


Programa de Pós Graduação em Fisioterapia



**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE
CRIOTERAPIA E ULTRASSOM TERAPÊUTICO NA REPARAÇÃO
DA LESÃO MUSCULAR DE RATOS WISTAR**

Tatiana Emy Koike

Presidente Prudente

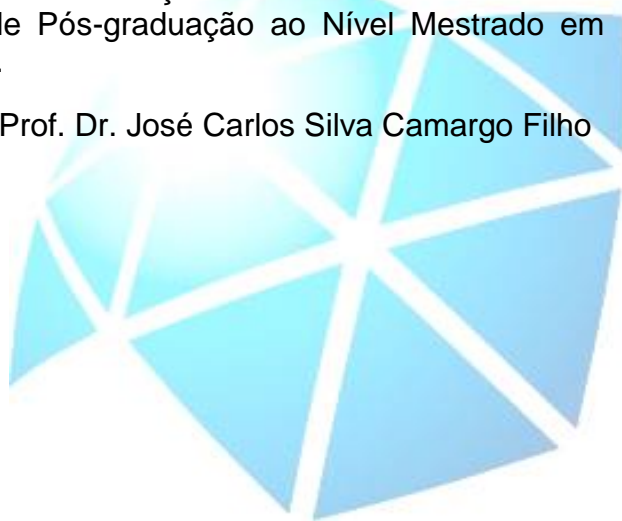
2016

Tatiana Emy Koike

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DOS TRATAMENTOS DE
CRIOTERAPIA E ULTRASSOM TERAPÊUTICO NA REPARAÇÃO
DA LESÃO MUSCULAR DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia - FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação ao Nível Mestrado em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho



Presidente Prudente

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

K85e Koike, Tatiana Emy.
Efeitos da associação dos tratamentos de crioterapia e ultrassom terapêutico na reparação da lesão muscular de ratos wistar / Tatiana Emy Koike. - Presidente Prudente: [s.n.], 2015
59 f.

Orientador: José Carlos Silva Camargo Filho
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Inclui bibliografia

1. Lesão muscular. 2. Ultrassom Terapêutico. 3. Crioterapia. 4. Fisioterapia. I. Camargo Filho, José Carlos Silva. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Efeitos da associação de crioterapia e ultrassom terapêutico na reparação do tecido muscular lesionado.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Presidente Prudente

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. JOSÉ CARLOS SILVA CAMARGO FILHO
(ORIENTADOR)

PROF. DR. LUIZ CARLOS MARQUES VANDERLEI
(FCT/UNESP)

PROFA. DRA. RENATA CALCILARI ROSSI E SILVA
(UNOESTE)

TATIANA EMY KOIKE

PRESIDENTE PRUDENTE, 17 DE FEVEREIRO DE 2016.

RESULTADO: Aprovado

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Seção Técnica de Pós-Graduação
Rua Roberto Simonsen, 305 CEP 19060-900 Presidente Prudente SP
Tel 18 3229-5319 fax 18 3223-4519 posgrad@fct.unesp.br

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha família, a qual sempre me apoiou
para não desistir de alcançar meus sonhos.*

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela vida e por colocar pessoas especiais em meu caminho durante esta jornada, sem ele nada disso seria possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho, que me acolheu no laboratório desde os primeiros anos de graduação, por abrir as portas para a área da pesquisa científica a qual me encantei. Agradeço a todos os ensinamentos, à dedicação e disposição em ajudar a todos sem medir esforços, o que o torna um ser humano singular.

A Prof. Dra. Regina Celi Trindade Camargo, pelo cuidado em sempre ajudar tanto em nossos estudos, quanto em nos acalmar e acalantar quando estamos aflitos e ansiosos. Sou grata pelas suas palavras, de carinho e confiança, que me confortaram em momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Marques Vandeleí, Profa. Dra. Renata Calciolari Rossi e Silva e ao Prof. Dr. Fábio Santos de Lira por aceitarem compor a banca de Exame de Qualificação e de Defesa do Mestrado, pelo apoio, ensinamentos e contribuições científicas que ajudaram muito para o meu desenvolvimento.

Ao Prof. Sérgio Minoru Oikawa, Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim e Prof. José Adilson Meira Freitas (in memoriam), agradeço pela colaboração de extrema importância durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Histologia e Histoquímica e do Laboratório de Fisiologia do Estresse, muito obrigada pelo aprendizado e companheirismo de todos os dias. Em especial ao Guilherme Akio Tamura Ozaki e Anne Kastelianne Franca da Silva por todo o apoio e contribuição para seguir em frente; ao

Robson Chacon Castoldi, Allan Magalhães Barbosa, Thiago Alves Garcia e William Sales Ferreira do Carmo muito obrigada por cada dia de convívio, pelos momentos de descontração, aprendizado e também de desabafos.

Aos colegas que ingressaram comigo no mestrado, pela agradável convivência durante as disciplinas, especialmente a Iara Trevisan e Fabiano Lima.

Agradeço especialmente aos meus irmãos André, Alexandre e Andresson Koike, e minha família pelo apoio incondicional e por compreenderem minha ausência durante todo este período. Ao meu pai, Ernesto Go Koike, por todo o amor e com certeza por todas as conversas sobre a vida, sempre me edificando para ser uma pessoa melhor. À minha mãe, Mitsue Margarida Seguchi Koike, por ser tão cuidadosa com tudo e com todos, e da maneira mais simples transmitir o quanto ama seus filhos. Agradeço por todo o amor e confiança depositada em mim, vocês são meus exemplos de força, amor, dedicação, companheirismo, humildade e altruísmo.

Às pessoas incríveis que conheci em Presidente Prudente e que se tornaram uma grande família, mesmo com toda a distância agradeço sempre por esta amizade perdurar... Adriana Yukie Watanabe, Aline Aoyama, Juliana Tiyaki Ito, Fabiana Midori Takii e Tatiane Soares. Agradeço a Vanessa Tiemi Haro e Erika Yumi Akasaka, não tenho palavras para descrever o que é ter vocês em minha vida, posso dizer que são irmãs que quero levar para sempre.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

—Charles Chaplin

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

— Arthur Schopenhauer

Sumário

Apresentação.....	14
Resumo	16
Abstract.....	18
Introdução	19
Artigo I	22
Análise Morfométrica e Fractal do tecido muscular lesionado submetido a combinação dos tratamentos de Crioterapia e Ultrassom Terapêutico.	23
Artigo II	37
Efeitos da associação de crioterapia e ultrassom terapêutico na reparação da lesão muscular: morfologia, dimensão fractal e expressão gênica de TNF- α , TGF- β 1.....	38
Considerações finais.....	56
Referências Bibliográficas	58

Essa dissertação segue o modelo alternativo originado a partir da pesquisa intitulada: **efeitos da associação dos tratamentos de crioterapia e ultrassom terapêutico na reparação da lesão muscular de ratos wistar**, desenvolvido no Laboratório de Histologia e Histoquímica do Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente.

Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Fisioterapia, o presente material está dividido nas seguintes sessões:

- *Resumo;*
- *Abstract;*
- *Introdução:* para contextualização do tema pesquisado;
- *Artigo I:* Tatiana Emy Koike, Regina Celi Trindade Camargo, Guilherme Akio Tamura Ozaki, Robson Chacon Castoldi, Patrícia Monteiro Seraphim, Sérgio M Oikawa, José CS Camargo Filho. Análise Morfométrica e Fractal do tecido muscular lesionado submetido combinação dos tratamentos de Crioterapia e Ultrassom Terapêutico.
- *Artigo II:* Tatiana Emy Koike, Regina Celi Trindade Camargo, Guilherme Akio Tamura Ozaki, Robson Chacon Castoldi, Patrícia Monteiro, José CS Camargo Filho. Efeitos da associação de crioterapia e ultrassom terapêutico na reparação da lesão muscular: morfologia, dimensão fractal e expressão gênica de TNF- α , TGF- β 1.
- *Conclusões:* obtidas a partir da pesquisa realizada
- *Referências Bibliográficas:* referentes ao texto da introdução.
 - *Anexo I:* Normas da revista do Artigo II, *International Journal of Morphology* (Normas no site <http://www.scielo.cl/revistas/ijmorphol/pinstruc.htm>)
 - *Anexo II:* Normas da revista do Artigo I, *Journal of Physiotherapy*. (Normas no site <https://www.elsevier.com/journals/journal-of-physiotherapy/1836-9553/guide-for-authors>)

Resumo

As lesões musculares são frequentemente ocasionadas em decorrência da prática de atividades esportivas e recreativas. Devido sua alta incidência, é importante pesquisar os tratamentos que promovam qualidade no processo de reparação muscular e menor duração. Avaliar o efeito da combinação dos recursos terapêuticos de Crioterapia e Ultrassom Terapêutico no tratamento de lesão muscular por impacto. 55 ratos wistar foram separados em Grupos Lesão Aguda (LA), Lesão (L), Crioterapia (CR), Ultrassom Terapêutico (US), Crioterapia e Ultrassom Terapêutico (CRUS). Todos os animais foram anestesiados e submetidos à lesão muscular por impacto pela liberação de uma carga de 200g a 30 cm de altura. Em seguida receberam os tratamentos conforme grupo alocado, sendo o protocolo de CR por meio de bolsa de gelo durante 20 minutos e o US durante cinco minutos com intensidade de 0,5W/cm² e frequência de 1MHz. A eutanásia foi realizada por administração intraperitoneal de superdosagem de Xilazina e Ketamina, para subsequente coleta do músculo gastrocnêmio destinado às análises de massa Corporal e Muscular, análises Histológica e Dimensão Fractal do processo inflamatório e de colágeno, Quantificação gênica de RNAm (TNF- α e TGF- β 1). A análise dos dados foi realizada utilizando o programa estatístico SPSS 22 for Windows. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados. Quando os dados apresentaram normalidade, foi utilizado teste T para amostras pareadas e teste de Anova one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey. Quando violada a normalidade dos dados, seguiu-se com o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%. Dentre todos os grupos, o CRUS perdeu menos massa corporal e muscular, melhora da morfometria, além de apresentar redução de colágeno pela DF em comparação aos LA e CR ($p < 0,05$). Com relação ao processo inflamatório, grupo CRUS apresentou redução significativa da DF em relação aos grupos LA ($p = 0,001$), L ($p = 0,001$) e CR ($p = 0,007$), e o US reduziu a DF significativamente em relação aos grupos LA ($p = 0,001$), L ($p = 0,001$) e CR ($p = 0,036$). A redução de TNF- α foi significativa no grupo US comparado com grupos LA ($p = 0,008$); L ($p = 0,032$) e CR ($p = 0,046$), e TGF- β 1 no grupo CR em comparação aos LA ($p = 0,001$) e L ($p = 0,006$), no grupo US em comparação ao LA ($p = 0,049$), e CRUS em comparação aos LA ($p = 0,023$). A associação de tratamentos foi superior aos resultados apresentados pelos tratamentos isolados no processo de reparação muscular. Observado pela redução da perda de massa corporal e muscular, melhora do aspecto histológico e redução de colágeno.

Palavras-chave: Lesão músculo esquelética, Crioterapia, Ultrassom terapêutico, Análise Fractal, TNF- α , TGF- β 1.

Abstract

Muscle injuries are often caused due to the practice of sports and recreational activities. Because of its high incidence, it is important to research the treatments that promote quality in the muscle and shorter repair process. To evaluate the effect of the combination of the therapeutic resources of Cryotherapy and Therapeutic Ultrasound in the treatment of muscle damage by impact. 55 Wistar rats were separated into groups, Acute Injury (AI), Injury (I), Cryotherapy (CR), Therapeutic Ultrasound (TU), Cryotherapy and Therapeutic Ultrasound (CRTU). All animals were anesthetized and muscle damage due to impact by the release of a load of 200 g at 30 cm. Then received treatments as allocated group and CR protocol using ice bag for 20 minutes and TU for five minutes with an intensity of 0.5W / cm² and the frequency of 1MHz. Euthanasia was performed by intraperitoneal administration of overdose of Xylazine and Ketamine. The collection of the gastrocnemius muscle for the Body and Muscle mass analysis, histological analysis and fractal dimension of inflammation and collagen gene quantification of mRNA (TNF- α and TGF- β 1). Data analysis was performed using SPSS for Windows 22. The Shapiro-Wilk test to verify the normality of the data was performed. When data showed normal, we used t test for paired samples test and one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. When it violated the normality of the data, followed by the Kruskal- Wallis test with Dunn's post-test. For all analyzes was adopted the significance level of 5%. Among all groups, the CRTU lost less body and muscle mass, improved morphometry, besides presenting collagen reduction by DF compared to AI and CR ($p < 0.05$). With regard to the inflammatory process CRTU group showed a significant reduction of DF in relation to the AI groups ($p = 0.001$), I ($p = 0.001$) and CR ($p = 0.007$), and TU reduced the DF significantly relative to AI groups ($p = 0.001$), I ($p = 0.001$) and CR ($p = 0.036$). The reduction of TNF- α was significant in TU group compared with AI groups ($p = 0.008$); I ($p = 0.032$) and CR ($p = 0.046$) and TGF- β 1 in the CR group compared to AI ($p = 0.001$) and I ($p = 0.006$), in the TU group compared to AI ($p = 0.049$) and CRTU compared to AI ($p = 0.023$). The combination treatment was superior to the results presented by the isolated treatments in the muscle repair process. Observed by reducing the loss of body and muscle mass, improved histological appearance and reduction of collagen.

