com durações de 4 ou 6 minutos, podem favorecer o depósito de colágeno pelos fibroblastos entre o 4º e o 7º dias pós-operatórios. No entanto, são observadas diferenças nos RO's de todos os grupos de animais submetidos à eutanásia no 7º dia pós-operatório, quando comparados ao controle. Pode-se sugerir que, possivelmente, o modo pulsado de emissão promova uma dose SATA inferior à mínima necessária para se obter maior organização do colágeno após o 4º dia pós-operatório, principalmente ao se considerar que, a partir do 2º dia pós-operatório, passa a existir a substituição do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I, de acordo com alguns autores[42,65,77,97-99,106].

Desta forma, pode-se sugerir a realização de estudos futuros que possam contribuir com conhecimento acerca da influência da terapia por ultrassom.

Poderia ser interessante estudar se o ultrassom pulsado, com os parâmetros dosimétricos utilizados neste estudo, seria capaz de alterar a temperatura tecidual e, ainda, se esta possível alteração, seria capaz de influenciar o processo inflamatório, a síntese e deposição do colágeno e sua organização.

Ainda, poderiam ser analisados os efeitos da irradiação de ultrassom contínuo após o 4º dia pós-operatório sobre a organização do colágeno.

Também seria relevante associarem-se dados referentes às características biomecânicas do tecido muscular submetido a este protocolo, a fim de se identificar se a organização de colágeno encontrada no 4º dia pós-operatório no grupo 4US4 e o percentual de colágeno total encontrado no 7º dia pós-operatório nos grupos 7US4 e 7US6 traduzem vantagens funcionais.

Este estudo apresenta limitações, uma vez que não realizou avaliações de variáveis biomecânicas, não diferenciou os diferentes tipos de colágeno presentes no local da lesão e não avaliou a expressão de fatores de crescimento envolvidos com a proliferação de CS's e fibroblastos.

Mas, encoraja os pesquisadores e clínicos a utilizarem a terapia por ultrassom em lesões musculares de maiores complexidades (2º e 3º graus), nas quais haverá a deposição de colágeno para a formação da cicatriz. Ainda é cedo para chegar a um consenso sobre a melhor dosimetria, tendo-se em vista que a extrapolação de dados experimentais oriundos de pesquisas com animais não deve ser feita de forma direta mas, certamente, seria um equívoco desconsiderarem-se os dados apresentados.

6. CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que a terapia por ultrassom, em regime pulsado de emissão de ondas, com frequência de 1 MHZ, ciclo de trabalho de 20%, frequência de *burst* de 100 Hz, irradiância de 0,5 W/cm², ERA de 0,5 cm² e BNR< 6,0:

- Aumenta a organização do colágeno depositado no local da lesão, no início do processo de reparação tecidual (até o 4º dia pós-operatório);
- Se realizada por 4 minutos por sessão, o que equivale a 2 minutos por ERA, apresenta aumenta a organização do colágeno depositado no local da lesão, nos primeiros 4 dias pós-lesão.
- Aumenta o percentual de colágeno total intramuscular, no local da lesão, quando mantida por, pelo menos 7 dias;
- Se realizada por 4 ou 6 minutos por sessão, o que equivale a 2 ou 3 minutos por ERA, aumenta sobre o percentual de colágeno total no local da lesão, se mantida por, pelo menos, 7 dias;

7. REFERÊNCIAS

1. Carlson BM. The regeneration of skeletal muscle. A review. Am J Anat. 1973;137(2):119-49.

2. Garrett WE, Jr. Muscle strain injuries. Am J Sports Med. 1996;24(6 Suppl):S2-8.

3. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. J Bone Joint Surg Am. 2002;84-A(5):822-32.

4. Tidball JG, Daniel TL. Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading. Cell Tissue Res. 1986;245(2):315-22.

5. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol. 1961;9:493-5.

6. Sambasivan R, Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. Semin Cell Dev Biol. 2007;18(6):870-82.

7. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. Genes Dev. 2006;20(13):1692-708.

8. Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS, Sesodia S. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. Dev Biol. 1990;141(1):24-40.

9. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. J Cell Biol. 2000;151(6):1221-34.

10. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? J Cell Biol. 2004;166(3):347-57.

11. Kuang S, Charge SB, Seale P, Huh M, Rudnicki MA. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. J Cell Biol. 2006;172(1):103-13.

12. Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, et al. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. J Cell Biol. 2006;172(1):91-102.

13. Tajbakhsh S, Bober E, Babinet C, Pournin S, Arnold H, Buckingham M. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. Dev Dyn. 1996;206(3):291-300.

14. Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. Cytokine Growth Factor Rev. 2004;15(4):215-28.

15. Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. Dev Biol. 2001;239(1):79-94.

16. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, et al. Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. Exp Cell Res. 2004;296(2):245-55.

17. Day K, Shefer G, Richardson JB, Enikolopov G, Yablonka-Reuveni Z. Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. Dev Biol. 2007;304(1):246-59.

18. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. Cell. 2007;129(5):999-1010.

19. Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, Conboy MJ, Rando TA, Weissman IL, et al. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. Cell. 2004;119(4):543-54.

20. Gnocchi VF, White RB, Ono Y, Ellis JA, Zammit PS. Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells. PLoS One. 2009;4(4):e5205.

21. Bosnakovski D, Xu Z, Li W, Thet S, Cleaver O, Perlingeiro RC, et al. Prospective isolation of skeletal muscle stem cells with a Pax7 reporter. Stem Cells. 2008;26(12):3194-204.

22. Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. Science. 2005;309(5743):2064-7.

23. Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, et al. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. Mol Ther. 2007;15(5):867-77.

24. Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. Ann Neurol. 1992;31(1):46-52.

25. Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. Trends Cell Biol. 2005;15(12):666-73.

26. Price FD, Kuroda K, Rudnicki MA. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. Biochim Biophys Acta. 2007;1772(2):272-83.

27. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. Dev Biol. 1998;194(1):114-28.

28. Floss T, Arnold HH, Braun T. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. Genes Dev. 1997;11(16):2040-51.

29. Musaro A. Growth factor enhancement of muscle regeneration: a central role of IGF-1. Arch Ital Biol. 2005;143(3-4):243-8.

30. Wozniak AC, Anderson JE. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. Dev Dyn. 2007;236(1):240-50.

31. Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, Buckingham ME, et al. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. Exp Cell Res. 2002;281(1):39-49.

32. Cossu G, Biressi S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. Semin Cell Dev Biol. 2005;16(4-5):623-31.

33. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. J Clin Invest. 2010;120(1):11-9.

34. Tabebordbar M, Wang ET, Wagers AJ. Skeletal Muscle Degenerative Diseases and Strategies for Therapeutic Muscle Repair. Annu Rev Pathol. 2012.

35. Almekinders LC. Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sports. Sports Med. 1993;15(3):139-45.

36. Jarvinen MJ, Lehto MU. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. Sports Med. 1993;15(2):78-89.

37. Cabral AJV, Machado V, Farinha R, Cabrita A. Skeletal muscle regeneration: a brief review. Experimental Pathology and Health Sciences. 2008;2(2):9-17.

38. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. Am J Sports Med. 1994;22(5):702-10.

39. Kujala UM, Orava S, Jarvinen M. Hamstring injuries. Current trends in treatment and prevention. Sports Med. 1997;23(6):397-404.

40. Kalimo H, Rantanen J, Järvinen M. Muscle injuries in sports. Baillieres Clin Orthop. 1997;2:1-24.

41. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. Am J Sports Med. 2005;33(5):745-64.

42. Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. Med Sci Sports Exerc. 1991;23(7):801-10.

43. Best TM, McCabe RP, Corr D, Vanderby R, Jr. Evaluation of a new method to create a standardized muscle stretch injury. Med Sci Sports Exerc. 1998;30(2):200-5.

44. Garrett WE, Jr., Safran MR, Seaber AV, Glisson RR, Ribbeck BM. Biomechanical comparison of stimulated and nonstimulated skeletal muscle pulled to failure. Am J Sports Med. 1987;15(5):448-54.

45. Law DJ, Caputo A, Tidball JG. Site and mechanics of failure in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle. Muscle Nerve. 1995;18(2):216-23.

46. Best TM, Fiebig R, Corr DT, Brickson S, Ji L. Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. J Appl Physiol. 1999;87(1):74-82.

47. Jarvinen TA, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. Curr Opin Rheumatol. 2000;12(2):155-61.

48. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Day CS, Bosch P, Buranapanitkit B, Moreland MS, et al. Biologic intervention in muscle healing and regeneration. Sports Med Arthroscopy Rev 1998;6:95-102.

49. Lille ST, Lefler SR, Mowlavi A, Suchy H, Boyle EM, Jr., Farr AL, et al. Inhibition of the initial wave of NF-kappaB activity in rat muscle reduces ischemia/reperfusion injury. Muscle Nerve. 2001;24(4):534-41.

50. St Pierre BA, Tidball JG. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. J Appl Physiol. 1994;77(1):290-7.

51. Honda H, Kimura H, Rostami A. Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle. Immunology. 1990;70(2):272-7.

52. McNeil PL. Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. J Cell Sci. 2002;115(Pt 5):873-9.

53. Miyake K, McNeil PL, Suzuki K, Tsunoda R, Sugai N. An actin barrier to resealing. J Cell Sci. 2001;114(Pt 19):3487-94.

54. Tidball JG. Force transmission across muscle cell membranes. J Biomech. 1991;24 Suppl 1:43-52.

55. Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? Br J Sports Med. 2003;37(4):284-6.

56. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. Immunology. 1996;89(4):563-8.

57. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. J Cell Biol. 2003;163(5):1133-43.

58. Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A, et al. Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. Am J Pathol. 2003;163(1):203-15.

59. Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. Med Sci Sports Exerc. 1995;27(7):1022-32.

60. Cannon JG, St Pierre BA. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. Mol Cell Biochem. 1998;179(1-2):159-67.

61. Cantini M, Carraro U. Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. J Neuropathol Exp Neurol. 1995;54(1):121-8.

62. Robertson TA, Maley MA, Grounds MD, Papadimitriou JM. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. Exp Cell Res. 1993;207(2):321-31.

63. Summan M, McKinstry M, Warren GL, Hulderman T, Mishra D, Brumbaugh K, et al. Inflammatory mediators and skeletal muscle injury: a DNA microarray analysis. J Interferon Cytokine Res. 2003;23(5):237-45.

64. Warren GL, O'Farrell L, Summan M, Hulderman T, Mishra D, Luster MI, et al. Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. Am J Physiol Cell Physiol. 2004;286(5):C1031-6.

65. Yan Z, Choi S, Liu X, Zhang M, Schageman JJ, Lee SY, et al. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. J Biol Chem. 2003;278(10):8826-36.

66. Rak J, Kerbel RS. bFGF and tumor angiogenesis--back in the limelight? Nat Med. 1997;3(10):1083-4.

67. Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. FASEB J. 2002;16(12):1630-2.

68. Anderson JE, Mitchell CM, McGeachie JK, Grounds MD. The time course of basic fibroblast growth factor expression in crush-injured skeletal muscles of SJL/J and BALB/c mice. Exp Cell Res. 1995;216(2):325-34.

69. Bunn JR, Canning J, Burke G, Mushipe M, Marsh DR, Li G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle--a biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. J Orthop Res. 2004;22(6):1336-44.

70. Burkin DJ, Kaufman SJ. The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. Cell Tissue Res. 1999;296(1):183-90.

71. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. Physiol Rev. 2004;84(1):209-38.

72. Collins RA, Grounds MD. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha(-/-) mice. J Histochem Cytochem. 2001;49(8):989-1001.

73. Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. Pathol Res Pract. 1991;187(1):1-22.

74. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. J Histochem Cytochem. 2002;50(5):589-610.

75. Hayashi S, Aso H, Watanabe K, Nara H, Rose MT, Ohwada S, et al. Sequence of IGF-I, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle. Histochem Cell Biol. 2004;122(5):427-34.

76. Perrone CE, Fenwick-Smith D, Vandenburgh HH. Collagen and stretch modulate autocrine secretion of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins from differentiated skeletal muscle cells. J Biol Chem. 1995;270(5):2099-106.

77. Best TM, Shehadeh SE, Leverson G, Michel JT, Corr DT, Aeschlimann D. Analysis of changes in mRNA levels of myoblast- and fibroblast-derived gene products in healing skeletal muscle using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. J Orthop Res. 2001;19(4):565-72.

78. Brickson S, Hollander J, Corr DT, Ji LL, Best TM. Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. Med Sci Sports Exerc. 2001;33(12):2010-5.

79. Brickson S, Ji LL, Schell K, Olabisi R, St Pierre Schneider B, Best TM. M1/70 attenuates blood-borne neutrophil oxidants, activation, and myofiber damage following stretch injury. J Appl Physiol. 2003;95(3):969-76.

80. Schneider BS, Sannes H, Fine J, Best T. Desmin characteristics of CD11b-positive fibers after eccentric contractions. Med Sci Sports Exerc. 2002;34(2):274-81.

81. Best TM, Hunter KD. Muscle injury and repair. Phys Med Rehabil Clin N Am. 2000;11(2):251-66.

82. Farges MC, Balcerzak D, Fisher BD, Attaix D, Bechet D, Ferrara M, et al. Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;282(2):E326-35.

83. Hurme T, Kalimo H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. Med Sci Sports Exerc. 1992;24(2):197-205.

84. Jankowski RJ, Deasy BM, Cao B, Gates C, Huard J. The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. J Cell Sci. 2002;115(Pt 22):4361-74.

85. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. Lab Invest. 1995;72(3):341-7.

86. Aarimaa V, Rantanen J, Best T, Schultz E, Corr D, Kalimo H. Mild eccentric stretch injury in skeletal muscle causes transient effects on tensile load and cell proliferation. Scand J Med Sci Sports. 2004;14(6):367-72.

87. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. J Cell Biol. 2002;157(5):851-64.

88. Rouger K, Brault M, Daval N, Leroux I, Guigand L, Lesoeur J, et al. Muscle satellite cell heterogeneity: in vitro and in vivo evidences for populations that fuse differently. Cell Tissue Res. 2004;317(3):319-26.

89. Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z. Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. J Cell Sci. 2004;117(Pt 22):5393-404.

90. LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. Cell. 2002;111(4):589-601.

91. Dreyfus PA, Chretien F, Chazaud B, Kirova Y, Caramelle P, Garcia L, et al. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. Am J Pathol. 2004;164(3):773-9.

92. Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H. Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. Neuromuscul Disord. 2002;12(6):584-7.

93. Aarimaa V, Kaariainen M, Vaittinen S, Tanner J, Jarvinen T, Best T, et al. Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus. Neuromuscul Disord. 2004;14(7):421-8.

94. Jarvinen M, Aho AJ, Lehto M, Toivonen H. Age dependent repair of muscle rupture. A histological and microangiographical study in rats. Acta Orthop Scand. 1983;54(1):64-74.

95. Li Y, Huard J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. Am J Pathol. 2002;161(3):895-907.

96. Hurme T, Kalimo H, Sandberg M, Lehto M, Vuorio E. Localization of type I and III collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle. Lab Invest. 1991;64(1):76-84.

97. Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical

activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. J Bone Joint Surg Br. 1985;67(5):820-8.

98. Lehto M, Jarvinen M. Collagen and glycosaminoglycan synthesis of injured gastrocnemius muscle in rat. Eur Surg Res. 1985;17(3):179-85.