Keywords: Skeletal muscle injury, Cryotherapy, Therapeutic Ultrasound, Fractal Analysis, TNF- α , TGF- β 1.

As lesões nos tecidos moles ocorrem frequentemente durante a prática de atividades esportivas e recreativas. Desta forma, o tecido muscular esquelético está susceptível a lesões ocasionadas por distensão, contusão, laceração e microlesões com o rompimento das fibras do tecido muscular (Peterson and Renstrom 2002).

Cerca de 90% das lesões musculares decorrentes da prática esportiva ocorrem por contusão e estiramento (Järvinen, Järvinen, and Kalimo 2013). A característica de plasticidade do músculo esquelético promove o processo de reparação tecidual, que consiste em fases de degeneração, reparo e remodelamento (Botelho, Facio, and Minamoto 2007). Entretanto, a lesão muscular pode acarretar no afastamento das atividades do indivíduo, na perda de função muscular e fibrose (Botelho et al. 2007; Järvinen et al. 2013). Desta forma, o tratamento fisioterapêutico na recuperação torna-se de extrema importância para a recuperando da função e prevenir a ocorrência de fibroses.

A forma de tratamento comumente utilizada após o evento lesivo é dada pelo resfriamento local (crioterapia), sendo este um recurso de baixo custo e de fácil aplicabilidade. A crioterapia tem a capacidade de promover a vasoconstrição local, que atenua a disfunção microvascular e também diminui os danos oxidativos do sangue extravasado, não permitindo a infiltração de leucócitos (Carvalho et al. 2010; Takagi et al. 2011).

Ainda assim, outro recurso frequentemente utilizada para reparar as lesões é o Ultrassom Terapêutico (Burks et al. 2011; Vásquez et al. 2014), sendo sua indicação devida aos efeitos de redução do estresse oxidativo, da estimulação da produção de células miogênicas e fibras de colágeno (Markert et

al. 2005; Piedade et al. 2008), e da capacidade de potencialização do processo de regeneração das miofibras (Chan et al. 2010).

Sabendo que a crioterapia tem o efeito de diminuir a inflamação e que o ultrassom terapêutico promove o aumento da permeabilidade da membrana e o fluxo de fluidos circulantes, temos como hipótese de que estas técnicas utilizadas para a reabilitação promovem resultados semelhante ou superior quando associadas, e aplicadas no músculo de ratos submetidos a lesão por impacto. A investigação dos efeitos da associação desses tratamentos poderá servir de base para futuras pesquisas sobre a reparação de lesão muscular, e servir como um protocolo de tratamento eficaz para a aplicação clínica.

Diante do exposto, o presente modelo alternativo de dissertação compreende dois artigos elaborados no Laboratório de Histologia e Histoquímica da FCT/UNESP, Campus Presidente Prudente, sendo que os dois trabalhos analisaram os efeitos da crioterapia e ultrassom terapêutico na regeneração do tecido muscular após lesão por impacto, mas por diferentes análises.

Artigo Original

Análise Morfométrica e Fractal do tecido muscular lesionado submetido a combinação dos tratamentos de Crioterapia e Ultrassom Terapêutico.

Morphometric and Fractal analysis of injury skeletal muscle tissue subjected to combination of treatments Cryotherapy and Therapeutic Ultrasound.

Tatiana Emy Koike¹, Regina Celi Trindade Camargo¹, Guilherme Akio Tamura Ozaki²,
Robson Chacon Castoldi², Patrícia Monteiro Seraphim¹, Sérgio M Oikawa³, José CS
Camargo Filho¹.

¹ Faculdade de Ciências e Tecnologia, FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente. Departamento de Fisioterapia.

² Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

³ Faculdade de Ciências e Tecnologia, FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente. Departamento de Estatística.

Endereço para correspondência

Tatiana Emy Koike

Rua Roberto Simonsen, 305

19060-900 - P. Prudente, SP

Fone: (18) 3229- 5822

RESUMO

O objetivo do estudo foi analisar os efeitos da associação das técnicas de crioterapia e ultrassom terapêutico no tratamento de lesão muscular por impacto. 55 ratos foram divididos em cinco grupos (n=11), Lesão Aguda (LA), Lesão (L), Crioterapia (CR), Ultrassom Terapêutico (US) e Associação de crioterapia e ultrassom terapêutico (CRUS). Os grupos CR e CRUS receberam a aplicação do Protocolo de crioterapia em três momentos (imediatamente, 24 e 48 horas após a lesão), com duração de 20 minutos. Os grupos US e CRUS receberam a aplicação do Protocolo de Ultrassom terapêutico por sete dias, duração de cinco minutos por sessão, em modo pulsado, com intensidade de 0,5 W/cm² e frequência de 1 MHz. Foram realizadas as análises de massa corpórea e dos músculos gastrocnêmios, e foram confeccionadas as lâminas de Hematoxilina e Eosina para análise da morfometria, e Picrosírius para a análise de colágeno pela Dimensão Fractal (DF). Os resultados da análise intragrupos demonstrou menor perda de massa corpórea e muscular no grupo CRUS. Além disso, verificou-se menor valor da morfometria para o grupo CRUS em comparação aos grupos LA (p = 0,001), L (p = 0,001), CR (p = 0,001) e US (p = 0,001), e menor valor da DF para a quantidade de colágeno no grupo CRUS em comparação aos grupos LA (p = 0,007) e CR (p = 0,014). Em síntese, o presente estudo demonstrou que o protocolo com a associação das técnicas de crioterapia e ultrassom terapêutico promoveu respostas benéficas superiores nos aspectos analisados em comparação aos protocolos com os tratamentos aplicados isoladamente.

Palavras-chave: Fractal, Crioterapia, Ultrassom Terapêutico, Colágeno.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the effects of Association of technics by cryotherapy and therapeutic ultrasound in treatment of muscle injury by impact. Fifty-five rats wistar were divided in five groups (n = 11), Acute Injury (AI), Injury (I), Cryotherapy (CR), Therapeutic Ultrasound (TU) and Association of Cryotherapy and Therapeutic Ultrasound (CRTU). The CR and CRTU groups received the application of Protocol Cryotherapy for three times (immediately, 24 and 48 h after injury) duration of 20 minutes. The TU and CRTU groups received the application of Protocols Therapeutic Ultrasound for seven days, duration of five minutes, pulsed mode, 0,5w/cm intensity, 1MHz. They analyzed the body mass and the gastrocnemius muscles. Histological slides of the gastrocnemius muscle of the animals were prepared and stained with Hematoxylin and eosin for morphometric analysis and Picrosirius for the quantifications of collagen analysis by Fractal Dimension (FD). The results of intragroups analysis showed low body mass and the gastrocnemius in group CRTU in relation to the groups AI (p = 0,001), I (p = 0,001), CR (p = 0,001) e TU (p = 0,001), and low value of FD to quantify collagen in group CRTU in relation to the groups AI (p = 0,007) e CR (p = 0,014). In summary, the present study showed that Association Protocol by cryotherapy and Therapeutic Ultrasound promoted higher benefices in aspects analyzed in relation to the application of therapies isolated.

Keywords: Fractal, Regeneration, Cryotherapy, Ultrasound Therapy, Collagen.

INTRODUÇÃO

As lesões musculares frequentemente causam o afastamento das atividades físicas durante o período de reabilitação, sejam elas esportivas ou recreativas. A principal proposta do tratamento fisioterapêutico segue em atuar no processo de reparação diminuindo o quadro inflamatório, acelerando a reparação tecidual e inibindo a ocorrência de sequelas como a formação de fibrose (Mann et al. 2011).

A lesão muscular acarreta na ruptura das miofibras e dos vasos sanguíneos locais que promovem a invasão de leucócitos para a fagocitose das células degeneradas (Järvinen et al. 2013), além da produção e deposição de fibroblastos (Calvi et al. 2012). Entretanto, a deposição exacerbada de fibroblastos pode ocasionar na formação de tecido fibrótico no local da lesão prejudicando a reparação e função tecidual (Alves et al. 2014).

A crioterapia (CR) é uma técnica de baixo custo e fácil aplicabilidade que promove o resfriamento local dos tecidos e a vasoconstrição, diminuindo o metabolismo celular e limitando a extensão da inflamação no tecido muscular. Entretanto, seu efeito pode retardar a chegada dos leucócitos e prejudicar as etapas seguintes do processo de reparação tecidual que envolve a formação de novas miofibrilas e depósito de fibras de colágeno (Takagi et al. 2011).

As fibras de colágeno são importante pois dão origem a matriz extracelular e tem função estrutural de promover a ligação e alinhamento entre as fibras musculares (Calvi et al. 2012). Deste modo, estudos investigaram que a aplicação do Ultrassom terapêutico (US) melhora a organização das células e o alinhamento das fibras de colágeno quando aplicados no reparo da lesão muscular esquelética (Piedade et al. 2008).

Assim, o US em modo pulsado promove ondas ultrassônicas, que ao penetrarem no tecido, geram vibrações aumentando a permeabilidade da membrana celular e o intercâmbio de fluidos, que estimulam o metabolismo celular. Este efeito mecânico favorece o processo de resolução da inflamação, visto que com o aumento do metabolismo temos o aumento das atividades das plaquetas, mastócitos, macrófagos e neutrófilos quando o tecido está envolvido na fase inflamatória (Järvinen et al. 2013).

É de conhecimento decorrente de estudos da lesão muscular, que músculo esquelético responde imediatamente ao estímulo lesivo, e que aplicações de recursos terapêuticos promovem alterações beneficiando a resolução da inflamação e acelerando a regeneração de miofibrilas. Neste sentido, as intervenções terapêuticas de CR combinado ao US, no processo de reparação muscular podem influenciar nos eventos celulares de forma superior aos tratamentos aplicados isoladamente. Visto que, a crioterapia tem o efeito de retardar o processo inflamatório e o ultrassom de promover o aumento da permeabilidade da membrana celular estimulando o fluxo de fluídos circulante, reduzindo o edema local e acelerando a resolução da inflamação.

O presente estudo teve como objetivo analisar a reparação do tecido muscular lesado, frente à combinação dos tratamentos de crioterapia e ultrassom terapêutico, por meio de análise da massa corporal e muscular, medida do menor diâmetro das fibras e quantificação de colágeno pela dimensão fractal.

MATERIAIS E MÉTODO

Foram utilizados 55 ratos machos (*Norvegicus Wistar*), com quatro meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu-SP, e mantidos no biotério do Laboratório de Histologia e Histoquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - FCT/UNESP. Foram mantidos quatro animais por gaiola, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$), ciclo claro/escuro de 12 horas (7-19 h), acesso à água *ad libitum* e ração padrão para roedores (MP-77, Primor). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAs) da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente – SP, sob o Protocolo nº 01/2014.

- Grupos Experimentais

Para a montagem dos grupos experimentais foi realizado um delineamento em blocos casualizados. O delineamento foi realizado com o objetivo de reduzir o efeito do erro experimental ocasionado pelas variações biológicas dos animais, como a variação de peso que poderiam afetar a quantidade de energia absorvida proporcionado pelo mecanismo de lesão por impacto (Cristina and Nogueira 1956). Os animais apresentaram peso de 326 a 467 g, desta maneira foram separados em três grupos, sendo Peso I (n = 18): 326 ↔ 366 g, Peso II (n = 19): 367 ↔ 394 g e Peso III (n = 18): 395 ↔ 467 g. Os animais foram sorteados e alocados em cada grupo experimental de modo que cada grupo fosse composto pelo mesmo número de animais do Peso I, II e III (n = 11):

- *Lesão Aguda (LA)*: Submetidos ao protocolo de lesão muscular, permaneceram sem tratamento por dois dias.
- *Lesão (L)*: Submetidos ao protocolo de lesão muscular, permaneceram sem tratamento por sete dias.
- *Crioterapia (Cr)*: Submetidos ao protocolo de lesão muscular, seguido do protocolo de crioterapia.
- *Ultrassom Terapêutico (US)*: Submetidos ao protocolo de lesão muscular, seguido do protocolo de ultrassom terapêutico.
- *Crioterapia + Ultrassom Terapêutico (CrUS)*: Submetidos ao protocolo de lesão muscular, seguido da combinação dos protocolos de crioterapia e de ultrassom terapêutico.