99. Lehto M, Jarvinen M, Nelimarkka O. Scar formation after skeletal muscle injury. A histological and autoradiographical study in rats. Arch Orthop Trauma Surg. 1986;104(6):366-70.

100. Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. Physiol Genomics. 2003;14(3):261-71.

101. Morla A, Zhang Z, Ruoslahti E. Superfibronectin is a functionally distinct form of fibronectin. Nature. 1994;367(6459):193-6.

102. Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. J Cell Sci. 2003;116(Pt 16):3269-76.

103. Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Hurme T, Kvist M, et al. Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle. J Cell Sci. 2003;116(Pt 5):857-66.

104. Jarvinen TA, Kannus P, Jarvinen TL, Jozsa L, Kalimo H, Jarvinen M. Tenascin-C in the pathobiology and healing process of musculoskeletal tissue injury. Scand J Med Sci Sports. 2000;10(6):376-82.

105. Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 2. a histological study of the effect of early mobilization and immobilization on the repair processes. Acta Pathol Microbiol Scand A. 1975;83(3):269-82.

106. Lehto M, Sims TJ, Bailey AJ. Skeletal muscle injury--molecular changes in the collagen during healing. Res Exp Med (Berl). 1985;185(2):95-106.

107. Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Sievanen H, Kalimo H, Jarvinen M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. J Orthop Res. 1998;16(2):197-206.

108. Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 3. A micro-angiographical study of the effect of early mobilization and immobilization on capillary ingrowth. Acta Pathol Microbiol Scand A. 1976;84(1):85-94.

109. Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH, et al. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. J Appl Physiol. 2003;95(2):771-80.

110. Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. J Orthop Res. 2003;21(5):798-804.

111. Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. Am J Sports Med. 2001;29(4):394-402.

112. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. Biochem J. 1994;302 (Pt 2):527-34.

113. Frank CB, Hart DA, Shrive NG. Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments--a review. Osteoarthritis Cartilage. 1999;7(1):130-40.

114. Nakamura N, Hart DA, Boorman RS, Kaneda Y, Shrive NG, Marchuk LL, et al. Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo. J Orthop Res. 2000;18(4):517-23.

115. Corsi A, Xu T, Chen XD. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. J Bone Miner Res. 2002;17:1180-9.

116. Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. Acta Chir Scand. 1976;142(1):47-56.

117. Jozsa L, Reffy A, Demel S, Szilagyi I. Alterations of oxygen and carbon dioxide tensions in crush-injured calf muscles of rat. Z Exp Chir. 1980;13(2):91-4.

118. Snow MH. Metabolic activity during the degenerative and early regenerative stages of minced skeletal muscle. Anat Rec. 1973;176(2):185-203.

119. Rantanen J, Ranne J, Hurme T, Kalimo H. Denervated segments of injured skeletal muscle fibers are reinnervated by newly formed neuromuscular junctions. J Neuropathol Exp Neurol. 1995;54(2):188-94.

120. Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Hurme T, Rantanen J, Lendahl U, et al. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. J Neuropathol Exp Neurol. 2001;60(6):588-97.

121. Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Rantanen J, Hurme T, Lendahl U, et al. Specific and innervation-regulated expression of the intermediate filament protein nestin at neuromuscular and myotendinous junctions in skeletal muscle. Am J Pathol. 1999;154(2):591-600.

122. Allikian MJ, Hack AA, Mewborn S, Mayer U, McNally EM. Genetic compensation for sarcoglycan loss by integrin alpha7beta1 in muscle. J Cell Sci. 2004;117(Pt 17):3821-30.

123. Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Nissinen L, Heino J, Jarvinen M, et al. Integrin and dystrophin associated adhesion protein complexes during regeneration of shearing-type muscle injury. Neuromuscul Disord. 2000;10(2):121-32.

124. Sorokin LM, Maley MA, Moch H, von der Mark H, von der Mark K, Cadalbert L, et al. Laminin alpha4 and integrin alpha6 are upregulated in regenerating dy/dy skeletal muscle: comparative expression of laminin and integrin isoforms in muscles regenerating after crush injury. Exp Cell Res. 2000;256(2):500-14.

125. Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. Scand J Med Sci Sports. 2000;10(6):332-7.

126. Kaariainen M, Liljamo T, Pelto-Huikko M, Heino J, Jarvinen M, Kalimo H. Regulation of alpha7 integrin by mechanical stress during skeletal muscle regeneration. Neuromuscul Disord. 2001;11(4):360-9.

127. Song WK, Wang W, Foster RF, Bielser DA, Kaufman SJ. H36-alpha 7 is a novel integrin alpha chain that is developmentally regulated during skeletal myogenesis. J Cell Biol. 1992;117(3):643-57.

128. Cameron MH. Ultrasound efficacy. Phys Ther. 2004;84(10):983-4; author reply 4-5; discussion 5-7.

129. Kramer JF. Ultrasound: evaluation of its mechanical and thermal effects. Arch Phys Med Rehabil. 1984;65(5):223-7.

130. Nyborg WL. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: general review. Ultrasound Med Biol. 2001;27(3):301-33.

131. Draper DO, Castel JC, Castel D. Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound. J Orthop Sports Phys Ther. 1995;22(4):142-50.

132. Ulus Y, Tander B, Akyol Y, Durmus D, Buyukakincak O, Gul U, et al. Therapeutic ultrasound versus sham ultrasound for the management of patients with knee osteoarthritis: a randomized double-blind controlled clinical study. Int J Rheum Dis. 2012;15(2):197-206.

133. Gallo JA, Draper DO, Brody LT, Fellingham GW. A comparison of human muscle temperature increases during 3-MHz continuous and pulsed ultrasound with equivalent temporal average intensities. J Orthop Sports Phys Ther. 2004;34(7):395-401.

134. Ebadi S, Nakhostin Ansari N, Naghdi S, Jalaei S, Sadat M, Bagheri H, et al. The effect of continuous ultrasound on chronic non-specific low back pain: a single blind placebo-controlled randomized trial. BMC Musculoskelet Disord. 2012;13(1):192.

135. Chan AK, Myrer JW, Measom GJ, Draper DO. Temperature changes in human patellar tendon in response to therapeutic ultrasound. J Athl Train. 1998;33(2):130-5.

136. Baker RJ, Bell GW. The effect of therapeutic modalities on blood flow in the human calf. J Orthop Sports Phys Ther. 1991;13(1):23-7.

137. Lehmann JF, Delateur BJ, Stonebridge JB, Warren CG. Therapeutic temperature distribution produced by ultrasound as modified by dosage and volume of tissue exposed. Arch Phys Med Rehabil. 1967;48(12):662-6.

138. Weaver SL, Demchak TJ, Stone MB, Brucker JB, Burr PO. Effect of transducer velocity on intramuscular temperature during a 1-MHz ultrasound treatment. J Orthop Sports Phys Ther. 2006;36(5):320-5.

139. Hayes BT, Merrick MA, Sandrey MA, Cordova ML. Three-MHz Ultrasound Heats Deeper Into the Tissues Than Originally Theorized. J Athl Train. 2004;39(3):230-4.

140. Harle J, Salih V, Mayia F, Knowles JC, Olsen I. Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells in vitro. Ultrasound Med Biol. 2001;27(4):579-86.

141. Mortimer AJ, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. Ultrasound Med Biol. 1988;14(6):499-506.

142. Dinno MA, Crum LA, Wu J. The effect of therapeutic ultrasound on electrophysiological parameters of frog skin. Ultrasound Med Biol. 1989;15(5):461-70.

143. Fyfe MC, Chahl LA. Mast cell degranulation and increased vascular permeability induced by 'therapeutic' ultrasound in the rat ankle joint. Br J Exp Pathol. 1984;65(6):671-6.