Os animais do grupo LA foram eutanasiados no 3º dia, e os demais grupos no 8º dia após a lesão muscular por impacto (Figura 1).

***** Inserir Figura 1 *****

- Protocolo de lesão muscular por impacto

Foi utilizado o equipamento de lesão por impacto, seguindo especificações de Stratton, Heckmann e Francis (1984) (Figura 2A). Os animais foram anestesiados por combinação dos anestésicos ketamina (70 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), via intraperitoneal. Após a confirmação do plano, os animais foram posicionados no equipamento de lesão em decúbito ventral mantendo o membro pélvico posterior direito em extensão de joelho e tornozelo em 90° (Figura 2B). Em seguida, uma carga de 200 g foi liberada a 30 cm de altura diretamente no ventre do músculo gastrocnêmio, promovendo uma lesão por impacto sem ocasionar fratura.

***** Inserir Figura 2 *****

- Protocolo de crioterapia

A aplicação da CR foi realizada em três momentos: imediatamente após a lesão, 24 horas e 48 horas após o protocolo de lesão muscular por impacto, nos grupos CR e CRUS. Cada aplicação teve duração de 20 minutos (Takagi et al. 2011), realizados com os animais sob anestesia, e em decúbito dorsal. Foi confeccionado pequenos moldes com cartolina em formato cônico na medida do membro pélvico dos animais, e o saco plástico com água envolveu este molde de modo a ser congelado no formato da cartolina (Figura 3A). Deste modo, toda a extensão do membro pélvico do animal foi envolvida por gelo. O gelo foi fixado com fita adesiva sobre toda a extensão do membro posterior, da coxa até tornozelo (Figura 3B).

***** Inserir Figura 3 *****

- Protocolo de ultrassom terapêutico

Foi utilizado o aparelho AVATAR-V®, KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos LTDA devidamente calibrado para a pesquisa, com cabeçotes de área efetiva de radiação (ERA) de 1,0 cm². A aplicação foi realizada com os animais anestesiados e em sete sessões diárias consecutivas, com duração de cinco minutos, modo pulsado, intensidade de 0,5 W/cm² frequência de 1 MHz (Farcic et al. 2013). Foi utilizado gel hidrossolúvel como meio de contato, realizando movimentos circulares com o cabeçote, privilegiando a região do ventre muscular, local onde foi induzida a lesão muscular (Piedade et al. 2008).

- Protocolo de combinação dos tratamentos (Crioterapia + Ultrassom Terapêutico)

A combinação dos tratamentos foi realizada da mesma forma que os tratamentos citados anteriormente, com o gelo sendo aplicado primeiro seguido pela aplicação do ultrassom. Após os três dias de aplicação do gelo, prosseguiu-se apenas com o tratamento de ultrassom até o final do período experimental.

- Coleta do material

Foi coletado a massa corporal inicial e final (g). Após protocolos de tratamento os animais foram eutanasiados por overdose de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina, via intraperitoneal, para subsequente coleta e pesagem absoluta (g) dos músculos gastrocnêmios direito e esquerdo. Foi coletado a região medial do músculo gastrocnêmio do lado direito para posterior confecção das lâminas histológicas. Para as análises de Massa Corporal (MC), cada animal foi pesado antes ($MC_{Inicial}$) e ao final (MC_{Final}) do experimento. A mensuração da massa do músculo gastrocnêmio direito e esquerdo, de cada animal, foi realizado em balança de precisão para calcular o valor de Massa Relativa (M_{Rel}) (%) obtido pelo cálculo de $M_{Rel} = (M_{músculo} (g) / MC_{final}(g)) * 100$.

Foram confeccionadas lâminas histológicas dos músculos gastrocnêmio direito dos animais, com cortes transversais de $5\mu m$, e coradas pelo método hematoxilina-eosina (HE) (Ozaki et al. 2015). Com as lâminas prontas, foi realizada a análise do menor diâmetro das fibras musculares (μm). Para isso foram utilizados três campos (aumento de 100x), obtidos por meio do software *NIS-Elements*, conectado ao microscópio *Nikon 50i* acoplado à câmera fotográfica *Infinity 1*. As imagens computadorizadas foram utilizadas para a mensuração de 120 fibras por animal, Método adaptado de Camargo Filho (2011).

Para a análise quantitativa de tecido colágeno foi utilizado o método da Dimensão Fractal (DF) (Ozaki et al. 2015). As lâminas foram coradas pelo método Picrosirius Red e fotografadas por meio do microscópio de luz polarizada Leica DM 4000B acoplada a câmera Leica DFC500, com aumento de 100x (Ozaki et al. 2015), pertencente a Faculdade de Odontologia –FOA/UNESP, Campus Araçatuba – SP.

As imagens de Picrosirius passaram pelo processo de binarização tornando-as preto e branco. Com este processo o colágeno total tornou-se preto e o restante das células tornou-se branco (Figura 4). Este procedimento foi necessário, pois a análise da DF mensura a área em preto da imagem pelo método *box-counting*. As imagens do picrosirius apresentaram o colágeno, originalmente vermelho, verde e amarelo, em preto, e o restante da célula em branco (Ozaki et al. 2015). Por se tratar de um método para quantificar a irregularidade e complexidade da arquitetura histológica, pode fornecer resultados sem a interferência do avaliador, visto que se trata de uma análise automática realizada pelo *software*. Todos os procedimentos foram realizados no *Software ImageJ*, com a adição do plugin *Fractal Dimension and Lacunarity*, ambos disponíveis gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Ozaki et al. 2015).

***** Inserir Figura 4 *****

- Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS v.22 for Windows. Todos os dados passaram pelo teste de Shapiro-Wilk, verificando a

normalidade. Para análise intragrupo de massa corporal foi utilizado o teste T para amostras pareadas, e para as análises entre grupos e de dimensão fractal foi realizado o teste ANOVA One-way, seguido de pós- teste de Tukey. Os dados de diâmetro das fibras não demonstraram normalidade, desta forma seguiu-se com o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os animais submetidos ao protocolo de lesão muscular apresentaram perda da Massa Corporal ao final do experimento (Figura 5A). Para a análise de MC entre grupos foi realizado o cálculo do valor de delta, em que não foi encontrado diferença significativa entre os grupos.

Para a análise de MC intragrupos, foi observada a perda significativa de massa corporal ao final do experimento; sendo esta diferença estatisticamente significativa nos grupos LA e L (Figura 5A). Em relação aos grupos que receberam tratamento de CR, US e CRUS, não houve perda significativa de MC ao final do experimento.

Ao analisar a comparação de M_{Rel} observamos que todos os grupos experimentais apresentaram menor valor no lado com lesão. Esta diferença foi significativa nos grupos LA, L, CR e US com $p < 0,05$; e apenas o grupo CRUS foi capaz de reduzir as diferenças entre os lados (Figura 5B).

***** Inserir Figura 5 *****

A tabela 1 mostra o resultado da análise quantitativa das alterações histológicas observadas nas fibras musculares dos grupos estudados. A análise de medida do menor diâmetro das fibras demonstra diminuição das células musculares evidente no grupo CRUS e o aumento no grupo LA. O aumento significativamente o diâmetro das fibras foi observado para o grupo LA em comparação aos grupos L ($p = 0,001$), CR ($p = 0,001$), US ($p=0,001$) e CRUS ($p = 0,001$); para o grupo L em relação aos grupos CR ($p = 0,001$), US ($p = 0,002$) e CRUS ($p = 0,001$); para o grupo CR em relação aos grupos US ($p = 0,001$) e CRUS ($p = 0,001$); e para o grupo US em relação ao grupo CRUS ($p = 0,001$).

***** Inserir Tabela 1 *****

A análise de Dimensão Fractal do tecido de colágeno demonstrou que o grupo CRUS foi capaz de atenuar a quantidade de fibras colágenas no tecido muscular. O grupo CRUS reduziu o significativamente em comparação aos grupos LA ($p = 0,007$) e CR ($p = 0,014$) (Tabela 1).

DISCUSSÃO

O presente estudo verificou que todos os grupos experimentais reduziram a massa corporal ao final do experimento, porém esta perda não foi significativa nos grupos

tratamentos (CR, US e CRUS). Com relação a massa do músculo gastrocnêmio houve redução do lado lesionado para nos grupos LA, L, CR e US, sendo de maneira significativa. A medida de menor diâmetro das fibras apresentou diferença significativa entre todos os grupos. Mas dentre eles, o grupo CRUS apresentou o menor valor de diâmetro das fibras. Apesar de tanto o US quanto o CRUS serem capazes de reduzir a DF de colágeno, as análises de massa corporal, muscular e medidas morfométricas evidenciaram melhora no quadro de reparação tecidual quando os dois tratamentos foram combinados.

A perda de massa corporal observada em todos os grupos experimentais pode ser atribuído ao estresse ao qual os animais foram submetidos, o que pode ter interferido na dieta e/ou metabolismo dos mesmos (Botelho et al. 2007). Além disso, com exceção do grupo CRUS, os demais grupos experimentais demonstraram diminuição significativa de massa muscular no lado lesionado em comparação com o lado sem lesão. O que pode estar, pelo menos em parte, relacionado ao aumento de fatores pró-inflamatórios, podendo acarretar na proteólise.

A comparação intragrupos deste estudo demonstrou que todos os grupos perderam massa corporal ao final do experimento, entretanto não houve diferença entre os grupos. Utilizou-se o modelo experimental de lesão por impacto já comprovado em pesquisas (Martins et al. 2015), como sendo capaz de promover o aumento do processo inflamatório. Desta maneira, o aumento de inflamação local pode ter relação com a perda de massa corporal e de massa muscular nos animais lesionados. Pois, segundo Li et al., (2001) o aumento da inflamação pode mediar a perda de proteínas musculares, como observado em miócitos expostos a citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α). Provavelmente, na presente pesquisa, a combinação dos tratamentos promoveu redução do quadro inflamatório, observado pela menor perda de massa corporal e muscular, e na redução do diâmetro das fibras.

A avaliação histológica baseia-se na morfologia das células, tamanho, posição de núcleo, presença de infiltrado inflamatório, necrose, hiperplasia e/ou displasia (Camargo Filho et al. 2011). Pela análise morfométrica, os grupos LA, L, CR e US demonstraram maiores valores de diâmetro das fibras. Desta forma sugere-se que o processo inflamatório pode ter provocado edema no citoplasma (Abbas, Kumar, and Fausto 2010), caracterizando no aumento da secção transversa das células musculares. Os resultados deste estudo demonstraram que todos os tratamentos reduziram o diâmetro das fibras, mas que a combinação das técnicas de crioterapia e ultrassom terapêutico potencializou esta redução (42,04 μ m), possivelmente por atenuar a inflamação.

A análise Fractal demonstrou que os animais que receberam a aplicação de ultrassom terapêutico e a combinação dos tratamentos, demonstraram redução da quantidade de colágeno. Essa análise quantificou o colágeno tipo I, II e III correspondente às áreas em vermelho, amarelo e verde. Portanto o resultado da análise corresponde ao colágeno total do tecido muscular (Ozaki et al. 2015).

No presente estudo, observou-se que o grupo CR apresentou aumento de colágeno em comparação ao grupo CRUS. Este resultado foi observado em estudo de Takagi et al. (2011), que analisou a influência da crioterapia em lesão muscular. Conclui-se que a aplicação em até 28 dias após a lesão retarda a migração de macrófagos dificultando o processo de regeneração. Além disso, a aplicação de crioterapia pode ter induzido o depósito de colágeno ao redor das fibras musculares em regeneração por aumentar a produção de TGF- β 1.

Já a aplicação de Ultrassom terapêutico atuou no processo de reparação promovendo a redução do diâmetro das fibras em relação aos grupos LA, L e CR, além de reduzir a quantidade de colágeno. O ultrassom terapêutico auxilia na reparação das lesões musculares e altera as atividades de leucócitos, neutrófilos, macrófagos envolvidos na fase inflamatória, acelerando o processo de reparação muscular, principalmente por meio dos efeitos mecânicos (Burks et al. 2011). Desta forma, sua atuação é caracterizada pelo aumento da síntese de células precursoras miogênicas e proliferação de fibroblastos (Piedade et al. 2008). Desta forma, a utilização do ultrassom terapêutico foi eficaz para atenuar a inflamação tecidual.

No local da lesão ocorre o estímulo à produção de colágeno para reestruturar a matriz extracelular, contribuindo para a formação de tecido de cicatriz. Esta resposta é inicialmente benéfica pois protege o local da lesão. No entanto, a exacerbação na produção de colágeno no interior da área lesionada prejudica a função muscular, provoca quadro algico, além de tornar o músculo mais susceptível a lesões recidivantes e perda da função muscular (fibrose) (Ciciliot and Schiaffino 2010). Estudos demonstram que por volta de sete dias após a lesão muscular ocorre o aumento de colágeno nesse tecido, e que o aumento e acúmulo de colágeno pode ser prognóstico de fibrose após a total reparação tecidual (Alves et al. 2014).

Assim, torna-se importante analisar e compreender os efeitos dos tratamentos aplicados na reparação muscular, tanto em aspectos histológicos quanto nos aspectos de produção de fibras colágenas. Análises que proporcionam a quantificação da proporção relativa de colágeno nos músculos lesionados e tratados, podem ajudar fisioterapeutas e médicos para determinar o tratamento adequado, contribuindo para a melhor reparação de lesões musculares (Calvi et al. 2012).

Os resultados encontrados na presente pesquisa demonstram a superioridade do protocolo de combinação dos tratamentos em acelerar a reparação muscular pela redução do processo de inflamatório, e prevenir a formação de fibrose por reduzir a quantidade de colágeno no sítio da lesão muscular. A redução do processo inflamatório foi observada em estudo de Matins et al., (2015), que compararam as técnicas de crioterapia, ultrassom terapêutico, e a associação das técnicas em lesão muscular. Demonstrando que a associação da crioterapia com ultrassom terapêutico em tecido muscular lesionado foi superior em relação aos tratamentos aplicados individualmente, visto que promoveu a

redução de marcadores inflamatórios plasmático e conseqüentemente acelerou a resolução do processo inflamatório.

Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos sobre a combinação dos tratamentos na reparação histológica e influência sobre a produção de colágeno. Os resultados encontrados nesta pesquisa apontam que a crioterapia combinada com o ultrassom terapêutico beneficia o processo de reparação tecidual em até sete dias após a lesão, reduzindo as chances de fibrose.

Algumas limitações deste estudo devem ser apontadas, como a falta de um grupo controle (sem nenhuma intervenção), e não foi possível discutir a variável massa corpórea visto que o presente estudo priorizou analisar as alterações no tecido muscular lesionado. Apesar de utilizar o método de delineamento em blocos casualizados para reduzir o erro experimental biológico, pode existir a variação no local de lesão muscular, visto que os animais apresentam variações na posição anatômica dos músculos.

Sugere-se para futuros estudos, analisar a quantidade e organização do colágeno em tecido muscular lesionado por impacto, assim como quantificar os diferentes tipos de colágeno (I, II e III) Ainda, realizar estudo com delineamento longitudinal a fim de investigar diferentes fases do processo de reparação. Estudos referentes a este tema poderão fornecer subsídios para desenvolver um protocolo de tratamento mais eficaz, estendendo-se tanto para pesquisadores quanto para clínicos que atuam na área da saúde e com lesões musculares.

Conclui-se que a combinação dos tratamentos, em até sete dias, mostrou-se superior em relação aos tratamentos isolados de crioterapia e ultrassom terapêutico, promovendo a redução da perda de massa corporal e muscular, além de diminuir o aumento citoplasmático e a quantidade de colágeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, Abul K., Vinay Kumar, and Nelson Fausto. 2010. *Robbins & Cotran - Patologia, Bases Patológicas Das Doenças*.
- Alves, AN; Fernandes, KPS; Melo, CAV; Yamaguchi, RY; França, CM; Teixeira, DF; Bussadori, SK; Nunes, FD; Mesquita-Ferrari, RA. 2014. "Modulating Effect of Low Level-Laser Therapy on Fibrosis in the Repair Process of the Tibialis Anterior Muscle in Rats." *Lasers in Medical Science* 29(2):813–21.
- Botelho, AP, Facio, FA, and Minamoto, VB. 2007. "Regeneração Do Músculo Tibial Anterior Em Diferentes Períodos Após Lesão Por Estimulação Elétrica Neuromuscular." *Revista Brasileira de Fisioterapia* 11(2):99–104.
- Burks, SR; Ziadloo, A; Hancock, HA; Chaudhry, A; Dean, DD; Lewis, BK; Frenke, V; Frank, JA. 2011. "Investigation of Cellular and Molecular Responses to Pulsed Focused Ultrasound in a Mouse Model." *PloS one* 6(9):e24730.
- Calvi, ENC; Nahas, FX, Barbosa, MV; Calil, JÁ; Ihara, SSM; Silva, MSS; Franco, MF; Ferreira, LM. 2012. "An Experimental Model for the Study of Collagen Fibers in Skeletal Muscle."

Acta Cirurgica Brasileira 27(10):681–86.

- Camargo Filho, JCS; Garcia, BC; Kodama, FY; Bonfim, MR; Vanderlei, LCM; Ramos, EMC; Camargo, RCT; Padulla, SAT; Maeda, JK. 2011. “Efeitos Do Exercício Aeróbio No Músculo Esquelético de Ratos Expostos à Fumaça de Cigarro.” *Rev Bras Med Esporte* 17(6):416–19.
- Cristina, M and Stolf, N. 1956. “Delineamento Em Blocos Casualizados Completos Aumentados.” *An. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz* 35:225–41.
- Farcic, TS; Baldan, CS; Cattapan, CG; Parizotto, NA; João, SMA; Casarotto, RA. 2013. “Treatment Time of Ultrasound Therapy Interferes with the Organization of Collagen Fibers in Rat Tendons.” *Brazilian journal of physical therapy* 17(3):263–71.
- Järvinen, TAH; Järvinen, M and Kalimo, H. 2013. “Regeneration of Injured Skeletal Muscle after the Injury.” *Muscles, ligaments and Tendons Journal* 3(4):337–45.
- Li, YP; Schwartz, RJ. 2001. “TNF- α Regulates Early Differentiation of C2C12 Myoblasts in an Autocrine Fashion.” *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 15(8):1413-5.
- Mann, CJ; Perdiguero, E; Kharraz, Y; Aguilar, S; Pessina, P; Serrano, AL; Muñoz-Cánoves, P. 2011. “Aberrant Repair and Fibrosis Development in Skeletal Muscle.” *Skeletal Muscle* 1(1): 21.
- Martins, CN; Moraes, MB; Hauck, M; Guerreiro, LF; Rossato, DD; Varela, AS; da Rosa, CE; Signori, LU. 2015. “Effects of Cryotherapy Combined with Therapeutic Ultrasound on Oxidative Stress and Tissue Damage after Musculoskeletal Contusion in Rats.” *Physiotherapy* xxx(xxx):xxx.
- Ozaki, GAT; Camargo, RCT; Koike, TE; Garcia, TA; Castoldi, RC; Filho, JCS. 2015. “Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats Subjected to Stretch Injury.” *International Journal Morphology* 33(3):908–13.
- Piedade, MCB; Galhardo, MS; Battlehner, CN; Ferreira, MA; Caldini, EG; de Toledo, OMS. 2008. “Effect of Ultrasound Therapy on the Repair of Gastrocnemius Muscle Injury in Rats.” *Ultrasonics* 48:403–11.
- Stratton, AS; Heckmann, R and Francis, RS. 1984. “Therapeutic Ultrasound: Its Effects on the Integrity of a Nonpenetrating Wound*.” *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy* 5(5):278–81.
- Takagi, R; Fujita, N; Arakawa, T; Kawada, S; Ishii, N; Miki, A. 2011. “Influence of Icing on Muscle Regeneration after Crush Injury to Skeletal Muscles in Rats.” *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 110(2):382–88.

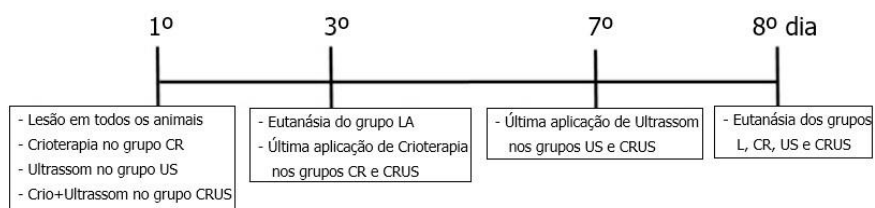
FIGURA 1**Figura 1:** Procedimentos experimentais em dias decorridos.

FIGURA 2

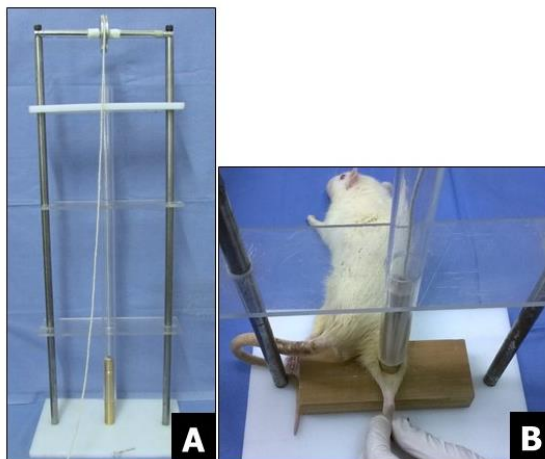


Figura 2: A) Equipamento para protocolo de lesão muscular por impacto com duas hastes metálicas de 60 cm na vertical, base plástica com área de 272,5cm², estrutura metálica que suporta a roldana e fio ligado a massa de 200g a ser liberada. B) Posicionamento do membro pélvico posterior direito em extensão de joelho e dorsiflexão de tornozelo, para a liberação da carga no ventre do músculo gastrocnêmio dos animais.

FIGURA 3



Figura 3: A) Pequenos sacos plásticos confeccionados em formato cônico para moldar o membro pélvico posterior dos animais. B) Aplicação do protocolo de crioterapia.

FIGURA 4

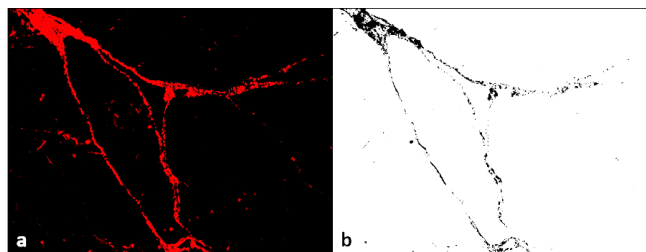


Figura 4: Imagem do músculo gastrocnêmio do grupo CR corada pelo método Picrosirius (Aumento de 100x). a) Lâmina fotografada em microscópio de luz polarizada evidenciando o colágeno em vermelho. b) Imagem após o processo de binarização tornou o colágeno em preto e o restante da célula em branco, realizado para a mensuração da Df.

FIGURA 5

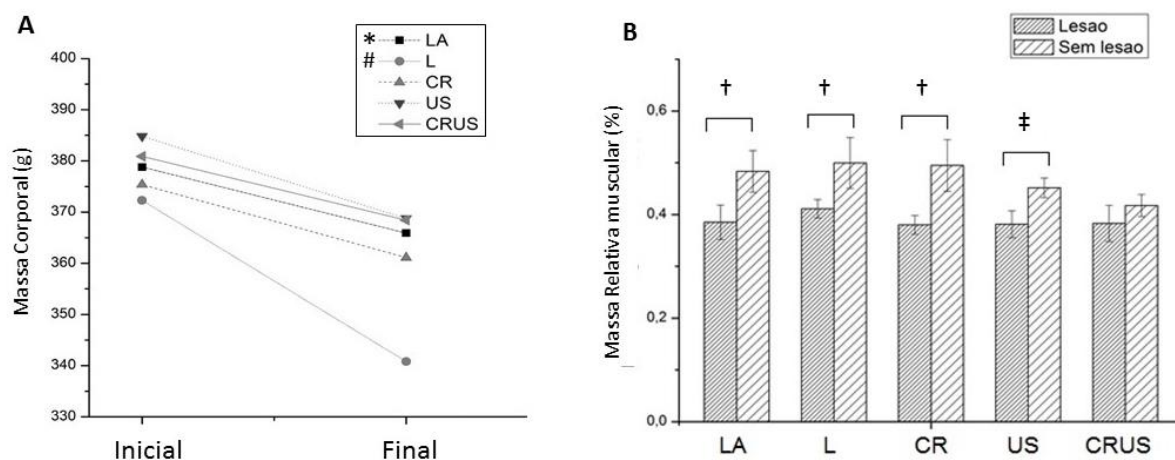


Figura 5: **A)** Gráfico representativo da evolução do $MC_{Inicial}$ e MC_{Final} . Valores expressos em média por grupo (g). * Diferença significativa entre valor inicial e final ($p = 0,007$); # Diferença significativa entre valor inicial e final ($p = 0,003$). **B)** Valores de média e desvio padrão de M_{Rel} . † Diferença significativa em comparação ao lado sem lesão ($p = 0,001$); ‡ Diferença significativa em comparação ao lado sem lesão ($p = 0,007$).

TABELA 1

Tabela 1. Valores do menor Diâmetro das fibras (μm) e Dimensão Fractal de colágeno.

Grupos	Diâmetro das fibras	Dimensão Fractal
LA	$53,64 \pm 9,02$ *	$1,26 \pm 0,13$ #
L	$46,70 \pm 7,25$ *	$1,21 \pm 0,05$
CR	$50,98 \pm 10,62$ *	$1,26 \pm 0,10$ #
US	$44,64 \pm 8,28$ *	$1,15 \pm 0,02$
CRUS	$42,04 \pm 7,47$ *	$1,09 \pm 0,05$

Valores em médias e desvios padrão do Diâmetro das fibras e da Dimensão Fractal. * diferença significativa em relação a todos os grupos ($p < 0,05$), # diferença significativa em relação do grupo CRUS ($p < 0,05$).

Título:

Efeitos da associação de crioterapia e ultrassom terapêutico na reparação da lesão muscular: morfologia, dimensão fractal e expressão gênica de TNF- α , TGF- β 1.

Autores:

1. Tatiana Emy Koike, Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCT-UNESP) – Presidente Prudente (SP), Brasil, email: tatikoike@yahoo.com
2. Regina Celi Trindade Camargo, Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCT-UNESP) – Presidente Prudente (SP), Brasil, email: rcamargo@fct.unesp.br
3. Guilherme Akio Tamura Ozaki, Departamento de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – Campinas (SP), Brasil, email: guiozaki@hotmail.com
4. Robson Chacon Castoldi, Departamento de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – Campinas (SP), Brasil, email: castoldi_rc@yahoo.com.br
5. Patrícia Monteiro Seraphim, Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCT-UNESP) – Presidente Prudente (SP), Brazil, email: patricia@fct.unesp.br
6. José Carlos Silva Camargo Filho, Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCT-UNESP) – Presidente Prudente (SP), Brasil, email: camargo@fct.unesp.br

Correspondência:

Tatiana Emy Koike

Departamento de Fisioterapia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCT-UNESP), Presidente Prudente (SP), Brazil

Tel: (18) 99141-7441

Email: tatikoike@yahoo.com

Título abreviado: Associação da Crioterapia e Ultrassom Terapêutico na reparação muscular.

Palavras chaves: Regeneração, Crioterapia, Ultrassom Terapêutico, Musculo esquelético, Ratos, Reabilitação.

Aprovação do Comitê de Ética: O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAs) da Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNESP, Campus de Presidente Prudente – SP, sob o Protocolo nº 01/2014.

Conflito de interesse: Todos os autores confirmam não haver conflito de interesse neste estudo.

Agradecimentos: Ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI "Santo Paschoal Crepaldi", Campus de Presidente Prudente/SP.

RESUMO

Questionamento: A associação dos tratamentos de Crioterapia e Ultrassom Terapêutico maximizam seus efeitos promovendo melhora no processo de reparo muscular?

Objetivo: Analisar os efeitos da associação da Crioterapia e do Ultrassom Terapêutico na reparação muscular de ratos.

Desenho do estudo: Experimental, controlado

Amostra: Ratos machos Wistar (n=55).

Intervenção: Os animais foram separados em grupos Lesão Aguda (LA), Lesão (L), Crioterapia (CR), Ultrassom terapêutico (US) e Associação de crioterapia + ultrassom terapêutico (CRUS), subsequentemente foram submetidos à lesão por impacto no músculo gastrocnêmio. O grupo CR recebeu crioterapia imediatamente, 24 e 48 h após a lesão (20 min/sessão); o grupo US recebeu Ultrassom Terapêutico pulsado por sete sessões (5 min/sessão), intensidade de 0,5 W/cm² e frequência de 1 MHz; e o grupo CRUS recebeu os dois tratamentos.

Mensurações: A análise morfológica e de dimensão fractal (DF) se deu pela coloração de Hematoxilina e eosina (HE) e, a análise de expressão gênica de TNF- α e TGF- β 1 pelo método RT-PCR. Foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pelo ANOVA One-Way seguido de pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos (p<0,05).

Resultados: O grupo CRUS melhorou a organização das miofibras, do endomísio, do perimísio e dos espaços intersticiais, e reduziu infiltrado inflamatório. Ademais, o grupo CRUS apresentou redução significativa da DF em relação aos grupos LA (p = 0,001), L (p = 0,001) e CR (p = 0,007), e o US reduziu a DF significativamente em relação aos grupos LA (p = 0,001), L (p = 0,001) e CR (p = 0,036). A redução de TNF- α foi significativa no grupo US comparado com grupos LA (p = 0,008); L (p = 0,032) e CR (p = 0,046), e TGF- β 1 no grupo CR em comparação aos LA (p = 0,001) e L (p = 0,006), no grupo US em comparação ao LA (p = 0,049), e CRUS em comparação aos LA (p = 0,023).

Conclusão: A associação dos tratamentos apresentou melhores resultados do que os tratamentos isolados no processo de reparação muscular, evidente por diminuições de infiltrado inflamatório e de DF, assim como na melhora da organização de miofibras, endomísio, perimísio e espaços intersticiais.

Palavras-chave: Regeneração, Crioterapia, Ultrassom Terapêutico, Músculo esquelético, Ratos, Reabilitação.

ABSTRACT

Question: The Cryotherapy and Therapeutic Ultrasound treatments can enhance their effects when combined?

Objective: Analyze the effects of the combination of cryotherapy and Therapeutic Ultrasound in repair of muscle 'rats.

Design: Experimental, controlled study.

Setting: Animal laboratory. Animals: Male Wistar rats (n=55)

Interventions: The animals were separated into groups acute Injury (LA), Injury (L), cryotherapy (CR), therapeutic ultrasound (US) and association of cryotherapy + therapeutic ultrasound (CRUS), subsequently were subjected to contusion injury in the gastrocnemius muscle. The CR group received cryotherapy immediately, 24 and 48 hours after injury (20 min/session); the US group received pulsed Therapeutic Ultrasound for seven sessions (5 minutes/session), with intensity of 0.5 W/cm², frequency of 1 MHz; and CRUS group received both treatments.

Outcome measures: Morphological and fractal dimension (FD) analysis was performed by hematoxylin and eosin (HE) staining and analysis of gene expression of TNF- α and TGF- β 1 by RT-PCR method. The Shapiro-Wilk normality test was used followed by one-way ANOVA and Tukey's post-test for comparison between groups ($p < 0.05$).

Results: The CRUS group improves the organization of myofibrils, endomysium, perimysium and the interstitial spaces, and was able to reduced inflammatory infiltrate. Moreover, the CRUS group showed a significant reduction of DF in relation to the groups LA ($p = 0.001$), L ($p = 0.001$) and CR ($p = 0.007$); and US group reduced the DF significantly relative to groups LA ($p = 0.001$), L ($p = 0.001$) and CR ($p = 0.036$). The reduction of TNF- α was significant in US group compared with groups LA ($p = 0.008$), L ($p = 0.032$) and CR ($p = 0.046$); and TGF- β 1 reduced in the CR group compared to LA ($p = 0.001$) and L ($p = 0.006$); in the US group reduced compared to LA ($p = 0.049$) and CRUS compared to LA ($p = 0.023$).

Conclusion: The association of treatments showed better results than isolated treatments in the muscle repair process, by the decreasing inflammatory infiltrate, and DF, as well as in improving myofibres organization, endomysium, perimysium and interstitial spaces.

Key Words: *Regeneration, Cryotherapy, Ultrasound Therapy, Muscle, skeletal; Rats, Rehabilitation*

INTRODUÇÃO

Cerca de 90% das lesões musculares decorrentes da prática esportiva ocorrem por contusão e estiramento¹. O músculo esquelético é capaz de reparar o tecido lesionado, mas este processo pode ser lento e acarretar no afastamento das atividades, na perda de função tecidual e sequelas como a fibrose².

A destruição das miofibrilas, bem como o aumento local da vascularização, promovem o estresse oxidativo que acarreta na necrose das células, assim como a invasão de neutrófilos e macrófagos quimioatraentes de citocinas e fatores de crescimento no sítio da lesão coordenando o processo de reparação tecidual³. Este processo libera citocinas como o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), e Fatores de Crescimento como o de transformação do crescimento beta 1 (TGF- β 1)⁴ que irão promover a miogênese, proliferação de fibras colágenas e podem determinar o resultado final do processo de reparação⁵.

Neste contexto, a fisioterapia pode atenuar os danos limitando a área afetada pelo hematoma e inflamação excessiva, assim como acentuar o processo de reparação^{4,6,7}. As intervenções não farmacológicas, como crioterapia (CR) e ultrassom terapêutico (US) são frequentemente utilizadas nestes casos, com o objetivo de, reduzir o tempo de recuperação, e melhorar a qualidade tecidual, possibilitando antecipar o retorno às atividades físicas.

O tratamento com crioterapia (CR) promove a absorção de calor no local aplicado, diminuindo a temperatura dos tecidos. Os principais efeitos benéficos do frio durante a recuperação são: analgesia, vasoconstrição, diminuição do metabolismo, da inflamação e da dor. Por sua fácil aplicabilidade e baixo custo, é frequentemente utilizada imediatamente após lesões, visto que atenua a disfunção microvascular e diminui os danos oxidativos do sangue extravasado, diminuindo a adesão e infiltração de leucócitos⁸.

O ultrassom terapêutico (US) é utilizado no tratamento de lesões de tecidos mole, como a reparação de feridas dérmicas, a fim de reduzir edemas e promover a cicatrização⁹. Sua aplicação é frequentemente em modo pulsado⁶, por promover efeitos não térmicos no tecido como a cavitação e pequenas vibrações, que promovem alterações de pressão aumentando a permeabilidade celular e o fluxo do fluido circulante¹⁰. Assim, é capaz de acentuar a síntese de proteínas contráteis derivadas de células satélites de miofibras, estimular o alinhamento das

fibras de colágeno, favorecendo a formação e organização de novas miofibras, e a redução da área lesada ¹¹.

Existem poucas evidências científicas sobre os benefícios do uso de crioterapia em combinação ao ultrassom terapêutico. Espera-se que os achados da presente pesquisa possibilite a criação de uma nova estratégia de reabilitação, potencializando os efeitos benéficos dos tratamentos a fim de promover melhora da organização das miofibras, espaços intersticiais, perimísio e endomísio; redução de infiltrado inflamatório ¹², caracterizando melhor resposta no processo de reparação muscular.

Desta forma, o objetivo desse estudo foi analisar os aspectos morfológicos, quantificar o infiltrado inflamatório por meio da análise de Dimensão Fractal (DF) e os efeitos na modulação dos níveis de Expressão Gênica de proteínas (TNF- α e TGF- β 1) no músculo gastrocnêmio lesionado e tratado com a combinação de crioterapia e ultrassom terapêutico.

MÉTODO

Delineamento Experimental

Foram utilizados 55 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), com quatro meses de idade (120 dias), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu-SP, e mantidos no biotério do Laboratório de Histologia e Histoquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - FCT/UNESP. Os animais permaneceram acondicionados em gaiolas coletivas com quatro animais cada, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$), ciclo claro/escuro de 12 horas (7-19 h) e acesso irrestrito à água e ração padrão para roedores (MP-77, Primor). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAs) da Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNESP, Campus de Presidente Prudente – SP, sob o Protocolo nº 01/2014.

- Grupos experimentais

Com a finalidade de reduzir o efeito do erro experimental ocasionado pelas variações biológicas dos animais, que poderiam afetar a quantidade de energia absorvida e intensidade de resposta à lesão, foi realizado o Delineamento em Blocos Casualizados por diferença de peso entre os animais ¹³, em que foram separados em três grupos, sendo Peso I (menor peso), Peso

II (peso médio) e Peso III (maior peso). Logo após, os animais que compuseram o Peso I foram randomizados dentro de cada grupo experimental, seguido do Peso II e Peso III (Figura 1).

Desta maneira, os animais foram separados dentro de cinco grupos experimentais (n=11): Lesão Aguda (LA), Lesão (L), Crioterapia (CR), Ultrassom Terapêutico (US) e Crioterapia + Ultrassom Terapêutico (CRUS). Todos foram submetidos ao protocolo de lesão muscular por impacto no membro posterior direito e aos protocolos de tratamento conforme organograma do delineamento experimental (Figura 1).

***** Inserir Figura 1 *****

Após as intervenções, foram coletadas amostras do músculo gastrocnêmio direito, a fim de realizar análises morfológicas e de dimensão fractal, além de 0,1 g do tecido muscular para análise de expressão gênica. Todos os procedimentos (intervenções e análises) seguem descritos nas seções seguintes.

Intervenções

- Protocolo de Lesão muscular por impacto

Foi utilizado o equipamento de Lesão muscular por impacto conforme proposto inicialmente por Stratton, Heckmann e Francis (1984), elaborado pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI "Santo Paschoal Crepaldi", Campus de Presidente Prudente/SP (Figura 2A).

Os animais receberam dose intraperitoneal de ketamina (70 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) ¹⁵ e após a confirmação do plano anestésico, foram posicionados no equipamento em decúbito ventral, padronizando o membro pélvico posterior direito com extensão das articulações coxofemoral e joelho, e tornozelo em posição neutra a 90°. Em seguida foi realizada uma única contusão pela liberação da carga de 200 g (Figura 2C), a 30 cm de altura de modo a produzir uma força de impacto no ventre muscular ¹⁶.

***** Inserir Figura 2*****

- Protocolo de crioterapia

A aplicação da CR foi realizada em três momentos: imediatamente após a lesão, 24 horas e 48 horas após o protocolo de lesão muscular por impacto, nos grupos CR e CRUS. Cada aplicação teve duração de 20 minutos⁸, realizados com os animais sob anestesia, e em decúbito dorsal. Foi confeccionado pequenos moldes com cartolina em formato cônico na medida do membro pélvico dos animais, e o saco plástico com água envolveu este molde de modo a ser congelado no formato da cartolina. Deste modo, toda a extensão do membro pélvico do animal foi envolvida por gelo (Figura 2B). O gelo foi fixado com fita adesiva sobre toda a extensão do membro posterior, da coxa até tornozelo.

- Protocolo de Ultrassom Terapêutico

Foi utilizado o aparelho AVATAR-V®, KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos LTDA, com cabeçotes de área efetiva de radiação (ERA) de 1,0 cm². A aplicação foi realizada em sessões diárias, por sete dias consecutivos, com duração de cinco minutos, modo pulsado, intensidade de 0,5 W/cm² frequência de 1 MHz⁶. Foi utilizado gel hidrossolúvel como meio de contato, realizando movimentos circulares com o cabeçote, privilegiando a região do ventre muscular, local onde foi induzida a lesão muscular¹⁷.

- Protocolo de associação dos tratamentos (Crioterapia + Ultrassom Terapêutico)

A associação dos tratamentos foi realizada da mesma forma que os tratamentos citados anteriormente, com o gelo sendo aplicado primeiro seguido pela aplicação do ultrassom¹⁸. Após as três aplicações do gelo + ultrassom, prosseguiu-se apenas com o tratamento de ultrassom até o final do período experimental.

Análises

- Coleta do material

Após eutanásia dos animais, por *overdose* de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina via intraperitoneal¹⁹, o músculo gastrocnêmio foi retirado do membro pélvico direito. Foi coletado 0,1 g de tecido muscular para análise da expressão gênica do RNAm (TNF- α e TGF- β 1), e em seguida o restante da amostra muscular foi congelada pelo sistema de imersão em N-Hexana resfriada a -80°C, e armazenados em Ultra-freezer (Coldlab CL580-80V) a -80°C¹². Foi realizada a microtomia em micrótomo criostato (HM 505 E Microm, Alemanha) seguindo-se as técnicas e cuidados adequados¹⁵.

- *Morfologia*

Foi coletado a região medial do músculo gastrocnêmio do lado direito para posterior confecção das lâminas histológicas com cortes transversais de 5 µm e coradas pelo método Hematoxilina-Eosina (HE), sendo utilizadas para avaliação qualitativa dos aspectos morfológicos: posicionamento do núcleo, infiltrado inflamatório, espaço intersticial e organização das fibras musculares, observadas por meio da utilização do Software NISElements D3.0 - SP7 - Nikon®¹⁵.

- *Dimensão Fractal*

As imagens de HE passaram pelo processo de binarização, tornando-as preto e branco. Desta forma, as imagens apresentaram o núcleo celular branco com o restante da célula preta, e, para que fosse realizada a quantificação de infiltrado inflamatório pela análise fractal, foi aplicada a inversão de cores, tornando o núcleo preto e o restante da célula branco. Esse procedimento foi necessário, pois a análise fractal mensura a área em preto da imagem. Posteriormente a análise de Dimensão Fractal (Df) foi realizada pelo método *box-counting*. Todos os procedimentos foram realizados no *Software ImageJ*, com a adição do plugin *Fractal Dimension and Lacunarity*, ambos disponíveis gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)¹².

- *Expressão Gênica de TNF-α e TGF-β1*

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) foi utilizada para analisar o RNAm do Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) e Fator de Transformação do Crescimento (TGF-β1) do músculo gastrocnêmico homogeneizado (OMNI TH – USA/Lodan) e isolado com TRI® Reagent - RNA Isolation Reagent (Sigma-Aldrich®), seguindo as recomendações do fabricante. Após a determinação da concentração total do RNA das amostras, foi realizado a Transcrição Reversa para a síntese de uma fita de DNA (cDNA) complementar ao mRNA. Em seguida, foi realizado a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos genes TNF-α (sense 5' – TGT GGC TCA GGG TCC AAC TC – 3'; antisense 5' TGA GCA GAG CAG CCT GAT CC 3'), da TGF-β1 (sense 5' - CCC CTG GAA AGG GCT CAA CAC-3'; antisense 5' TCC AAC CCA GGT CCT TCC TAA AGT C -3'), foram submetidas à amplificação em 24 µl de um “mix” contendo 5,0 µl de tampão 10x Taq Polimerase (Prodinol), 0,5 µl de cada dNTP 10 mM, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,125 µl da enzima Taq DNA Polimerase

[5U/ μ l] (Promega, USA) e 15,875 μ l de água Mili-Q autoclavada. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose – EtBr e visualizados com iluminação UV (Kodak Molecular Imaging Software Version 4.0, 2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc). Para a análise densitométrica foi utilizado o *software* Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA). As expressões do mRNA de TNF- α e TGF- β 1 foram normalizadas pela expressão do gene Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH sense 5' – CCT GGT ATG ACA ATG AAT AGG – 3'; antisense 5' – TCT CTT GCT CTC AGT ATC CT – 3').

- Estatística

A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS- versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, United States of America). A verificação da normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e, uma vez constatada a normalidade dos dados prosseguiu-se para a análise da diferença entre os grupos, por meio do teste de variância, ANOVA-One Way, seguido de pós-teste de Tukey. O nível de significância utilizado para todas as análises foi de 5%.

RESULTADOS

A análise histológica evidenciou as alterações no aspecto estrutural promovidas pela lesão e a resposta tecidual frente aos tratamentos de CR, US e CRUS. O grupo LA apresentou alteração acentuada no aspecto estrutural caracterizado por citoplasma edemaciado, intenso e extenso processo inflamatório, desorganização das miofibras e aumento do espaço intersticial, do endomísio e perimísio (Figura 3a). O mesmo padrão, porém com menor intensidade, foi observado no grupo L que não recebeu tratamento (Figura 3b).

Diante dos tratamentos utilizados, o tecido muscular dos grupos CR e US apresentou presença de infiltrado inflamatório, além da desorganização tecidual (Figura 3c), entretanto pode-se observar o aumento de células com núcleos centralizados e periféricos no grupo US, caracterizando formação de novas miofibras (Figura 3d). Entretanto no grupo CRUS foi observado aspecto organizado das miofibras, do endomísio, perimísio e do espaço intersticial, com poucos focos de infiltrado inflamatório (Figura 3e).

***** Inserir Figura 3 *****

Os achados histológicos foram quantificados por meio da Dimensão Fractal, obtido pelo método *box-counting*. O valor de DF quantifica as irregularidades na imagem por método de *box-counting*, e desta forma o maior o valor de fractal é diretamente proporcional ao aumento de irregularidades na imagem, caracterizado pela presença de infiltrado inflamatório. O grupo CRUS apresentou menor valor de Df em relação a todos os grupos experimentais, sendo esta diferença significativa em relação aos grupos LA ($p = 0,001$), L ($p = 0,001$) e CR ($p = 0,007$). O grupo US, também reduziu DF sendo esta diferença significativa em comparação aos grupos LA ($p = 0,001$), L ($p = 0,001$) e CR ($p = 0,036$) (Figura 4).

***** Inserir Figura 4 *****

Na figura 5 estão ilustrados os valores densitométricos em unidades arbitrárias (UA) referentes à expressão de RNAm de TNF- α e TGF- β 1 no músculo gastrocnêmio. O grupo US apresentou redução significativa de TNF- α em relação aos grupos LA ($p = 0,008$); L ($p = 0,032$) e CR ($p = 0,046$). Com relação ao TGF- β 1, este apresentou redução significativa do grupo CRUS em comparação com o grupo LA ($p = 0,023$); do grupo US com o LA ($p = 0,049$); e do CR com LA ($p = 0,001$) e L ($p = 0,006$).

***** Inserir Figura 5 *****

DISCUSSÃO

Verificou-se que os grupos LA e L apresentaram maiores alterações na morfologia, aumento da quantidade de infiltrado inflamatório e de TNF- α e TGF- β 1, em comparação aos grupos tratamento. O grupo US apresentou redução significativa dos níveis de TNF- α em comparação aos demais grupos. O grupo CR reduziu significativamente os níveis de TGF- β 1 em relação aos grupos LA e L; e os grupos US e CRUS reduziram significativamente os níveis de TGF- β 1 em relação ao grupo L.

A análise histológica dos grupos LA (após dois dias) e L (após sete dias da lesão) demonstraram alterações morfológicas promovidas pelo mecanismo de lesão por impacto, como o acentuado infiltrado inflamatório, necrose celular e desorganização das miofibras. A atenuação desses aspectos foi observada nos grupos que receberam tratamento de CR, US e CRUS.

Sabemos que a lesão muscular promove alterações estruturais, principalmente em decorrência do processo inflamatório, da ruptura do sarcolema e dos vasos sanguíneos^{20,21}. A invasão de neutrófilos e macrófagos no sítio da lesão fagocitam o tecido em necrose. Este processo libera enzimas digestivas e podem danificar os tecidos adjacentes saudáveis⁵. Neste sentido, há a preocupação em modular o processo inflamatório a fim de evitar danos às estruturas saudáveis⁷.

Em nosso estudo, a crioterapia não melhorou a morfologia e não reduziu o processo inflamatório e TNF- α , porém promoveu a diminuição de TGF- β 1. A técnica de crioterapia vem sendo aplicada em estudos^{18,22,23} no intuito de reduzir o processo inflamatório em lesões musculares. Entretanto, um estudo que utilizou os tratamentos de crioterapia, laser e diclofenaco demonstrou que a crioterapia foi ineficaz em reduzir os níveis de fatores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, e TNF- α quando aplicado 1 hora após a lesão⁴.

Por outro lado, a crioterapia acarreta em vasoconstrição e diminuição do metabolismo celular. Este efeito retarda a migração de macrófagos no sítio da lesão e inibir a expressão de fatores de crescimento como o TGF- β 1 e IGF-1, podendo prejudicar o processo de reparação tecidual⁸. Deste modo, a aplicação da crioterapia pode ter dificultado a reparação do tecido do grupo CR.

Neste estudo, as características de infiltrado inflamatório leve e presença de fibras com núcleo centralizado foram observadas no grupo US, caracterizando o processo de reparação celular²³. Além disso, dentre os tratamentos aplicados, observamos que o grupo US promoveu a diminuição significativa de TNF- α em comparação aos grupos LA, L e CR. Atualmente o US é estudado na redução de inflamação em tecidos moles lesionados, promovendo a regeneração e sendo considerado como potencial recurso clínico capaz de otimizar o tempo de cicatrização de tecidos lesionados²⁴.

A pressão das ondas ultrassônicas movimentam grandes quantidades de fluido, e promovem a redução dos leucócitos totais e das espécies reativas de oxigênio¹⁸. Além disso, pode reduzir a inflamação por prevenir a ativação do NF-kB e consequentemente inibir a produção de TNF- α ²⁴. Em síntese, sabe-se que os fatores pró – inflamatórios provocam a degradação da proteína I κ B, e que esta transloca o complexo NF-kB para o núcleo onde se liga para transcrever genes de caráter pró- inflamatório²⁵. Deste modo, o US pode ter atuado na inibição desta via reduzindo TNF- α .

Além de reduzir o tempo de afastamento do indivíduo às atividades físicas, outro desafio para os tratamentos da lesão muscular é o de prevenir ao máximo a formação de fibrose. Este estudo demonstrou que a aplicação US isolado foi ineficaz para reduzir os níveis de TGF- β 1. Este resultado sugere o aumento de fibroblastos no tecido muscular destes animais, visto que o TGF- β 1 é o principal estimulador do processo de fibrose por induzir células miogênicas a se diferenciarem em miofibroblastos em músculo lesado²⁶. Neste contexto, torna-se importante a modulação dos mediadores inflamatórios, como os TNF- α e TGF- β 1, que podem induzir a degeneração de células saudáveis e fibrose²⁷.

O efeito da combinação dos tratamentos ocasionou na melhora da organização do tecido muscular caracterizando um estágio mais avançado de reparação, além da diminuição significativa da quantidade de infiltrado inflamatório. Deste modo, a combinação dos tratamentos promoveu efeitos favoráveis sinérgicos na reparação muscular. A redução do processo inflamatório também foi observado em estudo de Martins et al.,¹⁸ que verificaram que o tratamento combinado (crio + US) promoveu redução de marcadores plasmáticos de lesão, em comparação as terapias isoladas de gelo e ultrassom terapêutico.

Os grupos US e CRUS apresentaram a redução do valor de DF caracterizando a redução de processo inflamatório no tecido muscular. Podemos destacar os resultados encontrados por esta análise por quantificar os aspectos morfológicos com relação ao processo inflamatório, visto que é um método de análise independente do avaliador, uma vez que o software realiza automaticamente as quantificações²⁸.

Na presente pesquisa as amostras foram coletadas após dois e sete dias da lesão sem tratamento, e os valores de DF em LA (1,157) e L (1,143) em comparação aos grupos US (1,021) e CRUS (1,012) demonstram que os tratamentos reduziram o processo inflamatório. Em estudo de Ozaki, et al.¹², utilizaram um grupo controle (sem nenhuma intervenção) composto por ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com as mesmas características dos animais utilizados neste estudo. Este grupo controle apresentou o valor de DF = 0,77. Considerando este resultado, podemos concluir que o grupo CRUS apresentou-se mais eficaz para atenuar a exacerbação da inflamação.

As últimas fases de recuperação envolvem a regeneração da fibra muscular, formação e remodelação do tecido da cicatriz, angiogênese e recuperação da função muscular²⁹. Desta forma, ao interferir em qualquer um deles, pode-se alterar a progressão de reparação natural do

músculo esquelético³⁰. Após sete dias da lesão muscular, a associação dos tratamentos fortaleceu os efeitos benéficos das terapias isoladas estimulando o processo de reparação muscular.

O presente estudo se limitou a não utilizar um grupo controle (sem nenhuma intervenção). O grupo controle poderia identificar o quanto os tratamentos foram eficazes em relação a um tecido sem lesão. Apesar de utilizar o método de delineamento em blocos casualizados para reduzir o erro experimental biológico e de padronizar a posição do membro posterior, pode existir a variação no local de lesão muscular por impacto, visto que os animais apresentam variações na posição anatômica dos músculos.

Sugere-se quantificar o colágeno, fatores de crescimento (VEGF) e fatores de regulação miogênica (MyoD e Miogenina) relacionadas ao processo de reparação muscular, bem como analisar diferentes tempos de tratamento (3, 7, 14, 21 dias) a fim de observar a reparação completa e comprovar os efeitos dos tratamentos de crioterapia, ultrassom e associação a longo prazo. A perspectiva é que este estudo sirva como base para novas pesquisas e futuramente como método para a aplicação dos tratamentos em seres humanos tanto em clínicas de reabilitação quanto durante a prática de esportes, afim de promover melhor qualidade de recuperação tecidual e menor tempo de afastamento dos indivíduos.

Conclui-se que os tratamentos aplicados de Ultrassom terapêutico e a associação da Crioterapia com Ultrassom Terapêutico foram efetivos na reparação estrutural do tecido muscular. Ainda assim, ficou evidente que a utilização dos tratamentos associados (CRUS) favoreceu o processo de reparação pela diminuição de DF, assim como pela melhora dos aspectos histológicos.

REFERÊNCIAS

1. Järvinen T a H, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33(5):745-764. doi:10.1177/0363546505274714.
2. Hammers DW, Rybalko V, Merscham-banda M, Hsieh P, Suggs LJ, Farrar RP. Anti-inflammatory macrophages improve skeletal muscle recovery from ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol.* 2015;118(8):1067-1074. doi:10.1152/jappphysiol.00313.2014.
3. Pillon NJ, Bilan PJ, Fink LN, Klip A. Cross-talk between skeletal muscle and immune cells : muscle-derived mediators and metabolic implications. *Am J Physiol Endocrinol*

- Metab.* 2013;304(1):E453-E465. doi:10.1152/ajpendo.00553.2012.
4. Almeida P De, Tomazoni SS, Frigo L, et al. What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: low-level laser therapy, diclofenac, or cryotherapy? *Lasers Med Sci.* 2014;29(2):653-658. doi:10.1007/s10103-013-1377-3.
 5. Tidball JG, Wehling-henricks M. Shifts in macrophage cytokine production drive muscle fibrosis. *Nat Publ Gr.* 2015;21(7):665-666. doi:10.1038/nm.3896.
 6. Farcic TS, Baldan CS, Cattapan CG, Parizotto N a, João SM a, Casarotto R a. Treatment time of ultrasound therapy interferes with the organization of collagen fibers in rat tendons. *Brazilian J Phys Ther.* 2013;17(3):263-271.
 7. Souza J De, Gottfried C. Muscle injury : Review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol.* 2013;23(6):1253-1260. doi:10.1016/j.jelekin.2013.07.009.
 8. Takagi R, Fujita N, Arakawa T, Kawada S, Ishii N, Miki A. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J Appl Physiol.* 2011;110(2):382-388. doi:10.1152/jappphysiol.01187.2010.
 9. Bertolini GRF, Silva TS da, Ciena AP, Artifon EL. Comparação do ultrassom pulsado e contínuo no reparo tendíneo de ratos Comparison of pulsed and continuous ultrasound on tendon repair in rats. *Fisioter e Pesqui.* 2012;19(3):242-247.
 10. Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB. The role of ultrasound-induced cavitation in the ' in vitro ' stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. 1980;(January):33-37.
 11. Rennó ACM, Toma RL, Feitosa SM, 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. doi:10.1089/pho.2009.2715.
 12. Ozaki GAT, Camargo RCT, Koike TE, Garcia TA, Castoldi RC, Filho JCSC. Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats Subjected to Stretch Injury. *Int J Morphol.* 2015;33(3):908-913.
 13. Cristina M, Nogueira S. Delineamento em blocos casualizados completos aumentados. *An Esc Super Agric Luiz Queiroz.* 1956;35:225-241. doi:dx.doi.org/10.1590/S0071-12761978000100012.
 14. Stratton SA, Heckmann R, Francis RS. Therapeutic Ultrasound: Its Effects on the Integrity of a Nonpenetrating Wound*. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1984;5(5):278-281. doi:10.2519/jospt.1984.5.5.278.
 15. Camargo FJCS, Garcia; BC, Kodama FY, et al. Efeitos do Exercício Aeróbio no Músculo Esquelético de Ratos Expostos à Fumaça de Cigarro. *Rev Bras Med Esporte.* 2011;17(6):416-419.
 16. Minamoto V, Salvini T. Long-term regeneration of rat skeletal muscle after periodic contusions. *Rev bras fisioter, São Carlos.* 2002;6(3):147-154.

17. Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, Toledo OMS de. Effect of ultrasound therapy on the repair of Gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics*. 2008;48:403-411. doi:10.1016/j.ultras.2008.01.009.
18. Martins CN, Moraes MB, Hauck M, et al. Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats. *Physiotherapy*. 2015. doi:10.1016/j.physio.2015.10.013.
19. Camargo Filho JCS, Garcia BC, Kodama FY, et al. Effects of Aerobic Exercise on the Skeletal Muscle of Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Rev Bras Med do Esporte*. 2011;17(6):416-419. doi:10.1590/S1517-86922011000600010.
20. Quintero AJ, Wright VJ, Fu FH, Huard J. Stem Cells for the Treatment of Skeletal Muscle Injury. *Clin Sports Med*. 2009;28(1):1-11. doi:10.1016/j.csm.2008.08.009.
21. Grefte S, Kuijpers-jagtman AM, Torensma R, Von Den Hoff JW. Concise Review - Skeletal Muscle Development and Regeneration. *Stem Cells Dev*. 2007;16(5):857-868. doi:10.1089/scd.2007.0058.
22. Crystal NJ, Townson DH, Cook SB, Laroche DP. Effect of cryotherapy on muscle recovery and inflammation following a bout of damaging exercise. 2013:2577-2586. doi:10.1007/s00421-013-2693-9.
23. Vieira Ramos G, Pinheiro CM, Messa SP, et al. Cryotherapy Reduces Inflammatory Response Without Altering Muscle Regeneration Process and Extracellular Matrix Remodeling of Rat Muscle. *Sci Rep*. 2016;6(November 2015):18525. doi:10.1038/srep18525.
24. Sato M, Kuroda S, Mansjur KQ, et al. Low-intensity pulsed ultrasound rescues insufficient salivary secretion in autoimmune sialadenitis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:1-12. doi:10.1186/s13075-015-0798-8.
25. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor-kB - A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *N Engl J Med*. 1997;336(April 10):1066-1077.
26. Li Y, Foster W, Deasy BM, et al. Transforming Growth Factor- β 1 Induces the Differentiation of Myogenic Cells into Fibrotic Cells in Injured Skeletal Muscle. *Am J Pathol*. 2004;164(3):1007-1019. doi:10.1016/S0002-9440(10)63188-4.
27. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização : uma revisão. *Brazilian J Pharm Sci*. 2005;41(1):27-51.
28. Moreira RD, Moriel AR, Murta Junior LO, Neves LA, Godoy MF de. Dimensão fractal na quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco transplantation. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2011;26(2):155-163.
29. Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musarò A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev*. 2011;10(1):35-42. doi:10.1016/j.arr.2009.08.001.
30. Rizzi R, Bearzi C, Mauretti A, Bernardini S, Cannata S, Gargioli C. Tissue engineering for skeletal muscle regeneration. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2012;2(2):230-234.

FIGURA 1

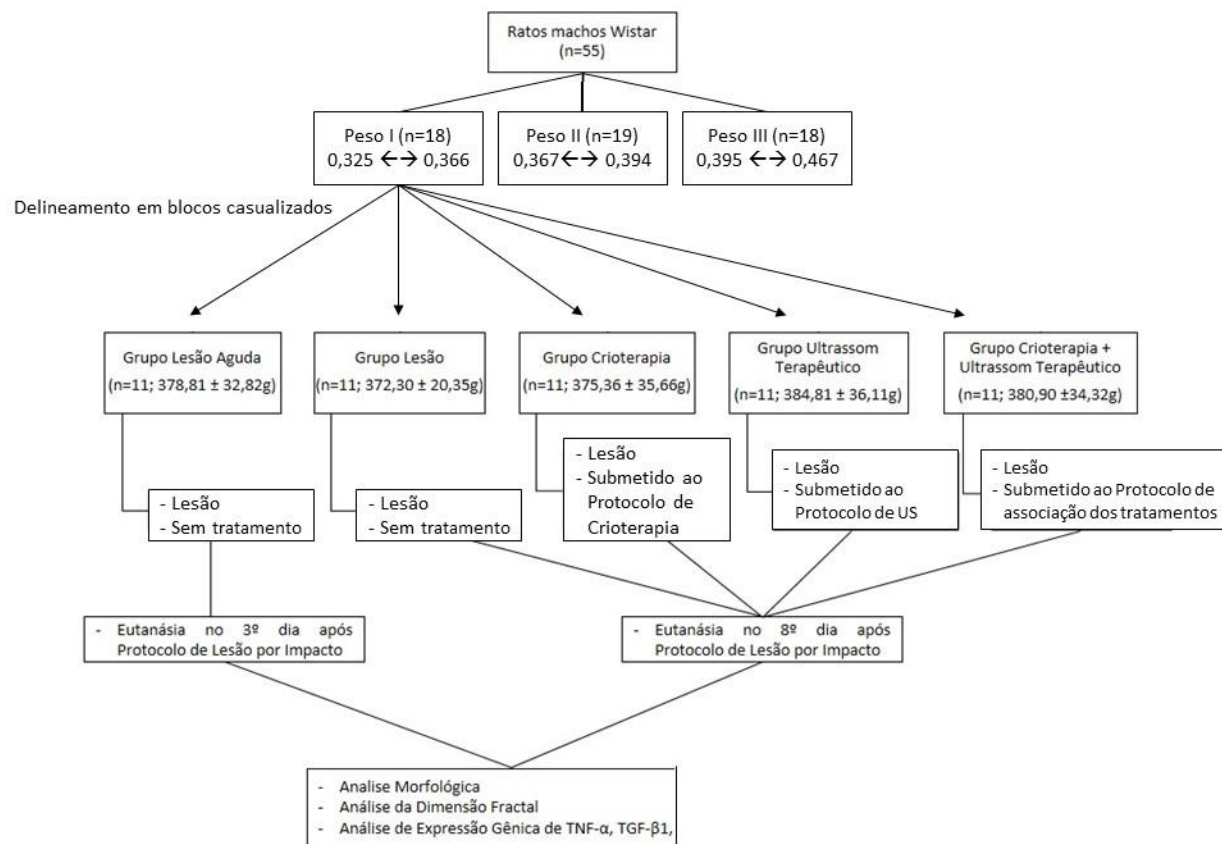


Figura 1: Organograma do delineamento experimental e grupos.

FIGURA 2

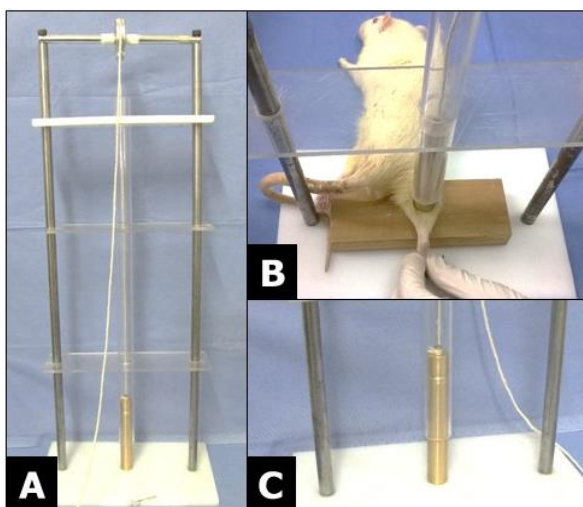


Figura 2. **A:** Equipamento para protocolo de lesão muscular por impacto composto por duas hastas metálicas de 60 cm na vertical, três suportes de acrílico transversais, roldana no centro superior, tubo de acrílico de 50 cm ao centro e carga de 200g presa ao fio. **B:** Posicionamento do animal com membro pélvico posterior em extensão de joelho e tornozelo, durante a queda do peso à 30 cm de altura. **C:** Peso de 200 g.

FIGURA 3

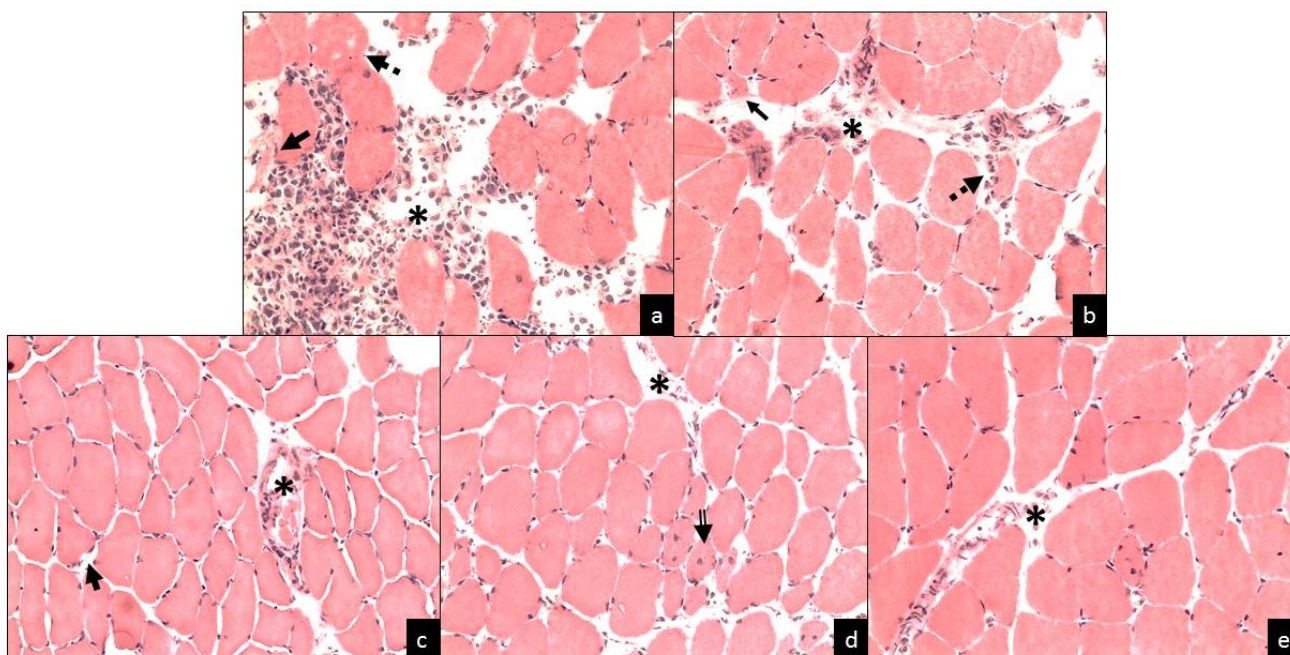


Figura 3: Secção transversa do músculo gastrocnêmio corado com HE. (*) Infiltrado inflamatório; (↑) Ruptura de sarcolema; (seta pontilhada) Necrose; (seta dupla) Núcleo centralizado. **a) LA:** alteração da arquitetura por infiltrado inflamatório acentuado; miofibras em necrose e citoplasma edemaciado; desorganização e aumento do espaço intersticial, do endomísio e perimísio. **b) L:** infiltrado inflamatório acentuado; acentuada necrose das miofibras, desorganização celular e aumento do espaço intersticial, do endomísio e perimísio. **c) CR:** infiltrado inflamatório moderado, desorganização e ruptura de sarcolema das miofibras, aumento do espaço intersticial, do endomísio e perimísio. **d) US:** infiltrado inflamatório leve, presença de miofibras com núcleo centralizado, desorganização das miofibras, espaço intersticial, endomísio e perimísio. **e) CRUS:** infiltrado inflamatório leve, miofibras com sarcolema preservados, melhora da organização de perimísio, endomísio e espaços intersticiais. (Aumento de 200x).

FIGURA 4

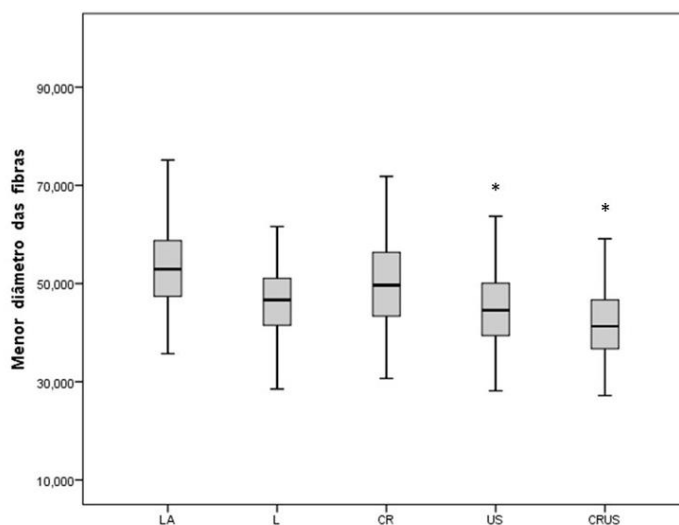


Figura 4: Valores da análise de Dimensão Fractal (Df). * $p < 0,05$ em relação a US e CRUS.

FIGURA 5

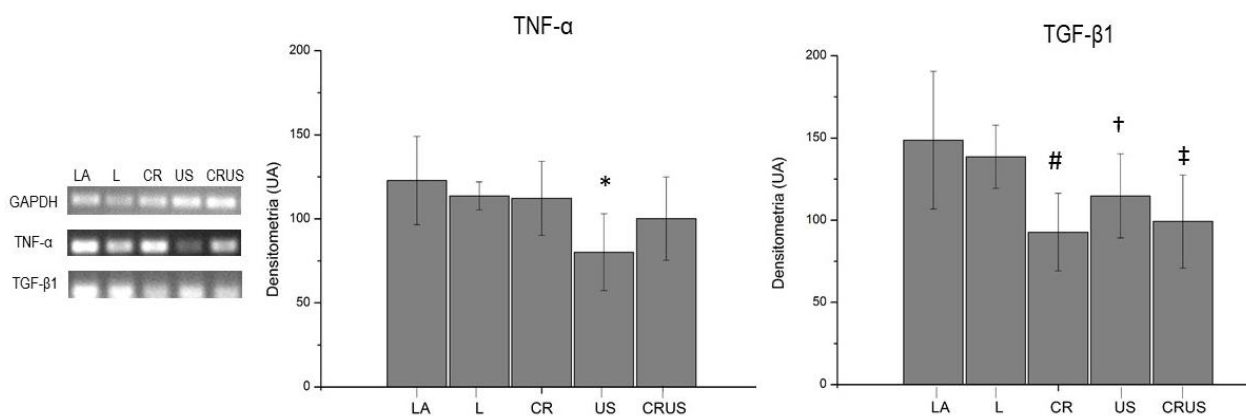


Figura 5. Gráfico representativo do conteúdo de RNAm de TNF- α e TGF- β 1 normalizados por GAPDH, obtidos em ensaios de RT-PCR no tecido muscular gastrocnêmio. Valores de média e desvio padrão expressos em unidades arbitrárias (UA). * Diferença significativa em comparação com LA ($p = 0,008$), L ($p = 0,032$) e CR ($p = 0,046$); # Diferença significativa em comparação com LA ($p = 0,001$) e L ($p = 0,006$); † Diferença significativa em comparação com LA ($p = 0,049$); ‡ Diferença significativa em comparação com LA ($p = 0,023$).

Considerações finais

Os artigos compilados nessa dissertação demonstraram o efeito da associação dos tratamentos de crioterapia e ultrassom terapêutico na lesão muscular.

No primeiro estudo, mesmo para os animais que receberam tratamento, todos perderam peso corporal e muscular. Entretanto, a combinação da crioterapia + ultrassom terapêutico foi superior em melhorar o aspecto morfométrico, reduzir a perda de peso corporal e muscular, e a quantidade de colágeno.

Em relação ao segundo estudo, os animais submetidos a associação dos tratamentos melhoram os aspectos histológicos, com redução do processo inflamatório durante o período experimental. Porém, a associação dos tratamentos não promoveu a redução significativa dos níveis de TNF- α , mas foi capaz de ocasionar redução significativa de TGF- β 1 em comparação ao grupo LA.

Diante dos resultados apresentados, nota-se a necessidade de estudos, que avaliem um maior período experimental, a fim de investigar o momento em que ocorrem as modificações decorrentes da aplicação dos tratamentos, assim como identificar seus efeitos. Além disso, com relação dos efeitos dos tratamentos associados na lesão muscular, torna-se importante investigar mais especificamente marcadores genéticos (VEGF, MyoD e Miogenina) relacionados ao processo de reparação.

Referências Bibliográficas

BOTELHO, A.; FACIO, F.; MINAMOTO, V. Regeneração do músculo tibial anterior em diferentes períodos após lesão por estimulação elétrica neuromuscular. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 2, p. 99–104, 2007.

BURKS, S. R.; ZIADLOO, A.; HANCOCK, H. A; et al. Investigation of cellular and molecular responses to pulsed focused ultrasound in a mouse model. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24730, 2011.

CARVALHO, N.; PUNTEL, G.; CORREA, P.; et al. Protective effects of therapeutic cold and heat against the oxidative damage induced by a muscle strain injury in rats. **Journal of sports sciences**, v. 28, n. 9, p. 923–35, 2010.

CHAN, Y.-S.; HSU, K.-Y.; KUO, C.-H.; et al. Using low-intensity pulsed ultrasound to improve muscle healing after laceration injury: an in vitro and in vivo study. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 36, n. 5, p. 743–51, 2010.

JÄRVINEN, T.; JÄRVINEN, M.; KALIMO, H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. **Muscles, ligaments and Tendons Journal**, v. 3, n. 4, p. 337–345, 2013.

MARKERT, C. D.; MERRICK, M. A.; KIRBY, T. E.; DEVOR, S. T. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 86, n. 7, p. 1304–10, 2005.

PETERSON, L.; RENSTROM, P. **Lesões do esporte: prevenção e tratamento**. Manole, 2002.

PIEIDADE, M. C. B.; GALHARDO, M. S.; BATTLEHNER, C. N.; et al. Effect of ultrasound therapy on the repair of Gastrocnemius muscle injury in rats. **Ultrasonics**, v. 48, p. 403–411, 2008.

TAKAGI, R.; FUJITA, N.; ARAKAWA, T.; et al. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 110, n. 2, p. 382–8, 2011.

VÁSQUEZ, B.; NAVARRETE, J.; FARFÁN, E.; CANTÍN, M. Effect of pulsed and continuous therapeutic ultrasound on healthy skeletal muscle in rats. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 2, p. 779–83, 2014.