144. Young SR, Dyson M. Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. Ultrasound Med Biol. 1990;16(8):809-16.

145. Harvey W, Dyson M, Pond JB, Grahame R. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. Rheumatol Rehabil. 1975;14(4):237.

146. Tsai WC, Pang JH, Hsu CC, Chu NK, Lin MS, Hu CF. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor beta. J Orthop Res. 2006;24(6):1310-6.

147. Altland OD, Dalecki D, Suchkova VN, Francis CW. Low-intensity ultrasound increases endothelial cell nitric oxide synthase activity and nitric oxide synthesis. J Thromb Haemost. 2004;2(4):637-43.

148. Hsu SH, Huang TB. Bioeffect of ultrasound on endothelial cells in vitro. Biomol Eng. 2004;21(3-5):99-104.

149. Rawool NM, Goldberg BB, Forsberg F, Winder AA, Hume E. Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. J Ultrasound Med. 2003;22(2):145-53.

150. Choi BH, Woo JI, Min BH, Park SR. Low-intensity ultrasound stimulates the viability and matrix gene expression of human articular chondrocytes in alginate bead culture. J Biomed Mater Res A. 2006;79(4):858-64.

151. Kopakkala-Tani M, Leskinen JJ, Karjalainen HM, Karjalainen T, Hynynen K, Toyras J, et al. Ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in bovine primary chondrocytes. Biorheology. 2006;43(3-4):271-82.

152. Min BH, Woo JI, Cho HS, Choi BH, Park SJ, Choi MJ, et al. Effects of low-intensity ultrasound (LIUS) stimulation on human cartilage explants. Scand J Rheumatol. 2006;35(4):305-11.

153. Miyamoto K, An HS, Sah RL, Akeda K, Okuma M, Otten L, et al. Exposure to pulsed low intensity ultrasound stimulates extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads. Spine (Phila Pa 1976). 2005;30(21):2398-405.

154. Adinno MA, al-Karmi AM, Stoltz DA, Matthews JC, Crum LA. Effect of free radical scavengers on changes in ion conductance during exposure to therapeutic ultrasound. Membr Biochem. 1993;10(4):237-47.

155. Chapelon JY, Cathignol D, Cain C, Ebbini E, Kluiwstra JU, Sapozhnikov OA, et al. New piezoelectric transducers for therapeutic ultrasound. Ultrasound Med Biol. 2000;26(1):153-9.

156. Parvizi J, Parpura V, Greenleaf JF, Bolander ME. Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes. J Orthop Res. 2002;20(1):51-7.

157. 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.

158. Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. Arch Phys Med Rehabil. 2002;83(1):1-4.

159. Fisher BD, Hiller CM, Rennie GA. A comparison of continuous ultrasound and pulsed ultrasound on soft tissue injury markers in the rat. J Phys Ther Sci. 2003;15(2):65-70.

160. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. Int J Sports Med. 2004;25(1):73-7.

161. Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. Arch Phys Med Rehabil. 2005;86(7):1304-10.

162. 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(7):936-40.

163. Piedade MC, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, de Toledo OM. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. Ultrasonics. 2008;48(5):403-11.

164. Matheus JPC, F.B. O, Gomide LB, Milani JGPO, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. Rev Bras Fisioter. 2008;12(3):241-7.

165. Renno AC, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, et al. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. Photomed Laser Surg. 2011;29(1):5-10.

166. Tsai WC, Tang ST, Liang FC. Effect of therapeutic ultrasound on tendons. Am J Phys Med Rehabil. 2011;90(12):1068-73.

167. Enwemeka CS. The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study. Am J Phys Med Rehabil. 1989;68(6):283-7.

168. Jackson BA, Schwane JA, Starcher BC. Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. Med Sci Sports Exerc. 1991;23(2):171-6.

169. Fu SC, Shum WT, Hung LK, Wong MW, Qin L, Chan KM. Low-intensity pulsed ultrasound on tendon healing: a study of the effect of treatment duration and treatment initiation. Am J Sports Med. 2008;36(9):1742-9.

170. Maiti SK, Kumar N, Singh GR, Hoque M, Singh R. Ultrasound therapy in tendinous injury healing in goats. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2006;53(5):249-58.

171. Papatheodorou LK, Malizos KN, Poultsides LA, Hantes ME, Grafanaki K, Giannouli S, et al. Effect of transosseous application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone interface healing: gene expression and histological analysis in rabbits. Ultrasound Med Biol. 2009;35(4):576-84.

172. Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. Med Sci Sports Exerc. 1997;29(3):326-32.

173. Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. J Oral Maxillofac Surg. 1999;57(4):409-19; discussion 20.

174. De Deyne PG, Kirsch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. Phys Ther. 1995;75(7):629-34.

175. Vidal B de C. Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence. Cell Mol Biol. 1986;32(5):527-35.

176. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. Cell Biol Int. 1996;20(1):15-27.

177. Carrinho PM, Renno AC, Koeke P, Salate AC, Parizotto NA, Vidal BC. Comparative study using 685-nm and 830-nm lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in the mouse. Photomed Laser Surg. 2006;24(6):754-8.

178. da Cunha A, Parizotto NA, Vidal Bde C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. Ultrasound Med Biol. 2001;27(12):1691-6.

179. Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. Micron. 2003;34(8):423-32.

180. Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto NA. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. Rev Bras Fisioter. 2007;11(4):283-8.

181. Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Salate AC. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. Ultrasound Med Biol. 2005;31(3):345-50.

182. Hayashi D, Hamilton B, Guermazi A, de Villiers R, Crema MD, Roemer FW. Traumatic injuries of thigh and calf muscles in athletes: role and clinical relevance of MR imaging and ultrasound. Insights Imaging. 2012.

183. Askling CM, Tengvar M, Saartok T, Thorstensson A. Acute first-time hamstring strains during high-speed running: a longitudinal study including clinical and magnetic resonance imaging findings. Am J Sports Med. 2007;35(2):197-206.

184. Shu B, Yang Z, Li X, Zhang LQ. Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion. Cell Biochem Biophys. 2012;62(2):329-36.

185. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. Matrix Biol. 1999;18(5):417-26.

186. Ng CO, Ng GY, See EK, Leung MC. Therapeutic ultrasound improves strength of achilles tendon repair in rats. Ultrasound Med Biol. 2003;29(10):1501-6.

187. Alexander LD, Gilman DR, Brown DR, Brown JL, Houghton PE. Exposure to low amounts of ultrasound energy does not improve soft tissue shoulder pathology: a systematic review. Phys Ther. 2010;90(1):14-25.

188. Ng GY, Fung DT. The effect of therapeutic ultrasound intensity on the ultrastructural morphology of tendon repair. Ultrasound Med Biol. 2007;33(11):1750-4.

189. Oakley EM. Application of continuous beam ultrasound at therapeutic levels. Physiotherapy. 1978;64(6):169-72.

190. Dyson M, Pond JB, Joseph J, Warwick R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. Clin Sci. 1968;35(2):273-85.

ANEXO

MEDICINA

USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/08/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **293/11** intitulado: **"INFLUÊNCIA DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO DA TERAPIA POR ULTRASSOM SOBRE A ORGANIZAÇÃO DO COLÁGENO E EXPRESSÃO DE IGF1, HGF, BFGF NO PROCESSO DE REPARAÇÃO MUSCULAR DE RATOS"** que utilizará **61** animais da espécie **Rattus norvegicus albinus,** apresentado pelo **Departamento de FISIOTERAPIA, FONOAUDIOLOGIA E TERAPIA OCUPACIONAL**

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

Pesquisador (a) Responsável: Raquel Aparecida Casarotto
Pesquisador (a) Executante: Cristiano Schiavinato Baldan

CEP-FMUSP, 16 de Agosto de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa