

AÇÃO DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.

FABIANE REGINA FAGANELLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência da Motricidade (Área de concentração em Biodinâmica da Motricidade Humana).

RIO CLARO – SP
Brasil 2003

AÇÃO DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.

FABIANE REGINA FAGANELLO

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO P. SANTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência da Motricidade (Área de concentração em Biodinâmica da Motricidade Humana).

RIO CLARO – SP
Brasil 2003

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido e amigo Flávio pela ajuda paciência e carinho;
A meus pais pelas oportunidades e exemplo;
Aos meus irmãos por tudo que representam para mim;
E principalmente a Deus, pela vida e pelos dons.*

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Francisco P. Santi e Dr. Carlos A. Anaruma, pelas orientações e aconselhamento, participação e apoio.

Aos Professores do Departamento de Biologia, pelo empréstimo de equipamentos imprescindíveis para a realização do trabalho. Aos técnicos e funcionários do Departamento de Biodinâmica pela cooperação.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 – Profundidade média de duas frequências, 1MHz e 3MHz, em diversos tecidos do corpo, no ar e na água.

Tabela 2 – Coeficiente de absorção (α) em diferentes tecidos para frequência de 1Mhz (adaptado de WELLS, 1977).

Figura 1 – Fotomicrografia do músculo tibial anterior de animal normal (grupo F), sem lesão muscular experimental e sem aplicação de ultra-som. Fibras musculares bem definidas e núcleos periféricos. Endomísio discreto e presença de micro-lesões e algum infiltrado leucocitário (seta amarela) e áreas de hiper-contração (seta branca). H/E. Barra = 110 μ m.

Figura 2 - Fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animal do grupo C1, músculo normal submetido à aplicação de ultra-som contínuo a 0,2 W/cm². Nota-se a acentuação de micro-lesões (seta amarela) e maior infiltrado leucocitário (seta preta). Áreas de hiper-contração evidentes (seta vermelha), fibras sofrendo fagocitose (seta azul) e núcleos centralizados (seta branca). H/E. Barra=175 μ m.

Figura 3 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de animal do grupo E1, que sofreu lesão muscular, mas não foi submetido à aplicação de ultra-som. Verifica-se área de necrose muscular (seta amarela) em meio ao infiltrado inflamatório (seta vermelha) e restos de fibras musculares (seta branca). H/E. Barra=175 μ m.

Figura 4 - Fotomicrografia de músculo tibial anterior de animal do grupo A1, que sofreu lesão muscular experimental e foi submetido ao ultra-som contínuo a $0,2\text{W}/\text{cm}^2$ (A e B) e grupo B1 submetido ao ultra-som contínuo a $0,4\text{W}/\text{cm}^2$ (C e D). Verifica-se em ambos os casos avançado processo de fagocitose dos restos de fibras musculares (seta amarela) com reduzidas áreas necróticas e formação de rede de fibrina (seta vermelha) com estruturas semelhantes a leitos vasculares (seta azul). O infiltrado leucocitário (seta preta) apresenta-se discretamente reduzido em D em relação a B. Observa-se ainda que os restos de fibras musculares fagocitadas (seta amarela) são mais visíveis em A que em C. A- H/E - Barra= $175\mu\text{m}$. –B- H/E Barra= $110\mu\text{m}$. – C- Tricômico de Masson Barra= $175\mu\text{m}$. –D –H/E Barra= $110\mu\text{m}$.

Figura 5 - Fotomicrografia de músculo tibial anterior de animal do grupo B1. Observam-se neutrófilos (seta branca), e macrófagos (seta amarela). É possível verificar a presença de fibroblastos (seta vermelha) e mioblastos (seta verde). H/E Barra = $27\mu\text{m}$.

Figura 6 - Fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animal do grupo E3, lesado sem aplicação de ultra-som. Verifica-se o predomínio de neutrófilos aderidos a rede de fibrina na região mais interna da lesão (seta preta), além de macrófagos (seta vermelha) e raros plasmócitos (seta amarela). H/E. Barra= $27\mu\text{m}$.

Figura 7 - Fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animais do grupo E3, lesados e não submetidos ao ultra-som. Nota-se o predomínio de polimorfonucleares contornando o sítio da lesão (seta amarela) e restos de fibras musculares sendo fagocitadas (seta vermelha) em

meio à rede de fibrina (seta preta). É possível notar a presença de mioblastos (seta verde). H/E. Barra=175µm.

Figura 8 - Fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animais dos grupos C3 e D3, submetidos ao ultra-som sem lesão experimental. Presença de micro-lesões (seta preta) com discreto infiltrado (seta amarela), fibroblastos (seta azul) e células satélites ativadas (seta branca). H/E. Barra=27µm.

Figura 9 - Em A, B e C observa-se fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animais do grupo A3. Nota-se a grande concentração de mioblastos (seta vermelha) e fibroblastos (seta amarela) e a presença de miotubos (seta preta) iniciando a regeneração muscular. Em D, E e F observa-se fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animais do grupo B3, onde se nota além da concentração de mioblastos (seta vermelha), fibroblastos (seta amarela) e formação de miotubos (seta azul), grande concentração de vasos neoformados (seta verde). A - Tricômico de Masson. Barra=70µm. B - H/E. Barra=70µm. C - H/E. Barra=27µm. D - Tricômico de Masson. Barra=175µm. E - H/E. Barra=110µm. F - H/E. Barra=27µm.

Figura 10 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo E7. Grande concentração de fibroblastos (seta amarela) em tecido conjuntivo mais desenvolvido (seta vermelha). Concentração de células satélites nas extremidades das fibras musculares (seta preta). H/E. Barra=175µm.

Figura 11 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo A7. Grande concentração de células nas extremidades das fibras lesadas (seta amarela) para favorecer a formação de miotubos (seta verde). Aumento do número de fibroblastos (seta branca). H/E. Barra = 175µm.

Figura 12 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo A7. Em maiores aumentos é possível verificar a grande concentração de mioblastos (seta preta) e em B células satélites ativadas (seta verde) H/E. Barra 11 ∞m.

Figura 13 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo A7. Em A nota-se a formação de miotubos pela agregação de mioblastos (seta vermelha), grande concentração de fibroblastos (seta verde) e miotubos já formados com vários núcleos enfileirados (seta amarela). Em B é evidente a grande concentração de fibroblastos (seta verde) e mioblastos enfileirados na tentativa de constituir miotubos (seta branca). Em ambos os casos é notável o aumento do número de fibroblastos. A- H/E Barra=70µm. B - H/E Barra=175µm.

Figura 14 – Fotomicrografia de corte oblíquo de músculo tibial anterior de animais do grupo B7. Concentração de células nas extremidades (seta amarela), estruturas que se assemelham a leitos vasculares (seta verde) e formação de miotubos (seta vermelha). H/E. Barra=110µm.

Figura 15 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo B7. Miotubos com núcleos numerosos (seta amarela) e fibroblastos (seta vermelha) em evidência. H/E. Barra=27µm.

Figura 16 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo B7. Ausência de fragmentos necróticos em meio ao tecido conjuntivo rico em fibroblastos (seta vermelha). T/M. Barra=70µm.

Figura 17 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo C7 (A) e D7 (B). Verificamos a presença de microlesões com infiltrado moderado (seta amarela) e presença de fibroblastos (seta branca) e vasos neoformados (seta vermelha). Observa-se áreas de hipercontração (seta verde). A - H/E. Barra=27µm. B - H/E. Barra=110µm.

Figura 18 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo E14. Verifica-se o início da formação de miotubos (seta amarela), ainda com a presença de fragmentos necróticos (seta vermelha) e vascularização discreta (seta verde). H/E. Barra=70µm.

Figura 19 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo A14. Observa-se grande concentração de vasos neoformados (seta amarela) em meio ao infiltrado celular (seta vermelha) e a inexistência de fragmentos necróticos (A - H/E. Barra=110µm.). Em B (T/M Barra=110µm) e D (T/M. Barra = 175µm) notamos a formação de miofibrilas tendendo a constituir uma fibra normal (seta verde). Em C nota-se detalhe de vaso neoformado (seta amarela). H/E. Barra 11µm.

Figura 20 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo B14. Em A e D verifica-se grande concentração de fibroblastos (seta amarela) no tecido conjuntivo (seta verde), (A - H/E. Barra=11µm), (D - H/E. Barra=11µm). Em A e F (H/E Barra=11µm.) é notável a distribuição dos vários núcleos do miotubo (seta vermelha) que se organizam

para formar miofibrilas e reconstituir a fibra muscular (seta branca) o que também pode ser observado em C (H/E. Barra=175 μ m) e E. (T/M – Barra=110 μ m). (seta branca).

Figura 21 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo B14. É possível notar a ativação de células satélites (seta branca) na extremidade da fibra muscular , tendendo a formar miotubos para conduzir ao reparo da fibra muscular. H/E – Barra = 110 μ m.

RESUMO

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano e um dos mais susceptíveis a adaptações. Várias pesquisas são desenvolvidas buscando acelerar a regeneração muscular. Com a produção de micro-lesões de fibras musculares pelo exercício rigoroso qualquer dispositivo, de preferência não invasivo que assegure uma aceleração do reparo do músculo lesado é altamente desejável, principalmente se não estiver vinculado a um prejuízo funcional e econômico. O ultra-som (US) terapêutico é um dos muitos agentes eletrofísicos amplamente e freqüentemente usados no tratamento de lesões músculo-esqueléticas e de tecidos moles. Os principais efeitos físicos envolvidos na terapêutica do ultra-som são geralmente classificados em efeitos térmicos e efeitos não-térmicos e as principais alterações biológicas se referem ao aumento da permeabilidade das membranas e difusão celular, ao aumento do transporte de íons cálcio através das membranas das células, desgranulação de mastócitos, o aumento de síntese de proteína nos fibroblastos, e estímulo a angiogênese. Com o

objetivo de avaliar os efeitos do ultra-som no processo de regeneração muscular, 27 ratos (wistar) machos, sedentários, de sessenta dias de idade foram divididos aleatoriamente em seis grupos, nos quais foi realizada lesão incisiva de 3 mm de largura por 3 mm de profundidade no músculo tibial anterior da pata direita-traseira. Os ratos de quatro grupos foram tratados com ultra-som no modo contínuo com frequência mantida em 1 MHz durante 1 minuto, 1 vez por dia e intensidade de $0,2\text{W}/\text{cm}^2$ para os Grupos A e C, e $0,4\text{W}/\text{cm}^2$ para os Grupos B e D. O grupo E e F não foram submetidos ao ultra-som. Após o período de tratamento, os animais dos seis grupos foram sacrificados e os músculos retirados para a confecção de lâminas. Estas foram fotografadas em fotomicroscópio óptico para documentação das alterações morfológicas do tecido. Observamos que a fagocitose dos restos necróticos das fibras lesadas foi mais eficiente nos animais tratados com US, independentemente da intensidade utilizada, assim como o surgimento de fibroblastos e mioblastos (pela ativação das células satélites) a angiogênese foi estimulada principalmente nos animais submetidos ao US, e a formação de miotubos ocorreu mais precocemente nos animais estimulados com US. O que nos leva a concluir que o US favorece o processo de regeneração muscular.

ÍNDICE

1 – Introdução	1
2 – Revisão de literatura	3
2.1 – Ultra-som	3
2.1.1 – Histórico	3
2.1.2 – Ondas	4
2.1.3 – Características das ondas ultra-sônicas	6
2.1.4 – Características do US	7
2.1.4.1 – Atenuação	7
2.1.4.2 – Absorção	8
2.1.4.3 – Piezoelectricidade	9
2.1.5 – Efeitos físicos do US	11
2.1.5.1 – Efeitos térmicos	12
2.1.5.2 – Efeitos não térmicos	13
2.1.5.2.1 – Agitação acústica	14
2.1.5.2.2 – Cavitação	14
2.1.5.2.3 – Cavitação transiente	15

2.1.5.2.4 – Cavitação estável	16
2.1.6 – Efeitos biológicos e terapêuticos do US	17
2.2 – Tecido conjuntivo	18
2.3 – Músculo esquelético	22
2.3.1 – Origem	22
2.3.2 – Estrutura muscular	24
2.4 – Lesão muscular	26
2.5 – Regeneração muscular	27
3 – Objetivo	33
4 – Material e métodos	34
4.1 – Sujeito e tratamento	34
4.2 – Técnicas operatórias	35
4.3 – Equipamento de ultra-som terapêutico	37
4.4 – Protocolo de tratamento	38
4.5 – Cortes e técnicas histológicas	38
4.6 – Indicadores considerados para análise	39
5 – Resultados	40
6 – Discussão	60
7 – Conclusão	70
8 – Bibliografia	71
9 – Abstract	84

1. INTRODUÇÃO

Em Agosto de 1999 Maurice Greene, um atleta americano, completou os 100 metros rasos com a marca de 9,8s. Essa performance rendeu-lhe o título de homem mais veloz do mundo. O fator fisiológico é primordial para propiciar tal performance. Provavelmente as fibras musculares deste atleta contribuíram com maior força que as de seus competidores (ANDERSEN, 2000).

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano e um dos mais susceptíveis a adaptações, podendo aumentar sua secção de 2 a 3 vezes com a atividade física e sofrer encurtamento e atrofia com o desuso.

A quantidade e qualidade de fenômenos bioquímicos para que o músculo consiga tais adaptações é extremamente complexa. A composição material de um músculo proporciona-lhe a velocidade de contração, dependendo da qualidade e quantidade na composição de suas fibras. As fibras de contração lenta dependem de um metabolismo aeróbico eficiente e destinam-se a trabalhos mais prolongados, enquanto as fibras rápidas dependem de um metabolismo anaeróbico e são solicitadas nos trabalhos intensos de curta duração.

A maioria das pesquisas desenvolvida na área esportiva, relacionada ao músculo esquelético está ligada à performance atlética, procurando a

melhor maneira de hipertrofiar a musculatura e como esta atividade poderia converter um tipo de fibra em outro.

Desde a década de 60 pesquisas foram conduzidas com este intuito, mediante inversão de inervação. Os autores relatam que um componente da molécula de miosina, a cadeia denominada pesada, determina as características funcionais da fibra muscular. Em um adulto, esta cadeia pesada existe em três variedades e são classificadas de acordo com a velocidade de contração.

Pesquisadores procuram demonstrar se a possibilidade de fibras musculares transmutarem-se em tamanho e tipo, referida como “plasticidade”, é também aplicável ao homem.

Outro aspecto bastante pesquisado é o relacionado à regeneração muscular correlacionada à resposta das células satélites, ditas células precursoras musculares. Acredita-se que o exercício rigoroso conduz ao aparecimento de micro-rupturas de fibras musculares. A área danificada atrairia células precursoras (satélites), que se incorporariam ao tecido muscular e iniciariam a produção de proteínas para preencher o intervalo lesado. Estes núcleos tornar-se-iam indistintos dos núcleos das células musculares possibilitando a aptidão para produzir mais proteínas e criar novas miofibrilas. A criação destas proteínas seria decorrente de processos metabólicos nucleares mediante o qual, a informação passaria do núcleo para o citoplasma onde a proteína deverá ser produzida.

É altamente desejável, visto a exacerbação da competição esportiva e do culto ao corpo, que qualquer dispositivo, de preferência não invasivo,

assegure uma aceleração do reparo do músculo lesado, principalmente se não estiver vinculado a um prejuízo funcional e econômico.

O ultra-som (US) terapêutico é um dos muitos agentes eletrofísicos amplamente e freqüentemente usados no tratamento de pessoas com dor, lesões musculoesqueléticas e de tecidos moles, porém sua efetividade tem sido questionada por apresentar escassez em estudos. A conduta terapêutica pressupõe a determinação de parâmetros condizentes a cada patologia, e o efeito que o ultra-som trará em cada tecido sonado, tornando o tratamento recomendado e eficaz.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ultra-som (US)

2.1.1. Histórico

Durante o século XIX foi demonstrado que o ouvido humano é capaz de detectar sons cujas freqüências de ondas estejam entre 16HZ e 21kHz, aproximadamente. No início do século XX, conseguiu-se produzir e detectar ondas sonoras com freqüência acima do limite audível pelo homem, dando origem ao termo ultra-som (OKUNO *et al.*, 1986).

A primeira aplicação prática do ultra-som foi em 1917 com a criação de sonares para a detecção de submarinos, utilizando o método pulso-eco. Alguns anos mais tarde, descobriu-se que o ultra-som produzia aumento da temperatura em tecidos biológicos e entre 1930 e 1940, foi introduzido na prática médica como um recurso terapêutico, usado particularmente para produzir calor em tecidos profundos. O ultra-som foi originalmente produzido através de um cristal de quartzo vibrante quando submetido a uma corrente de alta frequência descoberto em 1917 por Langevin. Atualmente são utilizados cristais cerâmicos sintéticos como a liga entre chumbo, zircônio e titânio com grande capacidade em converter corrente elétrica em vibrações mecânicas.

De 1940 até os dias atuais o ultra-som vem sendo extensamente usado em áreas médicas e industriais, e novos efeitos e aplicações do ultra-som vem sendo pesquisados.

2.1.2. Ondas

Som é por definição a perturbação mecânica periódica de um meio elástico como o ar. Ele requer um meio para sua transmissão e não pode atravessar o vácuo (WILLIAMS, 1983).

As ondas ultra-sônicas possuem uma frequência que varia em torno de 20.000 e 20.000.000 de ciclos por segundo (1 ciclo = 1 hertz), que se

propaga como uma onda de pressão causando agitação nas moléculas do meio em que estão se propagando, fazendo-as oscilarem em suas posições de equilíbrio, quer no meio seja sólido, líquido ou gasoso (TER HAAR, 1987). Estes movimentos oscilatórios são resistidos por forças elásticas de acordo com a estrutura molecular do meio (FREDERICK, 1965).

O ultra-som é transmitido em forma de ondas de compressão, onde a oscilação de partículas se dá paralelamente à direção de propagação da onda, constituindo zonas de compressão e rarefação, ou em forma de ondas de cisalhamento (somente para sólidos), onde as partículas oscilam em direção perpendicular à direção de propagação das ondas (BASSOLI, 2001).

Em meios sólidos as ondas produzidas podem ser longitudinais, transversais e superficiais. As ondas mais comuns são as longitudinais ou compressionais e se caracterizam por causarem oscilações nas partículas na mesma direção de propagação da onda e são características em meios líquidos não viscosos. As ondas transversais são comuns em sólidos e causam oscilações nas partículas, em direção perpendicular à direção de propagação da onda. As ondas estacionárias são os resultados das superposições das ondas incidentes com as ondas refletidas das interfaces, somando seus picos de intensidade. Nos meios líquidos e gasosos são produzidas apenas ondas longitudinais (WELLS, 1977).

Como os tecidos moles do organismo podem ser considerados fluídos, o ultra-som terapêutico utiliza-se das ondas longitudinais.

2.1.3. Características das ondas ultra-sônicas

As ondas ultra-sônicas apresentam características dos demais tipos de ondas, como:

- Comprimento (λ) – que corresponde à distância entre regiões adjacentes de compressão ou rarefação máxima, cujas partículas encontram-se em um mesmo estado de movimento, em um dado instante de tempo.
- Amplitude (A) – deslocamento máximo que uma partícula experimenta a partir de sua posição de equilíbrio. Descreve a magnitude do distúrbio causado pela onda.
- Período (T) – é o intervalo de tempo necessário para que uma partícula realize um ciclo completo de movimento.
- Potência (P) – energia total do feixe em um intervalo de tempo expressa em Watts.
- Frequência (f) – é o número de vezes que uma partícula realiza um ciclo oscilatório por unidade de tempo.

A velocidade de propagação de uma onda ultra-sônica depende do tipo de onda e das constantes elásticas do meio em que se propaga, sendo menor nos meios gasosos em relação aos sólidos. Nos tecidos moles do corpo humano a velocidade de propagação da onda ultra-sônica está ao redor de 1.500m/s (YOUNG *et al.*, 1990).

As ondas ultra-sônicas podem se propagar no modo contínuo ou pulsado, a diferença entre eles está na interrupção da propagação de energia.

No modo contínuo não ocorre esta interrupção, levando a um depósito ininterrupto de energia sobre os tecidos irradiados. Não possui modulação e conseqüentemente não consegue dissipar o calor. Na forma contínua o efeito térmico é mais evidente e surge com resposta da absorção de ondas mecânicas pelo tecido, transformando-a em calor (HOOGLAND, 1989).

No modo pulsado ocorrem freqüentes interrupções na propagação de energia, portanto devem ser consideradas a freqüência de onda (f) e a freqüência de repetição de pulso (Fr). Possui modulação em amplitude com freqüências de 16 a 100 Hz.

2.1.4. Características do US

2.1.4.1. Atenuação

À medida que as ondas de ultra-som se propagam através dos tecidos a amplitude e a intensidade diminuem. Esta diminuição é causada pela difusão do som em um meio heterogêneo, pela reflexão e refração nas interfaces e pela absorção do meio. Quanto mais alta for a freqüência, menor será o comprimento de onda e maior será sua absorção (mecanismo de atenuação). A atenuação deve-se principalmente aos mecanismos de absorção, pelos quais a energia mecânica das ondas ultra-sônicas é convertida em calor (TER HAAR, 1978).

TABELA 1 – Profundidade média de duas frequências, 1MHz e 3MHz, em diversos tecidos do corpo, no ar e na água.

PROFUNDIDADE MÉDIA EM DIVERSOS TECIDOS		
TECIDOS	PROFUNDIDADE MÉDIA	
	1MHz	3MHz
Tecido ósseo	2,1mm	--
Pele	11,1mm	4mm
Cartilagem	6mm	2mm
Ar	2,5mm	0.8mm
Tecido tendinoso	6,2mm	2mm
Tecido muscular	9mm	3mm perp./ tecido
Tecido muscular	24,6mm	8mm paral./ tecido
Tecido adiposo	50mm	16,5mm
Água	11.500mm	3.833,3mm

2.1.4.2. Absorção

A absorção do ultra-som ocorre ao nível molecular, transformando a energia vibracional em energia molecular, ou em movimentos moleculares aleatórios. A absorção resulta em aquecimento do tecido e as proteínas são as que mais absorvem o ultra-som, enquanto as gorduras não o fazem muito bem.

TABELA 2 – Coeficiente de absorção (α) em diferentes tecidos para frequência de 1Mhz (adaptado de WELLS, 1977).

Tecidos	Coeficiente de absorção (α)
Sangue	0.18
Gordura	0.63
Cérebro	0.85
Fígado	0.94
Rim	1.0
Músculos (paralelo às fibras)	1.3
Músculos (transversal às fibras)	3.3
Miocárdio	1.8
Ossos do crânio	20
Pulmão	41

O coeficiente de absorção (α) é diretamente proporcional à frequência, quanto maior a frequência, mais rápida a absorção (TER HAAR, 1987).

2.1.4.3. Piezoelectricidade

O ultra-som de uso médico, fisioterápico e odontológico é produzido por transdutores ultra-sônicos. Esses transdutores são dispositivos com capacidade de responder a uma tensão elétrica deformando-se, ou a uma

tensão mecânica alterando sua polarização. Esse fenômeno é denominado de piezoelectricidade e foi descoberto por Pierre e Jacques Curie em 1880.

Em 1957 os pesquisadores FUKADA & YASUDA descreveram a piezoelectricidade em um tecido biológico, o osso, pela primeira vez. Eles observaram os efeitos direto e inverso no osso, e mostraram que ao sofrerem deformações mecânicas, cargas elétricas são formadas na face oposta do osso, sendo este efeito devido às moléculas de colágeno.

Supõe-se que a energia mecânica das ondas seja convertida em energia elétrica pelas unidades de tropocolágeno, criando assim um campo elétrico na superfície do osso fraturado, o que estimularia a proliferação de células ósseas (XAVIER & DUARTE, 1983).

A descoberta da piezoelectricidade em tecido ósseo teve grande impacto no desenvolvimento de técnicas não-invasivas de tratamento de fraturas, favorecendo a “adsorção” de cargas elétricas no sítio lesado ou estabelecendo uma corrente elétrica que produza ativação naquele ambiente.

SILVA (1987) demonstrou teoricamente que a aplicação de um campo acústico em tecido ósseo produz um campo elétrico ao nível da membrana celular e pressupõe que este efeito deve ocorrer em todos os tecidos que contém colágeno.

A piezoelectricidade é uma propriedade natural de certos cristais e substâncias cristalizadas que apresentam anisotropia, ou seja, a capacidade de reagir diferentemente de acordo com a direção de propagação de um fenômeno físico sobre si, como a luz e o calor (RICHARDSON, 1989). Alguns cristais como o quartzo e a turmalina são piezoelétricos, podendo ser usados

como transdutores. No entanto, alguns transdutores podem ser produzidos artificialmente como titânio de bário (BaTiO_3) e o zirconato titanato de chumbo (PZT).

2.1.5. Efeitos físicos do US

Os efeitos biológicos da ação do ultra-som dependem de muitos fatores físicos como intensidade, tempo de exposição, estrutura espacial e temporal do campo ultra-sônico, e fatores biológicos como o estado fisiológico do objeto, sendo este o que mais dificulta a compreensão do exato mecanismo de ação do ultra-som na interação com os tecidos biológicos (SARVAZYAN, 1983).

Os efeitos físicos envolvidos na terapêutica do ultra-som que induzem respostas morfológicamente significativas sobre as células, tecidos, órgãos e organismos são geralmente classificados em efeitos térmicos e efeitos não-térmicos, estando ambos diretamente relacionados com os parâmetros físicos do ultra-som, tempo e a técnica de aplicação (DYSON, 1987).

Alguns experimentos demonstram que a interação do ultra-som com os tecidos biológicos provoca alterações fisiológicas que podem ser benéficas ou provocar danos. Torna-se, portanto, extremamente importante estabelecer limiares para a intensidade ultra-sônica, com o intuito de evitar efeitos lesivos (FERRARI, 1987).

2.1.5.1. Efeitos térmicos

Quando uma onda ultra-sônica atravessa um tecido biológico, este é aquecido ao absorver parte da energia mecânica ultra-sônica. O som atenua-se à medida que atravessa o meio ou diminui sua intensidade durante este trajeto. Parte desta atenuação é causada pela conversão da energia em calor que é equacionada por:

$$\text{Taxa de Aquecimento} = 0,055 \alpha I$$

Onde:

- α - coeficiente de absorção em decibéis/cm
- I – intensidade em W/cm^2

O aumento da temperatura provoca um aumento na taxa metabólica dos tecidos, causando assim, um aumento temporário na extensibilidade das estruturas altamente colagenosas, como os tendões, ligamentos e cápsulas articulares. Também há aumento da circulação sanguínea, acelerando o processo de cicatrização, redução na dor e espasmos musculares.

O aquecimento local produzido pelo ultra-som depende do tipo de tecido, do fluxo sanguíneo e da frequência. Os tecidos ricos em proteínas absorvem energia mais prontamente do que os tecidos com alto teor de

gordura, o fluxo sanguíneo que irriga o local pode dissipar o calor produzido e as altas frequências ultra-sônica aplicada têm uma maior absorção (DYSON, 1987).

A elevação da temperatura tecidual produzida através da absorção da energia ultra-sônica pode trazer benefícios através de uma vasodilatação local ou até queimar os tecidos irradiados. Esse aumento de temperatura depende do coeficiente de absorção do tecido, da intensidade e frequência do ultra-som, do tempo de irradiação, da técnica de aplicação e das dimensões do corpo aquecido.

Com os parâmetros do feixe ultra-sônico otimizados para o uso terapêutico, o aumento local da temperatura é da ordem de centésimos de grau, até pouco mais de 1°C (DYSON & SUCKLING, 1978).

2.1.5.2. Efeitos não térmicos

A constatação de efeitos lesivos provocados pelas altas intensidades levou vários autores a utilizarem intensidades acústicas mais baixas na estimulação ultra-sônica. Por serem relativamente baixas para provocarem aumento significativo na temperatura, outros mecanismos que não os térmicos estão envolvidos na interação do ultra-som com o tecido biológico (DYSON, 1987).

2.1.5.2.1. Agitação acústica

Agitação acústica é um movimento unidirecional do fluido em um campo de pressão ultra-sônica denominada de agitação hidrodinâmica. Essa agitação permite um movimento permanente do fluido causado pelas forças de radiação (TER HAAR, 1987). Esses movimentos originam forças e tensões que podem modificar a posição de partículas intra e extracelulares, ou até mesmo a configuração normal das células podendo afetar a sua atividade (OKUNO *et al.*, 1986). O tecido conectivo e membranas do plasma ficam submetidos ao movimento do fluido no campo ultra-sônico podendo causar efeitos terapêuticos benéficos e aumentar a permeabilidade celular.

Dependendo do tipo de célula, a alteração iônica produzida pode desenvolver alterações na motilidade, síntese ou secreção celular, e isso pode acelerar o processo de reparo (DYSON, 1987).

Diversos experimentos têm sugerido que a agitação, causada em tecidos submetidos aos níveis terapêuticos de ultra-som, é um dos mecanismos responsáveis pela regeneração de tecidos lesados (HADDAD, 1992).

2.1.5.2.2. Cavitação

Cavitação é o termo usado em geral para descrever as atividades de microbolhas em um meio contendo líquido (sangue ou em fluidos dos tecidos), quando estimulado acusticamente. A cavitação engloba a formação, o crescimento, o colapso e os efeitos (físicos, químicos e biológicos) associados às bolhas gasosas (FRIZZEL & DUNN, 1984).

Essas bolhas de gás formadas no tecido biológico com a passagem ondas ultra-sônicas, podem permanecer intactas por muitos ciclos (cavitação estável) ou entrar em colapso liberando grande quantidade de energia (cavitação transiente) (WELLS, 1977). Não existem evidências que ocorram efeitos danosos de cavitação *in vivo* em tecidos tratados com ultra-som de baixa intensidade (DYSON, 1990).

2.1.5.2.3. Cavitação transiente

Caracteriza-se pela grande alteração no volume das bolhas, causado pela passagem do feixe ultra-sônico, levando-as ao colapso, podendo ocasionar a implosão celular (TER HAAR *et al.*, 1982). É extremamente danosa, pois as alterações de pressão e temperatura produzidas no sítio do

colapso das bolhas, podem desintegrar o tecido local com formação de radicais livres altamente reativos que podem causar mudanças químicas nas células e lise celular (OKUNO, CALDAS & CHOW, 1986).

No entanto, a cavitação transiente requer intensidades maiores que as usadas terapeuticamente (aproximadamente 10 W/cm^2), o que torna sua ocorrência bastante improvável (LEITE, 1989).

2.1.5.2.4. Cavitação estável

Quando as bolhas atravessam o campo ultra-sônico oscilando em um feixe estável, aumentando e diminuindo seu volume conforme as variações de pressão de campo, dizemos que a cavitação é estável (TER HAAR *et al.*, 1982). Este tipo de cavitação é responsável, em parte, pela aceleração do reparo tecidual que a onda ultra-sônica produz, através de modificações na permeabilidade da membrana celular para os íons cálcio (YONG & DYSON, 1978) e sódio (MORTIMER & DYSON, 1988) que provocam um aumento na síntese de proteínas.

Há evidências experimentais consideráveis de que níveis terapêuticos de ultra-som podem induzir a cavitação estável *in vivo* (TER HAAR *et al.*, 1982), mas seus efeitos ainda não estão bem estabelecidos. Por apresentar efeitos não térmicos e modificação pressórica regular a cavitação

estável tem sido considerada terapêutica (GUIRRO,1999). Entretanto sabe-se que a cavitação estável “in vitro” pode produzir efeitos irreversíveis em suspensão celular, como a ruptura de membranas e de macromoléculas, a desnaturação de enzimas, etc., dependendo dos parâmetros usados (LEITE,1989).

A intensidade limiar a partir do qual pode ocorrer cavitação foi determinada em meio aquoso por HILL (1971) em $0,1 \text{ W/cm}^2$, e *in vivo* por TER HAAR *et al.* (1982) em $0,2 \text{ W/cm}^2$.

2.1.6. Efeitos Biológicos e Terapêuticos do US.

Algumas das mudanças biológicas observadas com a aplicação do US fazem referência ao aumento da permeabilidade das membranas e difusão celular, ao aumento do transporte de íons cálcio através das membranas das células, desgranulação de mastócitos, liberação de histamina e agentes quimiotáticos. Favorece ainda a síntese de colágeno e o aumento de sua elasticidade, bem como aumenta a taxa de sínteses de proteínas e diminui a atividade elétrica dos tecidos (DYSON *et al.*, 1968; GUIRRO & GUIRRO, 1996).

Dentre os efeitos terapêuticos apontados, é de grande importância ressaltar o estímulo sobre a regeneração tissular e reparação dos tecidos moles, o aumento de síntese de proteína nos fibroblastos, e estímulo a

angiogênese. Verificou-se ainda a ativação do ciclo do cálcio e estimulação do calo ósseo. (DYSON *et al.*, 1968; GUIRRO & GUIRRO, 1996).

2.2. Tecido Conjuntivo

O tecido conjuntivo é derivado do mesênquima e constitui o arcabouço de sustentação de quase todos os órgãos do organismo. Permite a troca de gases e metabólitos, é rico em vasos e é constituído por células, fibras e substância fundamental amorfa (mucina). As células características deste tecido são os fibroblastos, os quais sintetizam as fibras colágenas, fibras reticulares, fibras elásticas, proteoglicanas, glicoproteínas estruturais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995) e a mucina. O conjuntivo é o tecido que apóia e nutre as células epiteliais, forma uma camada em torno dos vasos sanguíneos e linfáticos e preenche os espaços entre as fibras e feixes musculares.

O tecido conjuntivo pode ser classificado em frouxo, denso e propriamente dito. O tecido conjuntivo frouxo é de consistência delicada, flexível, com pouca resistência e considerado o tipo de conjuntivo mais comum.

No tecido conjuntivo denso predominam as fibras colágenas com um número maior de células fibroblásticas, o que determina uma maior resistência, embora com menor flexibilidade. Quando é denso e modelado, os feixes de colágeno são orientados e organizados de forma fixa, possibilitando uma maior

resistência aos traumas. Ao contrário do tecido denso e não modelado, onde os feixes são distribuídos sem uma orientação definida apesar de resistentes.

O tecido conjuntivo propriamente dito se caracteriza pela presença de todos os elementos estruturais, porém sem predomínio de nenhum deles. As células encontradas com mais frequência são os fibroblastos e os macrófagos.

Os principais tipos de fibras do tecido conjuntivo são as fibras colágenas, elásticas e reticulares, distribuídas desigualmente entre os vários tipos de tecido conjuntivo.

As fibras colágenas são birrefringentes, alongadas e dispostas de forma paralela, formadas por uma escleroproteína chamada colágeno, considerada a proteína que existe em maior quantidade no corpo humano. A distribuição regular e paralela das moléculas, juntas e no sentido transversal, proporciona a resistência mecânica do colágeno. Por isso, na fase de cicatrização de ferimentos o colágeno é responsável pela força tensional. Foram isoladas e descritas mais de uma dúzia de tipos de colágenos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). Destes, os mais conhecidos são:

- tipo I que é sintetizado pelos fibroblastos, pelas células do músculo liso e osteoblastos;
- tipo II produzido pelos condrócitos;
- tipo III cuja produção é do músculo liso.

As fibras elásticas são delgadas, sem estriações longitudinais e ramificam-se formando uma trama de malhas bastante irregular. De cor amarelada, cedem facilmente a trações e retornam com a mesma facilidade ao

ponto inicial. O componente principal dessa fibra é uma escleroproteína extremamente resistente denominada elastina, produzida pelas células endoteliais, fibras musculares lisas, fibroblastos e condroblastos fibrocartilaginosos. Por ser responsável pela flexibilidade do tecido elástico é encontrada na parede dos vasos sanguíneos de grande calibre formando uma membrana fenestrada. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

As fibras reticulares são finas, inelásticas, curtas e abundantes, constituídas pelo colágeno tipo III chamado, reticulina. Sua produção, na maioria dos tecidos é responsabilidade dos fibroblastos. São fibras anastomosadas que costumam formar o estroma de glândulas, permitindo a manutenção da união entre as células epiteliais que constituem o corpo da mesma.

O trabalho bem distribuído entre as células do tecido conjuntivo é responsável pelo surgimento de tipos celulares variados, independentes do ponto de vista morfológico e funcional. São elas macrófagos, mastócitos, plasmócitos, leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, célula mesenquimatosa indiferenciada e células adiposas.

Os macrófagos são o tipo de célula que se diferencia pelo seu potencial de pinocitose e fagocitose e não pela sua morfologia, que varia de acordo com a localização e o estado funcional da célula. Estes podem ser fixos e, quando estimulados de forma correta, são móveis. Capaz de se unir para dar origem a células sinciciais grandes ou multinucleadas, essas células exercem

influência na defesa do organismo contra restos de células, bactérias e até mesmo partículas inertes que penetram no corpo (BOGLIOLO *et al.*, 1998).

Os mastócitos são células globosas com núcleo centralizado e esférico, comum no tecido conjuntivo frouxo e normalmente encontrado ao redor dos vasos sanguíneos, com citoplasma enriquecido de grânulos basófilos e substâncias diretamente envolvidas no processo inflamatório como a heparina, histamina e serotonina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Encontrados em pequena quantidade no tecido conjuntivo normal, os plasmócitos aparecem de forma numerosa quando há uma inflamação crônica, diferentemente dos leucócitos que são encontrados com maior frequência no tecido conjuntivo, principalmente na presença de algum processo inflamatório, onde linfócitos e eosinófilos passam a migrar com maior frequência através das paredes dos capilares e vênulas. Sua principal função é sintetizar anticorpos.

Quanto aos fibroblastos, são considerado as células mais comuns do tecido conjuntivo, cuja função é sintetizar colágeno, elastina, mucopolissacarídeo e o material intercelular amorfo. Quando jovem, a célula é chamada fibroblasto. Este, de forma gradativa, diminui sua atividade de síntese e passa a ser uma célula mais madura denominada fibrócito. No processo de reparo de uma lesão os fibroblastos estão ativos, muito embora, sua divisão não seja frequente estas células conseguem entrar em mitose quando solicitadas (GUIRRO & GUIRRO, 1992).

Sendo capaz de dar origem a qualquer outra célula do organismo, a célula mesenquimatosa indiferenciada é de suma importância para o processo de regeneração do tecido lesado.

Com relação às células adiposas, estas estão presentes nas malhas de outros tipos de tecido conjuntivo e sua função é armazenar gorduras neutras, tornando-se um reservatório de energia. Como a vascularização do conjuntivo é rica, a troca gasosa entre o sangue e os adipócitos é intensa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Estudos indicam que as ações do US sobre o tecido conjuntivo ocorrem preferencialmente na fase inflamatória, estimulando a angiogênese e o aumento da extensibilidade das fibras colágenas. (CUNHA, 2001).

Existem evidências consideráveis que a terapia por US pode agir como um estímulo para as células envolvidas no processo de reparo tecidual, particularmente na fase inflamatória e proliferativa (GOGIA, 1995).

KITCHEN & PARTRIDGE, (1990) sugerem que o US de baixa intensidade pode atuar sobre os mastócitos (FYFE & CHAHL, 1982), plaquetas e macrófagos (YOUNG & DYSON, 1990) estimulando a desgranulação, o que pode explicar a aceleração do reparo tecidual.

RAMIREZ *et al.* (1996), observaram o efeito do US na síntese de colágeno e proliferação de fibroblastos *in vitro*. Utilizando US contínuo na frequência de 1 MHz e intensidade de $0,4\text{W}/\text{cm}^2$ verificaram a estimulação das células proliferativas, sugerindo um estímulo favorável ao crescimento do tecido conjuntivo quando em processo de reparo por lesão tecidual.

2.3. Músculo Esquelético

2.3.1. Origem

O tecido muscular é responsável pelos movimentos corporais. É constituído por células alongadas de origem mesodérmica, diferenciadas pela síntese de proteínas filamentosas e por um processo gradativo de alongamento.

A citodiferenciação ocorre a partir de células precursoras mesenquimais que para atingir a fase adulta passam por dois estágios celulares, o pré-mioblasto e o mioblasto. As células pré-mioblásticas possuem um formato fusiforme, são mononucleadas e indiferenciadas, além de induzir a formação e crescimento tecidual.

Muitas centenas de mioblastos alinham-se com as extremidades voltadas umas para as outras, fundem-se e formam células longas, conhecidas como miotubos. Segundo MALTIN *et al* (1983) miotubo é um sincício (célula que foi gerada pela fusão de duas ou mais células através do desaparecimento das paredes celulares contíguas) no qual os núcleos são normalmente arranjados em uma cadeia central. Usualmente contém uma população de miofibrilas limitadas, amplamente espaçadas. Estão relacionados com a síntese de proteínas contráteis e organizados em estruturas menores chamadas de miofibrilas (CARLSON *et al.*, 1979). Como a associação dos

mioblastos persiste até o músculo tornar-se completamente maduro, os núcleos dos miotubos aumentam progressivamente. Estes, em fase avançada de desenvolvimento mostram a maior parte do citoplasma ocupado por miofibrilas, obrigando os núcleos a se deslocarem para a periferia próximo a membrana plasmática. A citodiferenciação dos miotubos em miofibras prematuras envolve a obtenção definitiva da posição sub-sarcolêmica dos núcleos, passando a se chamar mionúcleo. Chega ao fim o processo de diferenciação celular representado pelas miofibras, mesmo sem completo desenvolvimento funcional e estrutural. Esta diferenciação funcional se completará com os estímulos do motoneurônio específico (FISCHMAN, 1972). Sabe-se que só depois de algumas semanas de desenvolvimento pós-natal é que a maturidade funcional está completa, pois a inervação das fibras musculares ainda é indiferenciada (BROWN *et al.*, 1981).

Segundo ARMSTRONG *et al.* (1994), com o fim do desenvolvimento embrionário, a fibra muscular esquelética passa a compor a chamada unidade muscular básica. Esta é formada pela própria fibra, junção neuromuscular, lâmina basal e células satélites. Na fase adulta a fibra é cilíndrica e alongada, somando-se ao tecido conjuntivo para dar origem ao tecido músculo esquelético propriamente dito.

Conhecendo o processo de miogênese normal, é possível verificar que o US tendo ação direta na ativação das células satélites, poderia acelerar este processo.

2.3.2. Estrutura muscular

As unidades morfofuncionais do músculo esquelético estriado são as fibras musculares, polinucleadas e com os núcleos localizados na periferia da célula. Cada fibra é coberta por uma delgada membrana plasmática, o sarcolema, e seu citoplasma ou sarcoplasma mostra-se preenchido prioritariamente pelas fibras paralelas, as miofibrilas. Estas são cilíndricas e dispostas longitudinalmente à fibra muscular, preenchendo quase completamente seu interior.

Na constituição de um músculo as fibras estão distribuídas em feixes ou fascículos de tamanhos variados, envolvidos por uma camada de tecido conjuntivo, chamado de epimísio. Do epimísio partem septos muito finos de tecido conjuntivo que se dirigem para o interior do músculo, separando os feixes. Esses septos são chamados de perimísio. O perimísio envolve cada feixe de fibras musculares. Cada fibra muscular, por sua vez, é envolvida por uma camada muito fina constituída pela lâmina basal da fibra muscular e por fibras reticulares do endomísio. A função deste tecido conjuntivo é manter as fibras musculares unidas, permitindo que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro.

O músculo esquelético é fartamente irrigado com sangue e geralmente, cada fibra tem em suas proximidades vários capilares (ROSS & ROWRELL, 1993). Os vasos sanguíneos penetram no músculo através dos

septos do tecido conjuntivo e formam uma rica rede de capilares entre as fibras musculares (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1999).

Os capilares linfáticos que se situam nas bainhas do epimísio e perimísio fazem a drenagem linfática. Aparentemente estes capilares não penetram no endomísio, convergem para vasos maiores e deixam o músculo através do hilo.

Ao microscópio óptico, as fibras esqueléticas apresentam-se agrupadas na forma de cilindros, quando observadas em cortes longitudinais, e como polígonos de contornos circulares em cortes transversais. Contudo, estas fibras são alongadas e podem ir de um extremo a outro do ventre muscular.

O microscópio eletrônico revela a presença de filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina dispostos longitudinalmente nas miofibrilas, organizados numa distribuição simétrica e paralela. Na contração muscular os filamentos de actina deslizam sobre os filamentos de miosina. O complexo actina-miosina representa 55% do total de proteínas do músculo estriado.

Essa organização dos filamentos miofibrilares é mantida por diversas proteínas, como por exemplo, os filamentos intermediários de desmina, que ligam as miofibrilas umas às outras. O conjunto de miofibrilas é, por sua vez, preso à membrana plasmática da célula muscular por meio de diversas proteínas que têm afinidade pelos miofilamentos e por proteínas da membrana plasmática. Uma dessas proteínas, chamada distrofina, liga os filamentos de actina a proteínas integrais da membrana plasmática.

2.4. Lesão muscular.

As fibras do músculo esquelético são repetidamente lesadas e reparadas no decorrer de nossas vidas. As lesões podem ser causadas por eventos que ocorrem nas fibras como isquemia, déficit metabólico ou enfermidades, ou por eventos extremos que resultam em lesão, como estresse mecânico, injeção de toxinas ou lesões por frio, calor, esmagamento, cortes etc. (RUSSEL *et al.*, 1991). Na maioria dos casos a lesão é extensa e envolve células musculares, tecido conjuntivo e epitélio.

Imediatamente após a lesão muscular as fibras lesadas se retraem, deixando uma fenda que será preenchida pelo hematoma (LEECH, 1997).

Numa resposta inicial à lesão, o hematoma e a liberação de enzimas pelas fibras musculares lesadas iniciam uma cascata de eventos associados com uma resposta inflamatória (LEECH, 1997; MAXWELL, 1992; ROBERTSON *et al.*, 1993).

A resposta inflamatória é estreitamente ligada ao processo de reparação. Após uma lesão surge como uma resposta protetora visando liberar o organismo da causa inicial da lesão celular e das conseqüências desta (ROBBINS, 2000).

2.5. Regeneração Muscular

A regeneração muscular (mioregeneração) pode ser dividida em três fases distintas: inflamação; reparação ou regeneração; e cicatrização.

A inflamação aguda tem duração relativamente curta, sendo de alguns minutos, várias horas ou poucos dias, e se caracteriza pela exudação de líquidos, proteínas plasmáticas e migração de leucócitos com predomínio dos neutrófilos para o foco inflamatório (ROBBINS, 2000). A necrose dos segmentos das miofibrilas lesadas e a fagocitose dos resíduos do tecido necrótico são as características principais.

Logo após a lesão, ocorre a liberação de fatores quimiotáticos e vasoativos como a norepinefrina e serotonina, promovendo a vasoconstrição nos primeiros 5 a 10 minutos (GOGIA, 1995). Fibrinas e fibronectinas formam ligações transversas com o colágeno resultando numa estrutura que estanca o local hemorrágico e funciona como resistência às forças de tensão durante a fase inicial de reparo (JÓZSA & KANNUS, 1997).

A vasodilatação segue a vasoconstrição transiente causando um aumento no fluxo sanguíneo e da pressão hidrostática. Ocorre um aumento da permeabilidade capilar em resposta às reações químicas próprias da histamina liberada pelos mastócitos e plaquetas, das prostaglandinas liberadas a partir das regiões internas das membranas expostas pelas células lesadas (CUNHA, 2001; RUBIN *et al.*, 1990).

O acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e alguns macrófagos no sítio de lesão ocorre há aproximadamente três horas após a lesão, mas depois de quarenta e oito horas o número de macrófagos é bem maior. Eles invadem o local e estão presentes em grande número abaixo da lâmina basal das fibras musculares lesadas (LEECH, 1997; MAXWELL, 1992).

Esses fagócitos limpam a área dos fragmentos, o que é de extrema importância para a cicatrização do tecido o que ocorrerá devido à influência dos fibroblastos ativados e da regeneração vascular.

Alguns estudos têm demonstrado a formação de uma barreira intracelular à aproximadamente 0,5mm do sítio inicial de lesão, considerado o limite da lesão, com a função de evitar que as demais fibras musculares sofram necrose (LEECH, 1997).

O edema se desenvolve e acumula-se no sítio de lesão. A cicatriz é formada a partir da fibronectina, a qual acredita originar-se do edema, e em menor parte sintetizada pelos fibroblastos. Esta rede de fibrina prepara um esqueleto para a invasão dos fibroblastos e possibilita a ativação das células satélites (HASSELMAN *et al.*, 1995; HURME, 1992).

Nesta fase o ultra-som pode estimular a liberação de histamina dos mastócitos por degranulação (DYSON, 1987). Trabalhos estão em andamento para descobrir se o tratamento com o ultra-som no estágio de inflamação tardia (subaguda), quando predominam os macrófagos, podem acelerar a liberação de agentes estimulantes da reparação dessas células. Caso isso se constate, o tratamento durante esse estágio, que começa por volta de doze horas após a

lesão pode ser vantajoso, pois acelera a entrada na etapa proliferativa do processo de reparação (YOUNG & DYSON, 1978).

Para que a reparação do sítio lesado seja eficiente é necessário que haja uma fonte de mioblastos, vascularização e inervação adequadas e trabalho mecânico (LEECH, 1997).

Na segunda fase, reparação ou regeneração, a principal característica é a proliferação das células satélite e dos fibroblastos, seguida da ativação da síntese de proteína. Esse estágio começa normalmente por volta de três dias após a lesão.

Segundo WILLIAMS *et al.* (1995), a regeneração do músculo esquelético do homem é limitada, e se a lesão é grande, a regeneração pode não ocorrer, fazendo com que o músculo perdido seja então substituído por tecido conectivo.

Embora os núcleos das fibras musculares esqueléticas não se dividam, o músculo tem a capacidade de reconstituição. As células satélites são responsáveis pela regeneração do músculo esquelético. A célula satélite é uma célula mononucleada situada entre a membrana plasmática e a lâmina basal da fibra muscular (MALTIN *et al.*, 1983). São células fusiformes, dispostas paralelamente às fibras musculares, dentro da lâmina basal e possuem núcleos que parecem pertencer à célula muscular. São células-tronco latentes consideradas mioblastos inativos que podem proliferar após qualquer pequena lesão para dar origem a novos mioblastos.

Durante a proliferação ocorre a divisão e proliferação das células atraídas para o local da lesão produzindo um tecido conectivo matricial dentro

do qual novos vasos sangüíneos podem crescer. O tecido formado desta maneira é eventualmente remodelado em um tecido com propriedades mecânicas similares, mas raramente tão boas quanto aquelas do tecido não lesado.

Alguns fibroblastos adquirem características ultra-estruturais, funcionais, imunológicas e químicas que os distinguem dos fibroblastos teciduais ativados, são os miofibroblastos. Estes são os principais produtores da matriz do tecido conjuntivo e também são responsáveis pela redução da ferida, secretando grande variedade de moléculas, como colágeno, fibronectina, elastina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e mucopolissacarídeos (PARIZOTTO, 1998). Os fibroblastos expostos aos níveis terapêuticos de ultra-som in vivo podem ser estimulados a sintetizar mais colágeno.

Após uma lesão ou outro estímulo, as células satélites tornam-se ativas, proliferam por divisão mitótica transformam-se em mioblastos e se fundem uns aos outros para formar novas fibras musculares esqueléticas. Enquanto a lâmina basal permanece íntegra, os mioblastos fundem-se dentro dela para formar miotubos que, quando maduros, originam novas fibras. Em contrapartida, o rompimento da lâmina basal produz o reparo do local lesado por fibroblastos através da formação do tecido cicatricial (LEECH, 1997; BASSOLI, 2001).

A regeneração começa dentro da lâmina basal e pode ser vista em 24 horas. Células satélites ativadas proliferam e diferenciam-se em mioblastos.

Isto é regulado até certo ponto pela interação de fatores de crescimento e proteínas sintetizadas pelo DNA nuclear.

Mioblastos fundem-se então em miotubos multinucleados e diferenciam-se em fibras musculares maduras. A lâmina basal original tem um papel importante, pois serve como andaime para reconstituição e regeneração das fibras musculares, mantendo um micro-ambiente favorável para a regeneração, e impedindo os fibroblastos de formar a maioria das fibras colágenas recentemente.

A terceira fase, regeneração muscular, maturação ou remodelação, é caracterizada por uma gradual recuperação das propriedades funcionais do músculo, incluindo a recuperação da força elástica dos componentes de conexão do tecido (BISCHOFF, 1990; GARRETT et al., 1991; LÊECH, 1997).

Eventualmente as fibras musculares regenerando produzem uma lâmina basal nova. Se a lâmina basal não foi lesada, é possível que ocorra a regeneração completa. Com danos mais severos, porém, as fibras musculares têm que crescer no interior do tecido cicatricial sem a orientação da lâmina basal.

Finos miotubos crescem fora dos cilindros de lâmina basal no tecido de granulação local paralelo às fibras musculares preservadas. Nesta fase foi descrita a presença de fibras colágenas e acredita-se que estas podem transmitir a força de contração das fibras musculares pela fenda, permitindo o uso do membro ferido antes de a cura estar completa.

O tecido cicatricial excessivo pode inibir a regeneração de fibras musculares, porém, o grau de fibrose é variado e depende da severidade da

lesão e como esta é administrada. Atividade física é necessária para induzir a integração do músculo regenerado no tecido muscular não afetado. (ROSS & ROWRELL, 1993; LEECH, 1997).

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é analisar a influência terapêutica do ultrassom sobre a reparação do tecido muscular estriado esquelético de ratos, após lesão experimental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Sujeitos e Tratamento

Para este estudo foram utilizados 27 ratos (wistar) machos, sedentários, de sessenta dias de idade, pesando em média 300 ± 50 g. Esses animais foram obtidos no Biotério Central da UNESP – Campus Botucatu – SP e mantidos no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física – IB – Campus Rio Claro, em gaiolas coletivas com no máximo 5 ratos, que foram alimentados com ração balanceada para roedores (Labina), com 23% de proteína e água “*ad libitum*”, com temperatura controlada de 25°C e períodos intercalados de claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos A, B, C e D submetidos ao ultra-som. E os grupos E e F, sem aplicação de ultra-som, sendo:

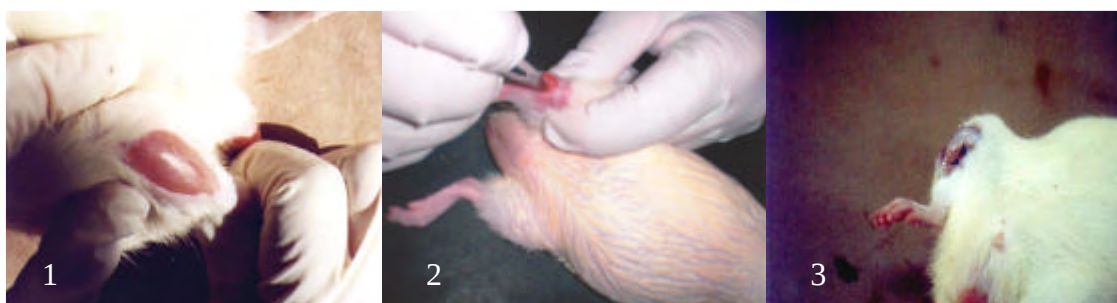
- Grupo A: foram tratados com ultra-som terapêutico de baixa intensidade ($0,2 \text{ W/cm}^2$), frequência de 1MHz, contínuo, por um minuto cada sessão, após 24 horas da lesão.

- Grupo B: foram tratados com ultra-som terapêutico de baixa intensidade ($0,4\text{W/cm}^2$), frequência de 1MHz, contínuo, por um minuto cada sessão, após 24 horas da lesão.
- Grupo C: serviu de controle, com o ultra-som sendo aplicado no músculo intacto com 0.2 W/cm^2 de intensidade, frequência de 1MHz, contínuo, por um minuto cada sessão.
- Grupo D: serviu de controle, com o ultra-som sendo aplicado no músculo intacto com 0.4 W/cm^2 de intensidade, frequência de 1MHz, contínuo, por um minuto cada sessão.
- Grupo E: lesado sem aplicação de ultra-som para controle da regeneração
- Grupo F: animais sacrificados para análise da musculatura normal, sem lesão e sem aplicação de ultra-som, controle.

4.2 Técnicas operatórias

Os ratos foram anestesiados com éter etílico concentrado, tricotomizados na região a ser lesada. A pele foi seccionada juntamente com a sua fáscia (figura 1). Foi realizada lesão incisiva de 3 mm de largura por 3 mm de profundidade no músculo tibial anterior da pata direita-traseira de todos os ratos (figura 2). A área lesada foi considerada como tendo $0,5\text{cm}^2$, e as fibras seccionadas transversalmente. A pele foi suturada (figura 3) e no local foi feito assepsia com álcool 70%.

Durante os primeiros dois dias, foi administrada via oral 20 gotas de dipirona sódica diluída em 200ml de água.



Figuras 1, 2 e 3 – procedimento utilizado para realização da lesão do músculo tibial anterior

Baseado nos trabalhos de GARAVELLO *et al.* (1997) e RANTANEN *et al.* (1999), os animais foram sacrificados com 1, 3, 7 e 14 dias de aplicações de US. Dessa forma foram classificados pelo grupo e pelo dia de sacrifício em A1, A3, A7, A14 / B1, B3...

4.3. Equipamento de ultra-som terapêutico

Nesse experimento foi usado um aparelho gerador de ondas ultra-sônicas, modelo SONACEL da BIOSET (Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda) (figura 4). Faz-se necessário colocar que antes de sua utilização o aparelho foi calibrado em uma balança radiométrica ULTRASOUND POWER METER com precisão de $\pm 20\text{mW}$. Nesse estudo, a área do transdutor é de 1 cm^2 e o tipo de cristal é a cerâmica PZT.



Figura 4 – Aparelho de ultra-som utilizado no tratamento.

4.4. Protocolo de tratamento

Na técnica de aplicação foi usado um gel hidrossolúvel como meio de acoplagem, e movimentos circulares num ângulo de 80° a 90°. Foi utilizado ultra-som no modo contínuo com frequência mantida em 1 MHz durante 1 minuto, 1 vez por dia e intensidade de 0,2W/cm² para os Grupos A e C, e 0,4W/cm² para os Grupos B e D. Os grupos E e F não foram submetidos ao ultra-som (US).

4.5. Cortes e técnicas histológicas

Após o período de tratamento, os animais dos 6 grupos foram sacrificados e os músculos retirados para a confecção de lâminas.

As amostras foram identificadas e coladas em um suporte de cortiça com auxílio do meio de inclusão para congelamento “Tissue – Tec”, de maneira a fornecer, ao serem cortadas, amostras significativas do local lesado. Após serem envolvidas em talco mineral, foram imediatamente criofixadas em nitrogênio (N₂) líquido no qual foram conservadas até serem cortadas em micrótomo do tipo criostato, à -20° C.

Os cortes seriados possuíam 10µm de espessura e foram colhidos em lâminas de histologia e processados e corados pela técnica hematoxilina/eosina (H/E) e tricômico de masson (T/M). Estes cortes foram

obtidos em, no mínimo, quatro níveis, ou seja, um na região superficial da lesão e os demais subseqüentes, a cada 200 µm de profundidade.

As lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio óptico ZEISS, do Departamento de Biologia do Instituto de Biologia – UNESP / Rio Claro, para documentação fotográfica das alterações morfológicas do tecido.

4.6. Indicadores considerados para análise.

Elegidos para avaliação e análise comparativa dos resultados obtidos nos diferentes protocolos adotados, os indicadores basearam-se nas principais alterações no processo de reparação muscular observadas nos animais submetidos ao tratamento com US, em relação aos não tratados, e foram:

- concentração de infiltrado leucocitário;
- rede de fibrina;
- presença de mioblastos e fibroblastos;
- neovascularização;
- formação de miotubos.

Considerando as fases do processo de regeneração com base nos indicadores buscados estabeleceu-se como critério de análise:

	DISCRETO	ACENTUADO
<i>INFILTRADO LEUCOCITÁRIO</i>	+	+++
<i>REDE DE FIBRINA</i>	+	+++
<i>PRESENÇA DE MIOBLASTOS E FIBROBLASTOS</i>	+	+++
<i>NEOVASCULARIZAÇÃO</i>	+	+++
<i>FORMAÇÃO DE MIOTUBOS</i>	+	+++

5. RESULTADOS

Durante a fase do pós-operatório não foi observado qualquer tipo de processo infeccioso na área da lesão.

Como critério de comparação, os animais do grupo F, (normais sem lesão experimental e não submetidos ao ultra-som) foram sacrificados e tiveram seus músculo tibial anterior coletado para análise. As fibras musculares apresentaram aspecto normal, dispostas paralelamente, com núcleos periféricos. O tecido conjuntivo apresentou morfologia típica. No endomísio é visível a existência de fibroblastos, macrófagos, células satélites e vasos capilares, em quantidade considerada normal (figura 5).

Verificou-se nestes músculos a ocorrência eventual de micro-lesões com discreto infiltrado leucocitário, além de alguns fibroblastos e vasos capilares. Essas lesões foram consideradas normais e decorrentes do seu processo de atividade, visto que não havia etiologia aparente que justificasse sua presença. Nas extremidades das fibras rompidas nota-se o processo de hiper-contração muscular em decorrência da lesão (figura 5). Essas micro-lesões estão presentes nos músculos normais e não podem ser atribuídas à manipulação e/ou congelamento ou microtomia devido à presença de células inflamatórias no local.

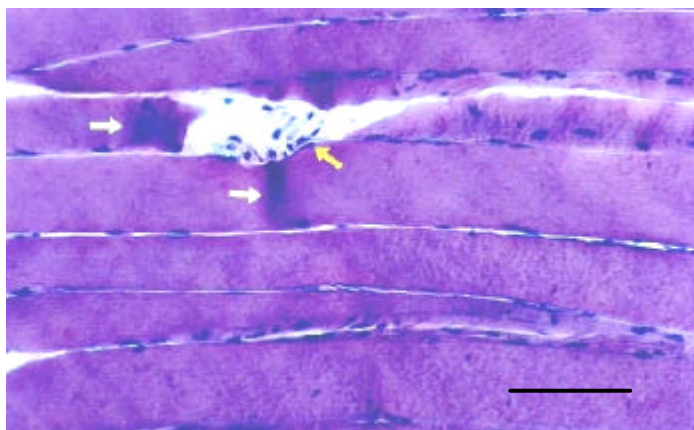


Figura 5 – Fotomicrografia do músculo tibial anterior de animal normal (grupo F), sem lesão muscular experimental e sem aplicação de ultra-som. Fibras musculares bem definidas e núcleos periféricos. Endomísio discreto e presença de micro-lesões e algum infiltrado leucocitário (seta amarela) e áreas de hiper-contração (seta branca). H/E. Barra = 110 μ m.

Nos animais do grupo C1 com musculatura intacta, porém submetidos ao ultra-som 0,2W/cm² notou-se aumento discreto das micro-lesões em relação ao animal normal, e aumento nas áreas de infiltrado leucocitário, que apresentavam semelhança quanto à concentração de fibroblastos e macrófagos. Observa-se na figura 6 que as áreas de hiper-contração também são evidentes e ocorre a fagocitose de restos musculares e centralização dos núcleos.

Próximo às lesões é possível observar a migração de polimorfonucleares do interior dos vasos ligeiramente dilatados para o tecido conjuntivo adjacente (figura 6).

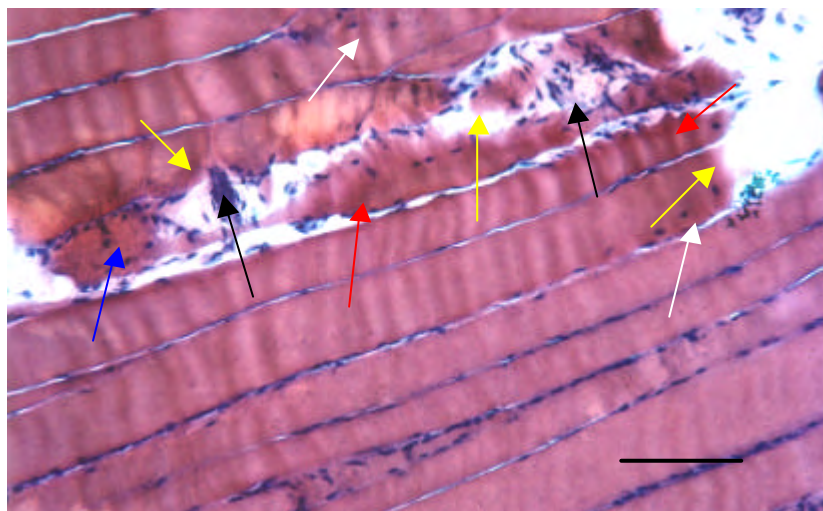


Figura 6. - Fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animal do grupo C1, músculo normal submetido à aplicação de ultra-som contínuo a $0,2 \text{ W/cm}^2$. Nota-se a acentuação de micro-lesões (seta amarela) e maior infiltrado leucocitário (seta preta). Áreas de hiper-contracção evidentes (seta vermelha), fibras sofrendo fagocitose (seta azul) e núcleos centralizados (seta branca). H/E. Barra= $175\mu\text{m}$.

Nos animais do grupo E1, que sofreram lesão experimental e não foram submetidos ao ultra-som verificou-se a presença de um infiltrado de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares na região seccionada. Nota-se algumas fibras lesadas bem como áreas de necrose muscular evidentes, e também presença de células fagocitárias (figura 7). Observa-se áreas de hiper-contracção muscular ao longo das fibras, sejam elas lesadas ou não.

Fora da zona de lesão foi possível verificar as mesmas micro-lesões presentes nos demais grupos analisados, o que permitiu descartá-las como sendo artefatos, além da presença de algumas células fagocitárias e fibroblastos.

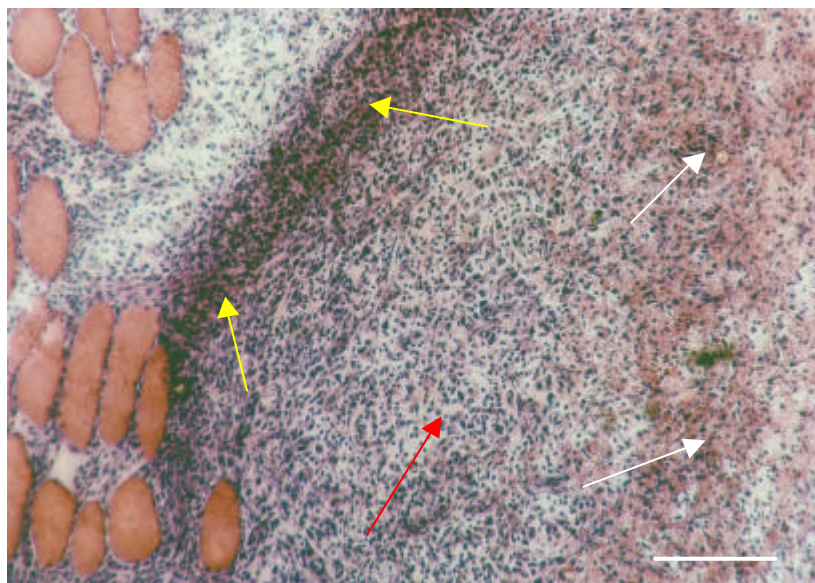


Figura 7. Fotomicrografia de músculo tibial anterior de animal do grupo E1, que sofreu lesão muscular, mas não foi submetido à aplicação de ultra-som. Verifica-se área de necrose muscular (seta amarela) em meio ao infiltrado inflamatório (seta vermelha) e restos de fibras musculares (seta branca). H/E. Barra=175µm.

Nos animais do grupo A1, que sofreram lesão e foram submetidos ao ultra-som contínuo a $0,2\text{W}/\text{cm}^2$, observa-se um aumento do infiltrado leucocitário em relação ao grupo E1, assim como uma possível aceleração do processo de fagocitose dos restos de fibras musculares, com diminuição das áreas necróticas invadidas por grupos de células fagocíticas (figura 8). Tal fato pode ser observado também nos animais do grupo B1, que sofreram lesão experimental e foram submetidos ao ultra-som $0,4\text{W}/\text{cm}^2$, apresentam infiltrado leucocitário similar e fagocitose dos restos de fibras musculares em degeneração (figura 8).

Verifica-se a formação inicial de rede de fibrina com a presença de estruturas que possivelmente darão origem a leitos vasculares nos dois grupos (figura 8). Em maiores aumentos foi possível identificar células como neutrófilos e macrófagos além dos mioblastos e fibroblastos aderidos a ela (figura 9).

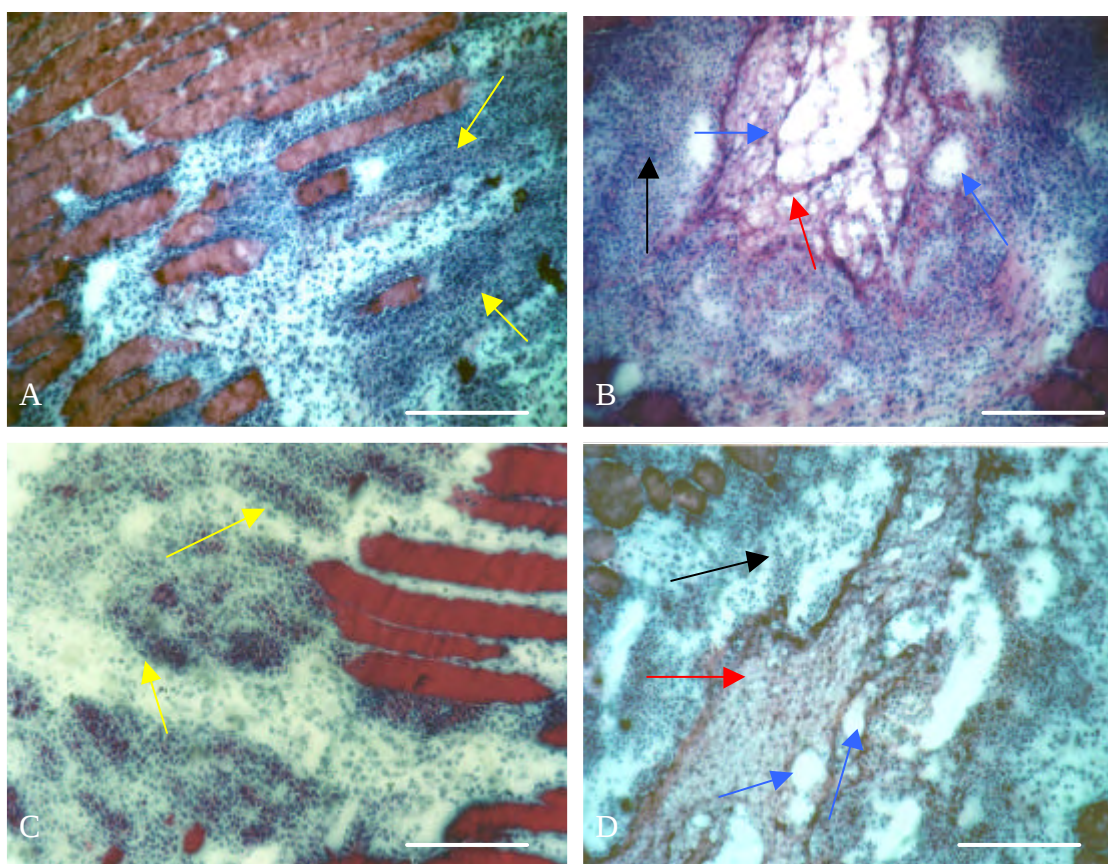


Figura 8. - Fotomicrografia de músculo tibial anterior de animal do grupo A1, que sofreu lesão muscular experimental e foi submetido ao ultra-som contínuo a $0,2\text{W}/\text{cm}^2$ (A e B) e grupo B1 submetido ao ultra-som contínuo a $0,4\text{ W}/\text{cm}^2$ (C e D). Verifica-se em ambos os casos avançado processo de fagocitose dos restos de fibras musculares (seta amarela) com reduzidas áreas necróticas e formação de rede de fibrina (seta vermelha) com estruturas semelhantes a leitos vasculares (seta azul). O infiltrado leucocitário (seta preta) apresenta-se discretamente reduzido em D em relação a B. Observa-se ainda que os restos de fibras musculares fagocitadas (seta amarela) são mais visíveis em A que em C. A- H/E - Barra= $175\mu\text{m}$.-B- H/E Barra= $110\mu\text{m}$. - C- Tricômico de Masson Barra= $175\mu\text{m}$. -D -H/E Barra= $110\mu\text{m}$.

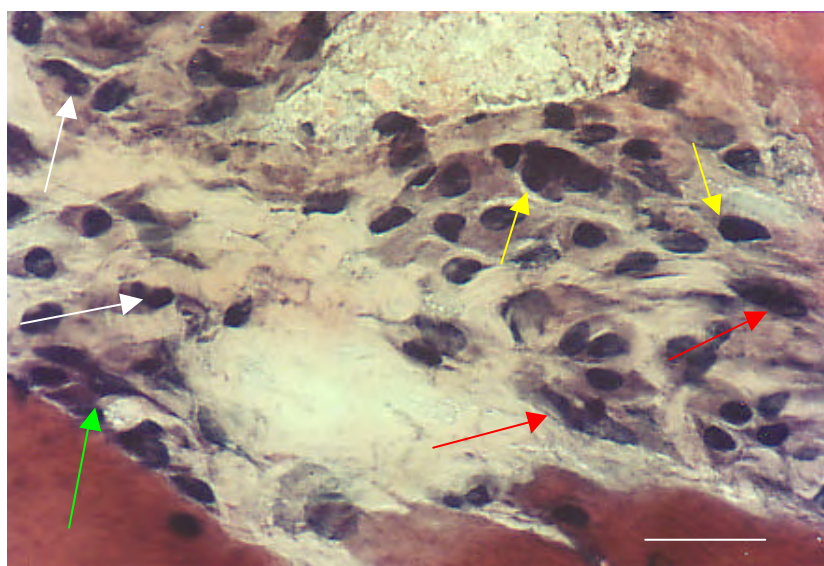


Figura 9. - Fotomicrografia de músculo tibial anterior de animal do grupo B1. Observam-se neutrófilos (seta branca), e macrófagos (seta amarela). É possível verificar a presença de fibroblastos (seta vermelha) e mioblastos (seta verde). H/E Barra = 27 μ m.

Tendo decorrido três dias da lesão, os animais do grupo E3 não submetido ao ultra-som apresentavam ainda grande concentração de polimorfonucleares contornando o sítio da lesão, sendo evidente a presença de restos de fibras musculares sendo fagocitadas em meio à rede de fibrina formada no centro do foco inflamatório. Verificou-se o predomínio de neutrófilos, macrófagos e linfócitos e raros plasmócitos. Aderidos à rede de fibrina, mais internamente à lesão, foi observado o predomínio de neutrófilos (figura 10).

Em algumas áreas é possível identificar a formação de mioblastos e fibroblastos indicando o início da regeneração das fibras musculares e do tecido conjuntivo (figura 11).

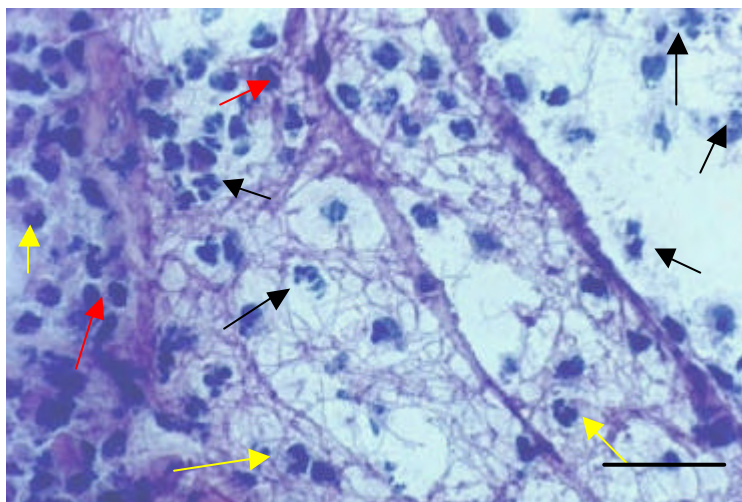


Figura 10 - Fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animal do grupo E3, lesado sem aplicação de ultra-som. Verifica-se o predomínio de neutrófilos aderidos a rede de fibrina na região mais interna da lesão (seta preta), além de macrófagos (seta vermelha) e raros plasmócitos (seta amarela). H/E. Barra= 27µm.

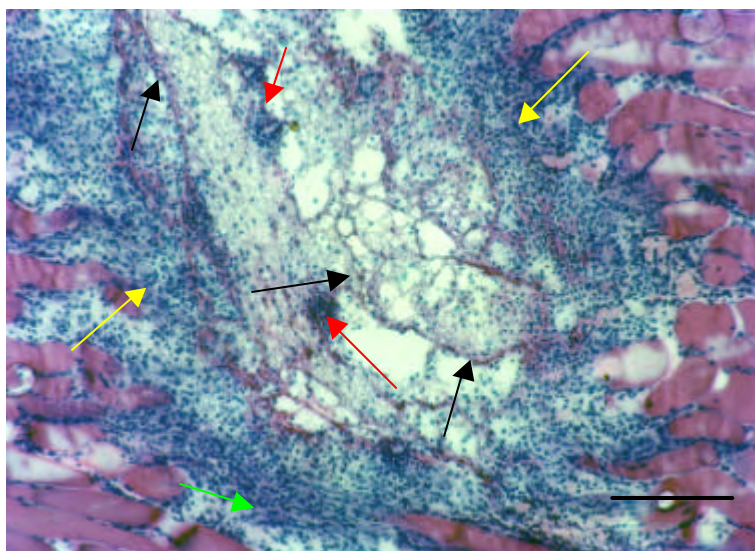


Figura 11- Fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animais do grupo E3, lesados e não submetidos ao ultra-som. Nota-se o predomínio de polimorfonucleares contornando o sítio da lesão (seta amarela) e restos de fibras musculares sendo fagocitados (seta vermelha) em meio à rede de fibrina (seta preta). É possível notar a presença de mioblastos (seta verde). H/E. Barra=175µm.

Nos animais do grupo C3 e D3 não foram observadas alterações com o passar dos dias, as micro-lesões estavam presentes com discretos infiltrados e presença de fibroblastos na tentativa de regeneração do tecido conjuntivo (figura 12).

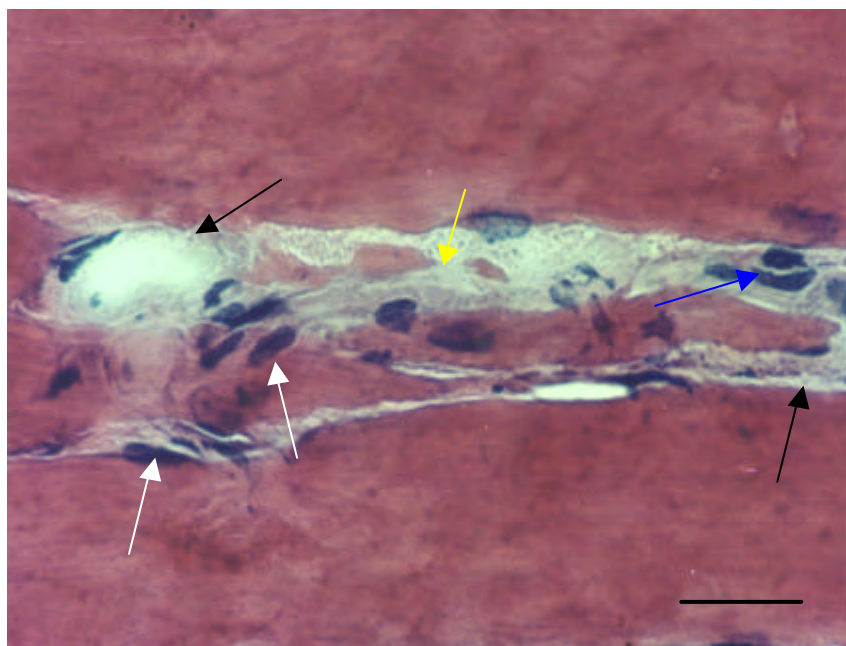


Figura 12 - Fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animais dos grupos C3 e D3, submetidos ao ultra-som sem lesão experimental. Presença de micro-lesões (seta preta) com discreto infiltrado (seta amarela), fibroblastos (seta azul) e células satélites ativadas (seta branca). H/E. Barra=27 μ m.

Nos animais lesionados submetidos ao ultra-som, após três dias de tratamento foi possível verificar a presença constante de mioblastos e fibroblastos já enfileirados iniciando a formação de miotubos e um tecido conjuntivo mais desenvolvido, respectivamente (figura 13).

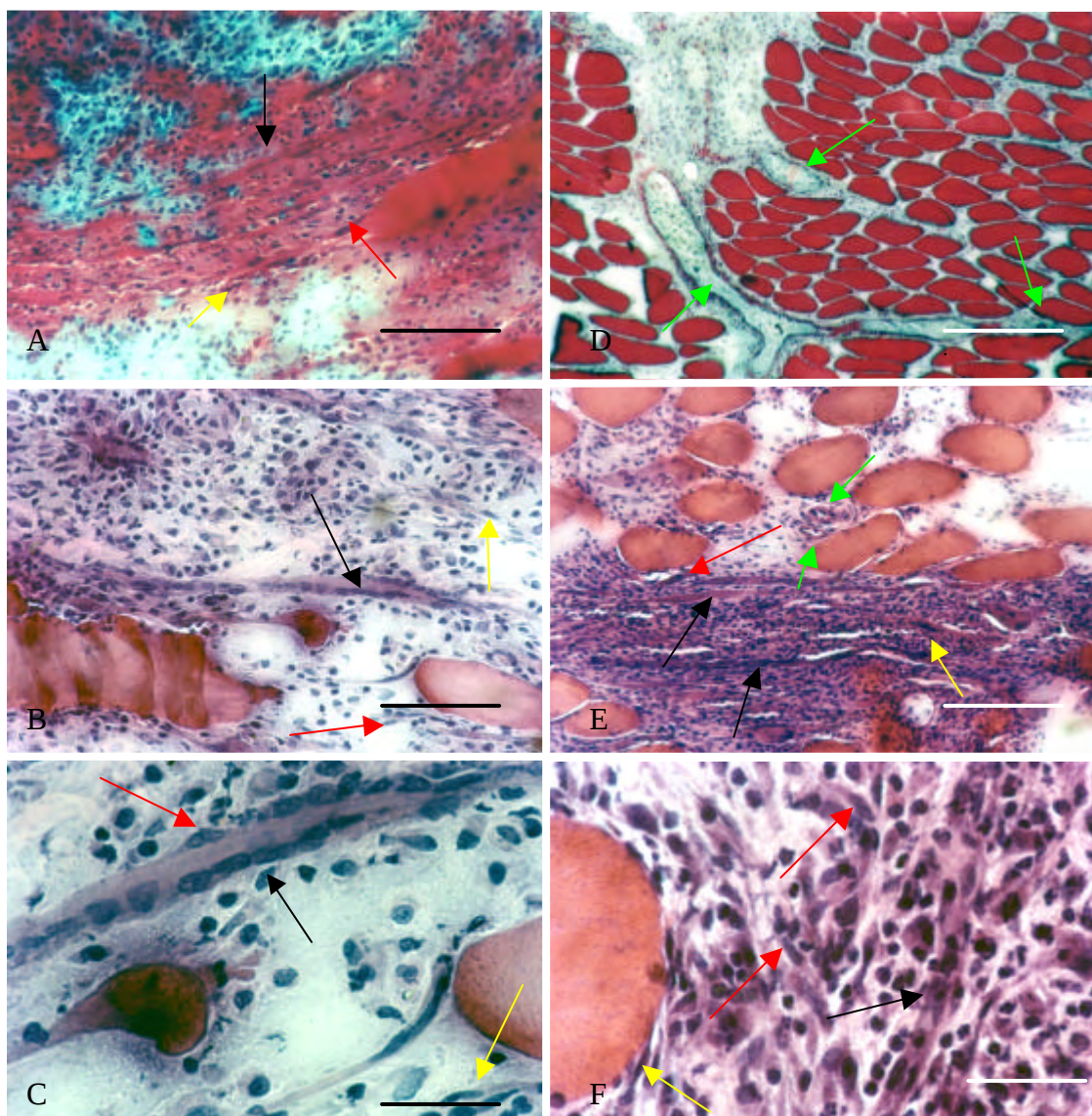


Figura 13 - Em A, B e C observa-se fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animais do grupo A3. Nota-se a grande concentração de mioblastos (seta vermelha) e fibroblastos (seta amarela) e a presença de miotubos (seta preta) iniciando a regeneração muscular. Em D, E e F observa-se fotomicrografia de corte longitudinal do músculo tibial anterior de animais do grupo B3, onde se nota além da concentração de mioblastos (seta vermelha), fibroblastos (seta amarela) e formação de miotubos (seta azul), grande concentração de vasos neoformados (seta verde). A - Tricômico de Masson. Barra=70 μ m. B - H/E. Barra=70 μ m. C - H/E. Barra=27 μ m. D - Tricômico de Masson. Barra=175 μ m. E - H/E. Barra=110 μ m. F - H/E. Barra=27 μ m.

Alguns restos de fibras musculares ainda são fagocitados e este infiltrado celular tem grande concentração de macrófagos.

Nesta fase já foi possível observar a formação de neovasos, tanto na área de lesão como em regiões vizinhas. Comparando os animais do grupo A3 e B3 verificamos que no segundo houve uma maior proliferação de vasos neoformados (figura 13).

Após sete dias de lesão muscular nos animais do grupo E7 (não submetidos ao ultra-som), ainda existem fragmentos necróticos no tecido conjuntivo mais desenvolvido, com grande concentração de fibroblastos.

As áreas de hiper-contração são evidentes e nas extremidades lesadas ocorre grande concentração de células satélites provavelmente visando a formação de miotubos (figura. 14).

Nos animais do grupo A7 nota-se a migração de células satélites para as extremidades das fibras musculares (figura 15) visando à proliferação dos mioblastos para a formação de miotubos (figura 16), e em maior concentração que nos animais do grupo E7 (figura 14). Verifica-se ainda maior concentração de fibroblastos e agregação de mioblastos para formação de miotubos com numerosos núcleos enfileirados sugerindo que estas fibras crescerão organizadamente em direção a área do corte preenchido por tecido conjuntivo, para formar novas miofibrilas e reconstituir as células musculares (figura 17).

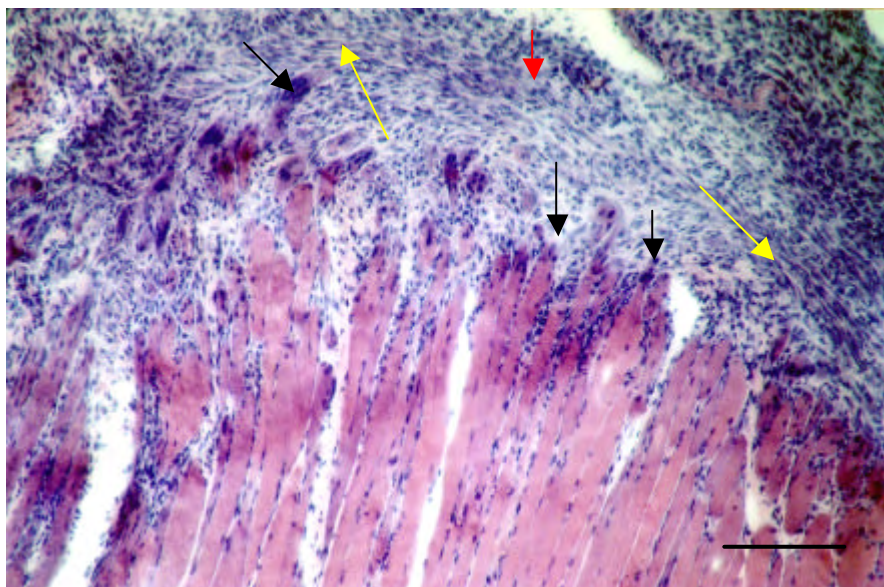


Figura 14 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo E7. Grande concentração de fibroblastos (seta amarela) em tecido conjuntivo mais desenvolvido (seta vermelha). Concentração de células satélites nas extremidades das fibras musculares (seta preta). H/E. Barra=175µm.



Figura 15 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo A7. Grande concentração de células nas extremidades das fibras lesadas (seta amarela) para favorecer a formação de miotubos (seta verde). Aumento do número de fibroblastos (seta branca). H/E. Barra = 175µm.

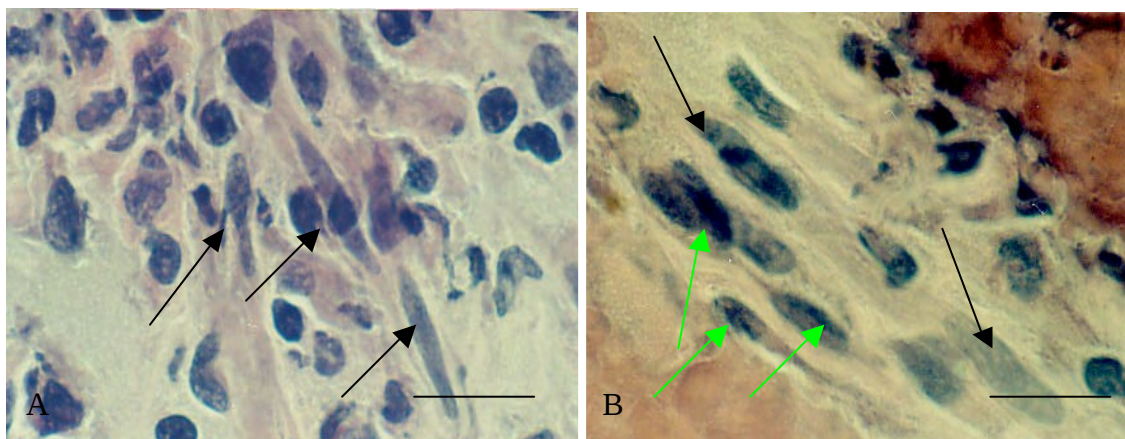


Figura 16 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo A7. Em maiores aumentos é possível verificar a grande concentração de mioblastos (seta preta) e em B células satélites ativadas (seta verde) H/E. Barra 11 μ m.

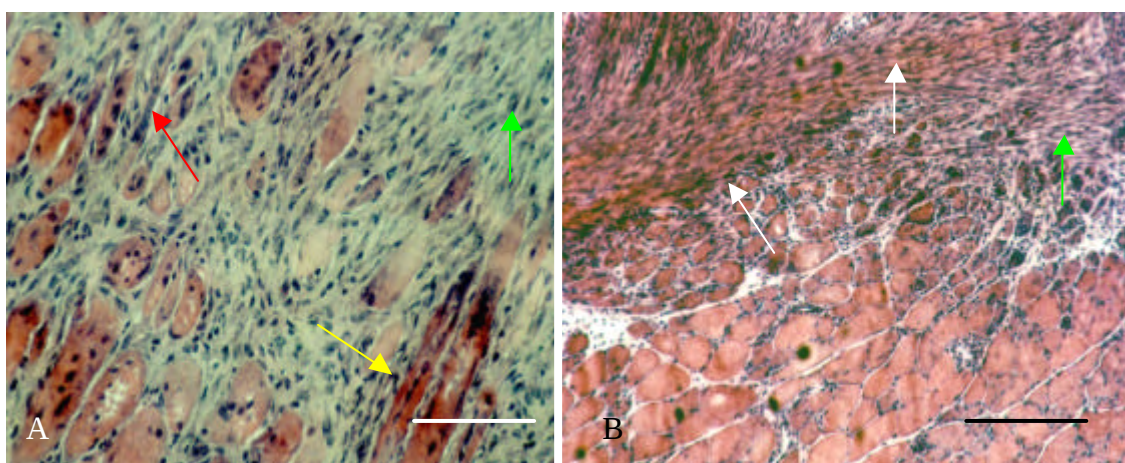


Figura 17 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo A7. Em A nota-se a formação de miotubos pela agregação de mioblastos (seta vermelha), grande concentração de fibroblastos (seta verde) e miotubos já formados com vários núcleos enfileirados (seta amarela). Em B é evidente a grande concentração de fibroblastos (seta verde) e mioblastos enfileirados na tentativa de constituir miotubos (seta branca). Em ambos os casos é notável o aumento do número de fibroblastos. A- H/E Barra=70 μ m. B - H/E Barra=175 μ m.

Nas lâminas obtidas através dos animais do grupo B7, submetidos ao ultra-som de 0,4W/cm² os achados foram bem semelhantes aos

encontrados nos animais do grupo A7, com formações que sugerem o remodelamento das extremidades com estruturas que podem ser consideradas miotubos crescendo na direção da lesão. Ocorre concentração de células sugestivas de células satélites nas extremidades das fibras para formação de mioblastos e enfileiramento dos mesmos em miotubos numerosos, com núcleos dispostos em cadeia na fenda incisinal (figura 18 e 19).

Os fragmentos necróticos estão praticamente extintos em meio ao infiltrado de polimorfonucleares e macrófagos e há uma grande concentração de fibroblastos dissolvidos no tecido conjuntivo (figura 20)

A formação de novos leitos vasculares é cada vez mais evidente.

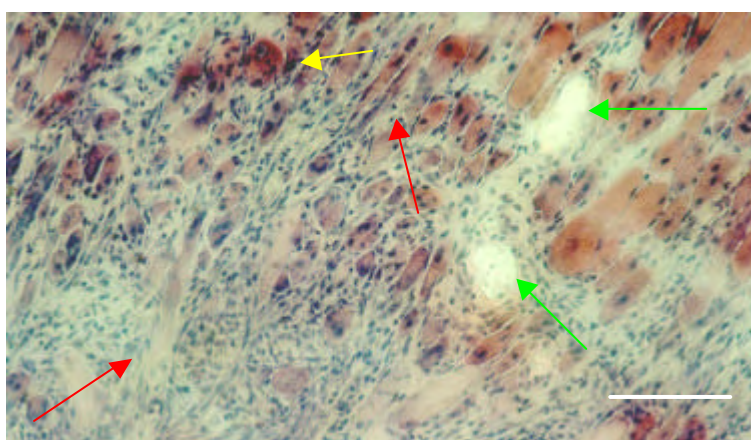


Figura 18 – Fotomicrografia de corte oblíquo de músculo tibial anterior de animais do grupo B7. Concentração de células nas extremidades (seta amarela), estruturas que se assemelham a leitos vasculares (seta verde) e formação de miotubos (seta vermelha). H/E. Barra=110µm.

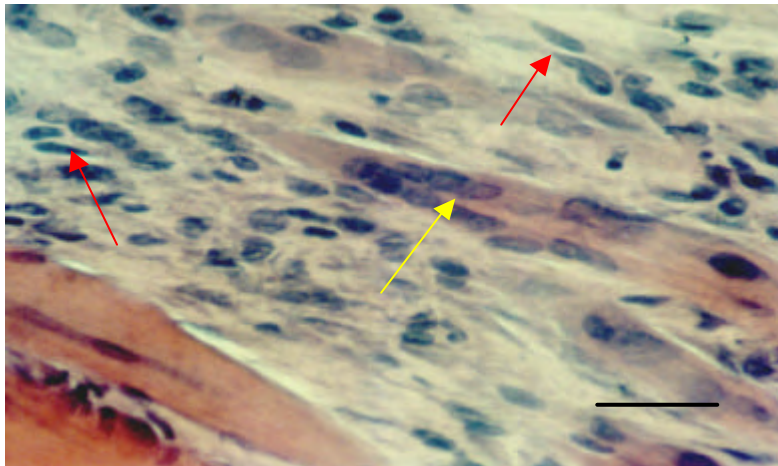


Figura 19 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo B7. Miotubos com núcleos numerosos (seta amarela) e fibroblastos (seta vermelha) em evidência. H/E. Barra=27 μ m.

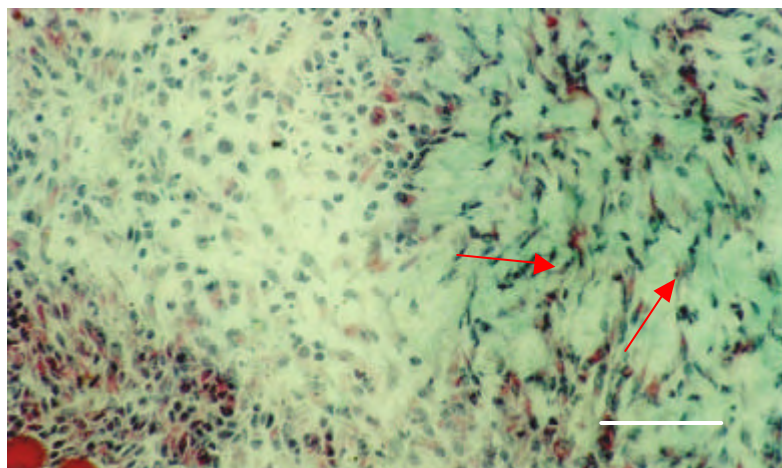


Figura 20 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo B7. Ausência de fragmentos necróticos em meio ao tecido conjuntivo rico em fibroblastos (seta vermelha). T/M. Barra=70 μ m.

Nos animais não lesados e submetidos ao ultra-som de 0,2 e 0,4 W/cm² com 7 e 14 dias de aplicação (grupos C7, D7, C14 e D14) não foram observadas grandes alterações morfológicas nas fibras musculares além de algumas áreas de hiper-contracção e micro-lesões consideradas normais em todos os grupos, submetidos ou não ao ultra-som. A concentração de alguns macrófagos e fibroblastos nas áreas de micro-lesões, além do aumento de vasos neoformados foi observado mais nitidamente nos grupos submetidos ao ultra-som 0,4W/cm² principalmente após 14 aplicações de ultra-som (figura 21).

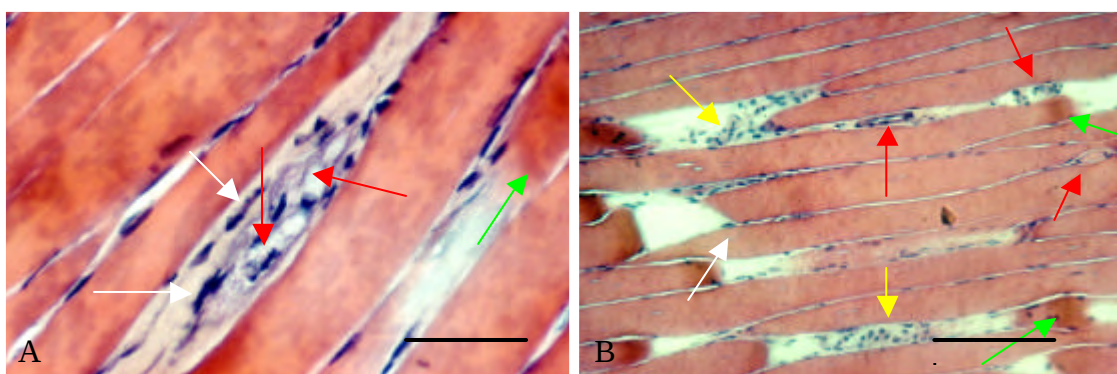


Figura 21 – Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo C7 (A) e D7 (B). Verificamos a presença de micro-lesões com infiltrado moderado (seta amarela) e presença de fibroblastos (seta branca) e vasos neoformados (seta vermelha). Observa-se áreas de hipercontracção (seta verde). A - H/E. Barra=27µm. B - H/E. Barra=110µm.

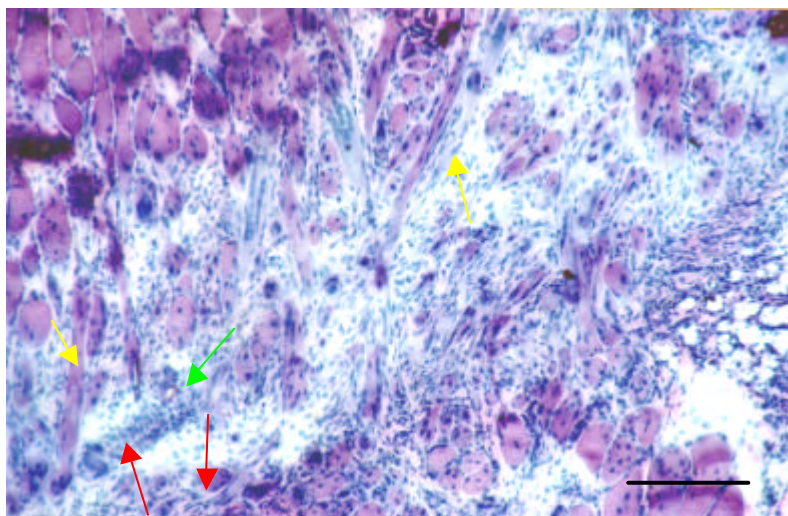


Figura 22 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo E14. Verifica-se o início da formação de miotubos (seta amarela), ainda com a presença de fragmentos necróticos (seta vermelha) e vascularização discreta (seta verde). H/E. Barra=70 μ m.

Nos animais do grupo E14, lesados e não submetidos ao ultra-som é possível notar a presença de miotubos. No entanto verifica-se ainda a presença de fragmentos necróticos das fibras musculares lesadas em processo de fagocitose. O endomísio ainda mostra-se bastante rico em células fagocíticas e a presença de vasos é bem discreta (figura 22).

Nos animais do grupo A14, lesados e submetidos a 14 aplicações de ultra-som a 0,2W/cm² verifica-se a massa muscular em avançado estado de regeneração com a presença de miotubos, grande concentração de fibroblastos. As fibras parecem assumir um avançado estágio de regeneração.

Tal fato pode ser visto freqüentemente nas áreas de menores lesões musculares onde a regeneração é mais fácil. Observamos ainda uma grande aumento na concentração de vasos neoformados (figura 23).

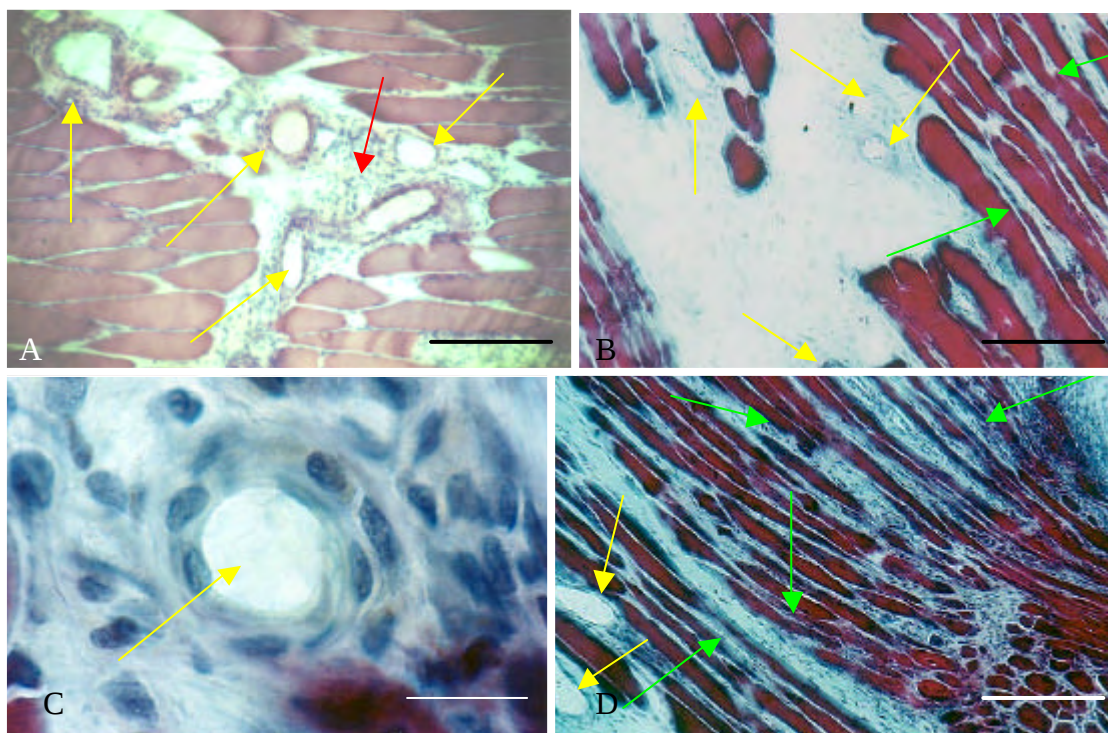


Figura 23 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo A14. Observa-se grande concentração de vasos neoformados (seta amarela) em meio ao infiltrado celular (seta vermelha) e a inexistência de fragmentos necróticos (A - H/E. Barra=110µm.). Em B (T/M Barra=110µm) e D (T/M. Barra = 175µm) notamos a formação de miofibrilas tendendo a constituir uma fibra normal (seta verde). Em C nota-se detalhe de vaso neoformado (seta amarela). H/E. Barra 11µm.

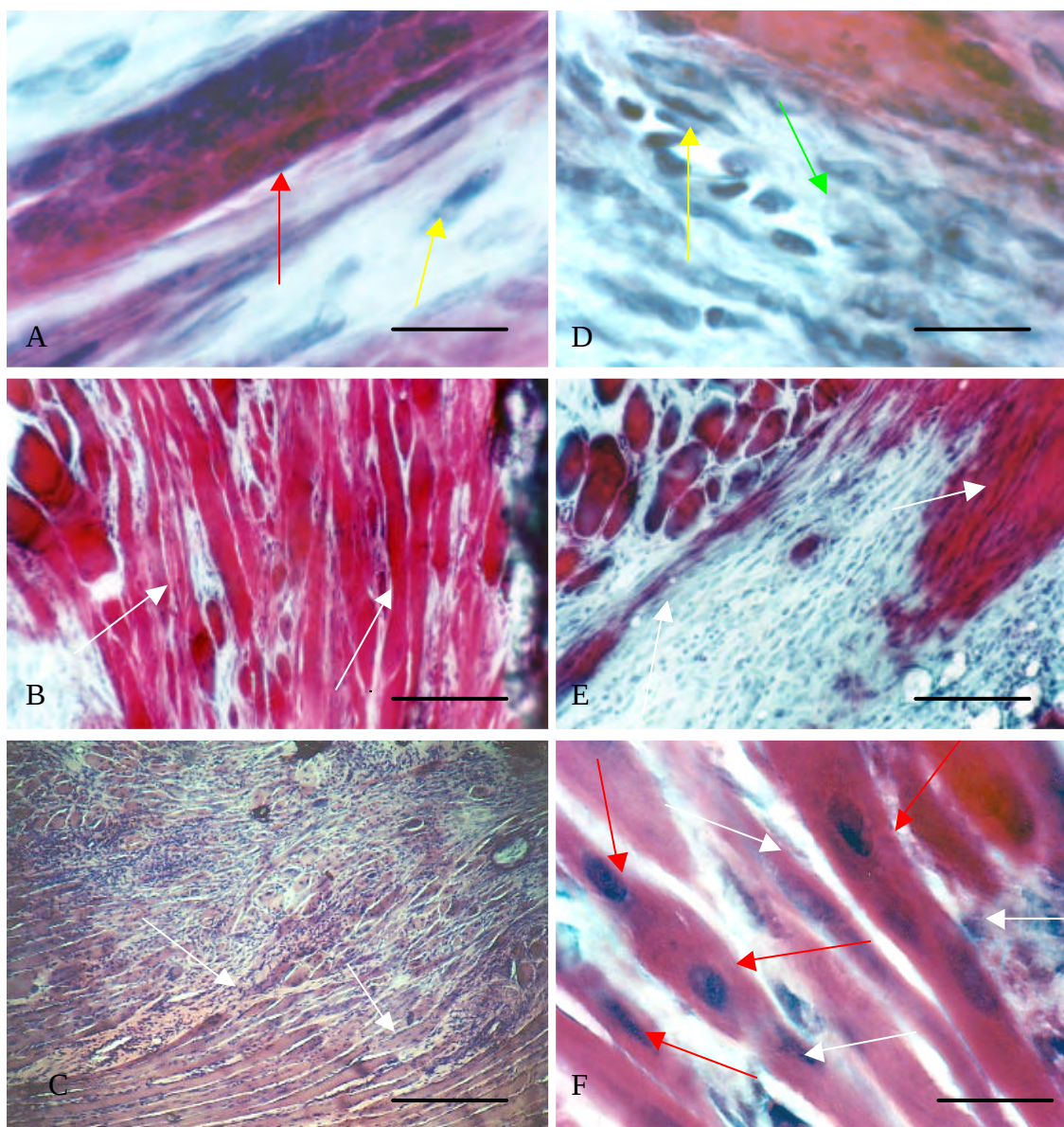


Figura 24 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo B14. Em A e D verifica-se grande concentração de fibroblastos (seta amarela) no tecido conjuntivo (seta verde), (A - H/E. Barra=11 μ m), (D - H/E. Barra=11 μ m). Em A e F (H/E Barra=11 μ m.) é notável a distribuição dos vários núcleos do miotubo (seta vermelha) que se organizam para formar miofibrilas e reconstituir a fibra muscular (seta branca) o que também pode ser observado em C (H/E. Barra=175 μ m) e E. (T/M – Barra=110 μ m). (seta branca)

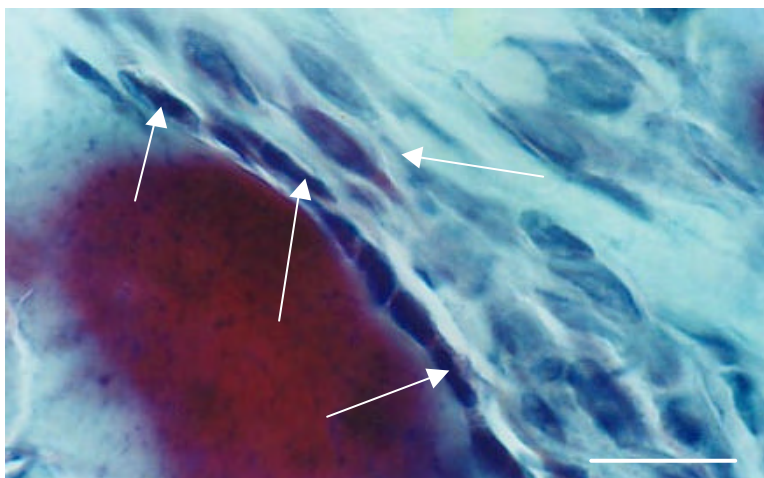


Figura 25 - Fotomicrografia de corte longitudinal de músculo tibial anterior de animais do grupo B14. É possível notar a ativação de células satélites (seta branca) na extremidade da fibra muscular, tendendo a formar miotubos para conduzir ao reparo da fibra muscular. H/E – Barra = 11 μ m.

Nos animais do grupo B14, com musculatura lesada e submetida a 14 aplicações de ultra-som de 0,4W/cm² verifica-se grande concentração de fibroblastos num tecido conjuntivo mais organizado. Inúmeros miotubos com vários núcleos enfileirados organizando miofibrilas na tentativa de reconstituir uma fibra muscular totalmente regenerada (figura 24). Em maiores aumentos verifica-se ainda a presença de células satélites ativadas nas extremidades das fibras musculares (figura 25).

Se considerarmos os indicadores pré-estabelecidos para avaliar o processo de regeneração muscular em relação aos dias e tipos de tratamento obteve-se como resultado:

Grupos	Indicadores				
	INFILTRADO LEUCOCITÁRIO	REDE DE FIBRINA	MIOBLASTOS/ FIBROBLASTOS	NEOVASC.	MIOTUBOS
A1	+++	+++	+	+	
B1	+++	+++	+	+	
E1	+	+++			
A3	+	+	+	+	+
B3	+	+	+	+++	+
E3	+++	+++			
A7	+		+++	+++	+++
B7	+		+++	+++	+++
E7	+	+	+	+	+
A14	+		+++	+++	+++
B14	+		+++	+++	+++
E14	+		+++	+++	+++

6. DISCUSSÃO

É importante ressaltar que nos animais do grupo controle, lesionados e não submetidos ao US o pós-operatório ocorreu sem intercorrências como infecções ou reação inflamatória exacerbada e a regeneração muscular foi considerada normal, acontecendo em um espaço de tempo também considerado normal. Desta maneira cumpriram com o objetivo de controle para os animais que foram submetidos ao tratamento com US.

Os resultados deste estudo demonstraram que os valores de intensidade de 0,2 e 0,4w/cm² das ondas ultra-sônicas, aplicadas nos animais, não causaram entre si diferenças significantes no processo de regeneração muscular, o que pode ser explicado pela pequena diferença entre eles. Tal fato impossibilitou a análise comparativa deste parâmetro em relação à regeneração do tecido estudado o que levou a análise comparativa a ser realizada basicamente entre grupo tratado e não tratado.

Estudos poderão futuramente observar dois fatores importantes para contemplar esta questão: o tempo de insonação pode ser elevado (superior a um minuto – tempo estipulado no estudo), pois ao elevarmos o tempo de exposição do tecido ao US, este estaria mais susceptível aos efeitos do mesmo, sendo eles benéficos ou não. Outro fator importante seria a seleção de valores mais distantes de intensidade, ou seja, 0,2 W/cm² e, por exemplo, 1W/cm² para evidenciar os efeitos produzidos por baixas e altas dosagens de US.

É conhecido que a aplicação de US no modo contínuo apresenta um efeito térmico, por não possuir modulação e dificultar assim a dissipação de calor considerado inexistente no modo pulsado. O modo contínuo foi o primeiro a ser desenvolvido para terapia e o modo pulsado foi introduzido nos anos 60 considerado mais eficiente por permitir sua utilização em doses mais elevadas e ter reduzido risco de efeitos colaterais (GAM, 1995). Com os valores adotados, no entanto, não foi possível registrar diferenças significantes entre os resultados

obtidos neste estudo e os resultados obtidos por NASCIMENTO (2002) com US pulsado, nos mesmos parâmetros, o que talvez ocorra quando valores mais altos de intensidade forem eleitos.

Estudos *in vivo* com aplicação de US contínuo com frequência de 1MHz e intensidade de $2,5 \text{ W/cm}^2$ na articulação do quadril de porcos mostrou que após 1 minuto de aplicação ocorreu o aquecimento de apenas um grau da parte anterior da cápsula articular, o que segundo o autor é considerado um aumento normal equivalente ainda ao estado de repouso do animal, ou seja, valores maiores de aquecimento são notados durante a atividade física. Para obter um aquecimento entre 43°C e 44°C foi necessário uma aplicação superior há 3 minutos ou uma intensidade de $3,0 \text{ W/cm}^2$ numa frequência de 0,75MHz. (BAKER, 2001).

DRAPER *et al* (1995) mostrou em um estudo realizado no músculo gastrocnêmio humano submetido a 10 minutos de aplicação de Us contínuo na frequência de 1MHz e intensidade de $1,5 \text{ W/cm}^2$ que o músculo teve um aumento de temperatura de 5°C . Estes investigadores enfatizaram a necessidade de limitar a área insonada e consideraram necessário submeter o tecido ao US durante pelo menos 7 a 8 minutos para alcançarem uma elevação da temperatura.

Apesar deste estudo não ter tido o objetivo de avaliar especificamente o aquecimento produzido pelo US contínuo, e não ter parâmetros para indicá-lo, a semelhança dos resultados obtidos com o US pulsado leva a creditar que os valores de intensidade selecionados foram insuficientes para produzir diferenças evidentes entre os dois modos, ou ainda que o tempo de aplicação foi insuficiente para apontar tais diferenças relacionadas ao efeito térmico esperado no modo contínuo de US, o que como relatado pelos autores acima citados, nem sempre é observado nos estudos realizados com US contínuo.

Comparando os resultados obtidos entre os animais tratados e os não tratados verifica-se que os animais lesados e tratados com US mostraram nas análises histológicas um padrão de regeneração levemente diferente dos animais controles. O desaparecimento precoce da rede de fibrina já no terceiro dia nos animais submetidos ao US sugere uma aceleração no metabolismo das células fagocíticas promovendo, com maior intensidade, a

limpeza do foco inflamatório e dos restos celulares, propiciando assim a infiltração da matriz extracelular produzida pelos fibroblastos.

JOZSA & KANNUS (1997) afirmaram que a fibrina e a fibronectina formam ligações transversas com o colágeno resultando numa estrutura que estanca o local hemorrágico e na fase inicial de reparo funciona como resistência às forças de tensão. Esta rede de fibrina que se forma vai servir de suporte para a migração de polimorfonucleares, e segundo a literatura consultada, destacam-se os neutrófilos e alguns eosinófilos (ROBBINS, 2000). Esta diferenciação dos polimorfonucleares, entretanto, não foi possível devido às técnicas de coloração utilizadas não serem específicas a este propósito.

Segundo HASSELMAN *et al.* (1995) e HURME (1992) a rede de fibrina origina-se do edema formado no local da incisão, e em menor parte é sintetizada pelos fibroblastos, e prepara um esqueleto para a invasão dos fibroblastos e possibilita a ativação de células satélites propiciando a miogênese.

GOUVEA *et al.* (1998), usando o ultra-som terapêutico pulsado (frequência de 1 MHz, intensidade de 0,5 W/cm², pulsado 1:5, durante 5 minutos) propuseram-se a estudar a regeneração de fibras musculares do músculo tibial anterior de ratos, mediante lesões chamadas pelos autores de "incisivas". Também admitem que o padrão histológico do músculo lesado e tratado com ultra-som foi muito diferente do padrão histológico do músculo controle. A reação inflamatória foi acelerada pelo ultra-som, o que possibilitou a remoção mais eficiente das fibras necróticas do músculo. Apresentou maior número de vasos e fibras recém-formadas. Tais fatos foram comprovados pelos resultados deste estudo uma vez que os animais tratados apresentaram diminuição do tecido fibrótico e aceleração do processo de regeneração muscular.

Os animais tratados com US contínuo a partir do terceiro dia já apresentavam aumento da neovascularização e da ativação de células

satélites para transformação em mioblastos e conseqüente formação de miotubos. A remoção das fibras necróticas mostrou-se bem acelerada devido à quantidade reduzida de fragmentos.

As informações obtidas pelos estudos experimentais que investigam os efeitos de ultra-som na estrutura e função da micro-circulação, e os eventos que acontecem em inflamação aguda são restritos, contudo os clínicos reivindicam que o tratamento ultra-sônico precoce é desejável. (PATRICK, 1978). O aumento do fluxo de sangue à região é freqüentemente listado como um efeito fisiológico da terapia ultra-sônica (DYSON, 1987), e este é freqüentemente o mecanismo responsável por acelerar o reparo tecidual. Vários pesquisadores relataram aumentos de fluxo de sangue arterial durante tratamento com ultra-som (BICKFORD & DUFF, 1953; IMIG *et al.*, 1954; O PAUL & IMIG, 1955; ABRAMSON *et al.*, 1960),

As evidências de neovascularização verificadas neste estudo foram consideráveis e segundo WHITE e HECKLER (1990) a hipóxia local, resultado inevitável do tecido lesionado, é responsável pela angiogênese para restabelecer o fluxo de sangue adequado ao mesmo. JENSEN *et al.*, (1986) verificaram que macrófagos respondem a hipóxia e a altas concentrações de lactato segregando um fator de angiogênese. A partir deste fato, poder-se-ia afirmar que o efeito pró-inflamatório do US acelerando o processo inflamatório estimularia o aumento de macrófagos, que submetidos a uma situação de hipóxia causada pelo US segregariam o fator de angiogênese, o que explicaria o crescimento neovascular observado nos resultados. A exposição a níveis altos de oxigênio causa um impacto que leva a inibição da neoformação de

vasos, quando o gradiente de hipóxia de uma ferida é destruído, o crescimento capilar cessa (KNIGHTON *et al*, 1981).

RUSSEL (1991) em pesquisa utilizando US pulsado verificou grande quantidade de vasos neoformados nos animais estimulados, o que não foi notado nos animais não tratados, no local da área de necrose muscular. O trabalho desenvolvido por BASSOLI (2001) comprova tais evidências do ultra-som pulsado, considerando grande a capacidade do Us pulsado induzir a neoformação de vasos, bem como a constituição de miotubos em maior quantidade e precocemente nos músculos estimulados.

HOGAN *et al* (1982) também demonstraram um aumento da densidade capilar no músculo cremaster de ratos expostos ao US contínuo com intensidade de 2,5W/cm² por cinco minutos, três vezes na semana, sugerindo que o US estimula a angiogênese, apesar de alguns autores (HOGAN *et al.*, 1982a; RUBIN *et al.*, 1990) considerarem as doses utilizadas no estudo incompatíveis com a prática clínica. RANTANEN (1999) não verificou alteração na recapilarização utilizando US de 3MHz a intensidade de 1,5W/cm² durante 6 minutos com transdutor estacionário. Afirmou ter obtido o esperado aumento de células satélites, mas não obteve o mesmo efeito na produção de miotubos. Em relação aos fibroblastos considera que nos animais controle a síntese ocorreu mais rapidamente que nos animais tratados, cuja proliferação estendeu-se por um período de 7 a 10 dias.

HOGAN *et al.* (1982) e RUBIN *et al.* (1990) em seus estudos têm especificamente examinado os efeitos de ultra-som na microcirculação e mostraram que o efeito agudo do ultra-som é a vasoconstrição das arteríolas,

diminuindo o fluxo de sangue. Apesar de alguns autores ainda não reconhecerem os efeitos do US na estimulação da angiogênese os resultados encontrados neste trabalho mostraram-se favoráveis a sua aplicação. Estudos adicionais são necessários para determinar se a redução em perfusão é suficiente para resultar em hipóxia local ou isquemia e se a vasoconstrição relatada é temporária.

Existem evidências de que níveis terapêuticos de ultra-som estimulam a síntese de proteína nos fibroblastos. Aumentos nos níveis de lactato estimulam a atividade da “prolyl hidroxilase”, uma enzima essencial para a síntese de colágeno, e em condições de hipóxia os fibroblastos produzem um polipeptídeo colágeno precursor. (HUNTTON, 1967).

Utilizando US contínuo de 3MHz e intensidades de 0,5 a 2,0W/cm² também foi mostrado que radicais de oxigênio, a “prolina hydroxylate” e a “lysine”, resíduos de colágeno, (TRELSTAD *et al.*, 1981), em baixas concentrações, podem estimular proliferação de fibroblastos (MURRELL *et al.*, 1990).

Nossos resultados mostraram que na maior parte dos animais que compunham os grupos tratados com US, ocorreu maior incidência de fibroblastos e delicadas fibrilas de colágeno, além de mioblastos e miotubos. Estes resultados também foram encontrados por RANTANEN (1999) com indicações de efeitos específicos do ultra-som nas células, particularmente nos fibroblastos. Tal fato indicou que o tratamento com US pode favorecer a formação, pelos fibroblastos, da matriz extracelular, para que as células satélites e outras células indiferenciadas pudessem utilizar como suporte para

migrarem e se organizarem enquanto se diferenciam para a formar os mioblastos que subsequente se fundiriam para originar os miotubos.

Constatamos que os miotubos decorrentes da agregação de mioblastos foram mais precoces nos animais estimulados com o US contínuo que nos animais do grupo controle.

Sabe-se que para que a regeneração muscular seja efetiva, é necessária a presença de células satélites e condições favoráveis para a miogênese. As células satélites são a única fonte de células miogênicas “tronco” no músculo esquelético adulto. Segundo BISCHOFF & HEINTZ (1994), a frequência de células satélites no músculo maduro é da ordem de 5% de todos os núcleos que se situam dentro da lâmina basal, com variações, dependendo da espécie animal e tipo de músculo. As células satélites mantêm-se viáveis mesmo após tratamentos que matam ou alteram as miofibrilas, tais como: esmagamentos, anestésicos locais e venenos; e as células satélites são também mais resistentes à isquemia que as miofibras.

Quando ativadas as células satélites são capazes de cruzar a lâmina sarcolemal da miofibrila em ambas as direções (LIPTON & SCHULTZ, 1979) e migram consideráveis distâncias dentro do músculo (SCHULTZ *et al.*, 1990). Este fato pode explicar a grande quantidade de núcleos nos miotubos, relatada nos resultados deste estudo, decorrentes provavelmente, das células satélites migradas e que, estimuladas pelo US, se constituem em mioblastos e após, em miotubos.

Em 1990, BISCHOFF estudou unidades de célula satélite em cultura retirado de músculo de rato adulto esmagado, para identificar e caracterizar a

sua mitogênese. Observou que a quantidade e a rapidez da regeneração dependeu dos parâmetros de ativação e do ciclo celular das células satélites, o que foi de extrema importância para compreensão dos fatores que governam o recrutamento e proliferação destas células. Relatou ainda que injeção de mitogênico (extrato de músculo) também estimula o crescimento muscular neonatal de rato *in vivo*, o que foi observado pelo aumento do número de mionúcleos por fibra depois do tratamento com extrato de músculo. Sugere ainda que o extrato de músculo estimula a fusão de mioblastos *in vivo*. Isto poderia evidenciar que células satélites quiescentes tornam-se ativas por fatores de crescimento liberados por miofibrilas vizinhas lesadas.

A proliferação continuada das células satélites seria sustentada por fatores miogênicos como fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator insulínico de crescimento (IGF) os quais seriam regulados pelo músculo após a lesão (JENNISCHE & OLIVECRONA, 1987). O aumento considerável no número de células satélites nos animais estimulados com US indica capacidade do US em ativá-las e confirma sua ação na aceleração da regeneração muscular.

BASSOLI (2001), considerando a grande capacidade do US pulsado na indução de neovascularização, atribui a isto parte da recuperação das fibras. Acredita que parte da velocidade da regeneração decorra da ação do US pulsado. Em primeiro lugar pela neoformação vascular que abreviaria a fase necrótica da lesão favorecendo a fibrose; e em segundo lugar aumentando o número de células satélites e sua transformação em mioblastos, estimulando

igualmente a agregação dos mesmos para formação dos miotubos. Estes dados foram comprovados neste trabalho, utilizando o US contínuo.

Não pudemos afirmar pelas lâminas analisadas, se estes miotubos se organizam em alguma direção preferencial ou ao longo do eixo longitudinal do músculo tibial anterior seguindo o padrão de distribuição das fibras originais. Porém observamos que quando a distância entre os cotos seccionados era pequena, estes miotubos se formavam na fenda entre estes cotos, para promover a sua junção e conseqüente regeneração.

Nos casos de distâncias maiores entre os cotos, a regeneração nem sempre é completa, e a região lesada é substituída por um tecido mais resistente sem as mesmas características da fibra inicial. Outros estudos tornam-se pertinentes para acompanhar a regeneração completa do músculo, prolongando o tratamento além da fase considerada aguda.

Pela análise das fotomicrografias, ao observarmos os índices dos indicadores estipulados, notamos que o processo de regeneração foi acelerado nos animais tratados em relação aos não tratados, visto que a rede de fibrina foi mais rapidamente eliminada assim como os restos necróticos das fibras musculares lesadas. Provavelmente devido ao estímulo sobre as células fagocíticas. Observamos ainda que o surgimento de fibroblastos e mioblastos se deu anteriormente nos animais tratados, porém com o passar dos dias os animais não tratados também apresentaram estas estruturas, mesmo que de uma maneira mais discreta.

A neovascularização, outro fator considerado de extrema importância para a aceleração do processo regenerativo do tecido muscular, no entanto, foi

algo que ocorreu preferencialmente nos animais tratados, em especial naqueles tratados com intensidade de $0,4 \text{ W/cm}^2$.

Por fim, a aceleração de todo o processo pela ação do US levou a formação mais precoce de miotubos nos animais tratados.

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados com a aplicação de US contínuo, nas intensidades de 0,2 e 0,4W/cm² em ratos com lesão incisiva do músculo tibial anterior, nos levaram a concluir que:

- O tempo de insonação e os valores de intensidades selecionados não permitiram avaliar diferenças significativas entre eles e entre o modo contínuo e pulsado;
- a fagocitose dos restos necróticos das fibras lesadas foi mais eficiente nos animais tratados com US, independentemente da intensidade utilizada;
- o surgimento de fibroblastos e mioblastos (pela ativação das células satélites) foi antecipado com o US;
- a angiogênese foi estimulada principalmente nos animais submetidos ao US 0,4W/cm²;
- a formação de miotubos ocorreu mais precocemente nos animais estimulados com US.

Desta maneira admitimos que o US favorece o processo de regeneração muscular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, D.I.; BURNETT, C.; BELL, Y.; TRUCK, S.; REJAL, H. & FLEISCHER, C.J. (1960). Changes in bloodflow, oxygen uptake and tissue temperatures produced by therapeutic physical agents. Effect of ultrasound. American Journal of physical medicine. V. 39, 51-62.

ANDERSEN, J. L.; SCHJERLING, P.; SALTIN, B. (2000). Muscle, genes and athletic performance. Scientific American, v.283, n3, p.30-7, Sept.

ARMSTRONG, C. F.; FISCHMAN, D. A. (1994). Morphogenesis of skeletal muscle fibers. In ENGEL, A. G.; BANKER, B. Q. Myology basic and clinical. Palatino: McGraw-Hill Book Company, v.1, chapter 2, p. 74-93.

BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. (2001). A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. Physical Therapy, v.81, n. 7, p.1351-11358, July.

BASSOLI, D. A. (2001). Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica. São Carlos. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BICKFORD, r.H.; DUFF, R.S. (1953). Influence of ultrasonic irradiation on temperature and blood in microvessels. *Microvas Res.* v. 7, p. 131-143.

BISCHOF, R. (1990) Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. *Developments*, v 109, p 943-52.

BISCHOFF, R. & HEINTZ, C. (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev. Dyn.* v. 201, p. 41-54

BOGLIOLO, L.; PEREIRA, F. E. L. (1998). Inflamação In: BOGLIOLO, L. *Patologia*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,

BROWN, M. C.; HOLLAND, R. L.; HOPKINS, W. G. (1981). Motor nerve sprouting. *Ann. Rev. Neurosci.*, v.4, p.17-42.

CARLSON, B. M.; HANSEN – SMITH, F. M.; MAGON, D. K. (1979). The life history of a free muscle graft. In: MAURO, A. *Muscle Regeneration*. New York: Raven Press.

CUNHA, A. (2001). Ação do ultra-som terapêutico no processo de reparo do tendão em rato. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos p. 59.

DRAPER, D. O. ;CASTEL, J. C.; CASTEL, D. (1995). Rate of temperature increase in human muscle during 1MHz and 3MHz continuous ultrasound. J. Orthop. Sports Phys. Ther. V.22, p. 142-150.

DYSON, M. (1987) Mechanisms involved in the therapeutic ultrasonic. Physiotherapy v.73, n.3, p.116-20, Mar.

DYSON, M. (1990). Role of Ultrasound in Wound Healing. In: KLOTH, L. C. et al. (eds). Alternatives in Wound Management. Phyladelphia: F.^a Davis. p. 259-284.

DYSON, M.; POND, J.B.; JOSEFH,J. & WARWICK, R. (1968). The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. Cin. Sci. v. 35, p. 273-285.

DYSON, M.; SUCKLING, J (1978). Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. Physiotherapy, v.64, n.4, p. 105-8, apr.

FERRARI, A. L. (1987). Estudos dos mecanismos de cavitação em meio biológico. São Carlos, 133 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FISCHMAN, D.A. (1972). The development of striated muscle. In: BOURNE, G. The structure and function of muscle. New York: Academic Press.

FREDERICK, J. R. (1965). Ultrasound engineering. New York, John Willey & Sons. 379p.

FRIZZEL, L. A.; DUNN, F. (1984). Biophysics of ultrasound. In: Lehman J. F. Therapeutic heat and cold. 3.ed. London, Williams & Wilkins. Cap. 8-10, p.353-562.

FUKADA, E.; YASUDA, I. (1957). On Piezoelectric Effect of Bone. Journal of Physical Society of Japan. v.12, n.10, p.1152-62, Oct.

FYFE, M. C.; CHAHL, L. A. (1982). Mast Cell. Degranulation: A Possible Mechanism of Action of Therapeutic Ultrasound. Ultrasound in Medicine and Biology, v. 8 (Suppl): 62.

GAM, A.N. & JOHANNSEN, F. (1995). Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: a meta-analysis. Pain. v. 63, p. 85-91.

GARAVELLO, I.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H. & ANDRADE, J.M. (1997). Efeitos térmicos do ultra-som terapêutico sobre os tecidos ósseo e muscular e sobre placa metálica implantada. Res. Bras.Ortop. v. 32 (6), p. 473-479.

GARRETT, K.L.; LAI, M.C.; BEILHARZ, M.W. & GROUNDS, M.D. (1991). Identification of muscle precursor cells in vivo using MyoDI and myogenin probes. J. Cell Biochem. v. 15, p. 24.

GOGIA, P.P. (1995). Physiology of Wound Healing. In: Clinical Wound management. Ed.1. United States of America: SLACK Incorporated,. cap. 1, p.1-12.

GOUVÊA, C. M. C. P.; VIEIRAL, P. M. N. & AMARAL, A. C. (1998). Efeito do ultra-som na recuperação de músculo tibial anterior de rato lesado. Rev. Univ. Alfenas, v.4, p.165-173.

GUIRRO, E. & GIRRO, R. (1996) Fisioterapia Estética. Ed. Manole. 2ed. São Paulo.

GUIRRO, E.C.O.; GUIRRO, R.R.J. (1992). Fisioterapia em estética: fundamentos, recursos e patologias. São Paulo: Manole.

GUIRRO, E.C.O. (1999). Bioefeitos induzidos por ultra-som em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Estudo *in vitro*. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

HADAAD, S. (1992). Estímulo do testículo de ratos pré-púberes e adultos com ultra-som pulsado de baixa intensidade. Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

HASSELMAN, C. T.; BESTT, M.; SEABER, A. V.; GARRET, W. E. (1995). A threshold and continuum of injury during active stretch of rabbit skeletal muscle. Am. J. Sports Med. v. 23(1) p. 65-73.

HILL, C. R. (1972). Ultrasonic Exposure Threshold for Changes in Cell and Tissues. The Journal of the Acoustical Society of America, v. 52, p. 667-72.

HOGAN, R. D. , BURKE, K. M. & FRANKLIN, T. D. (1982). The effect of ultrasound on hemodynamics in skeletal muscle: Effects during ischemia. Reserch, v. 23, 370 – 379.

HOOGLAND, R. (1989). Terapia ultra-sônica. Articulon. 1434.765. B.V.. Enraf-nonius Delf.

HUTTON, J. J., TAPPEL, A. L. & UDENFRIEND, S. (1967). Co-factor and substrate requeriments of collagen proline hydroxylase. Archives of Biochemistry. 118, 231.

HURME, T.; KALIMO, H. (1992). Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Medicine and Sciences in Sports and Exercise*, v.24, n.2, p.197-205.

IMIG, C.G.; RANDALL, B.F. & HINES, H.M. (1954). Effect of ultrasonic energy on bloodflow. *American Journal of Physiology*. v. 53, p. 100-102.

JENNISCHE, E. & OLIVECRINA, H. (1987). Transient expression of insulin-like growth factor i immunoreactivity in skeletal muscle cells during postnatal development in the rat. *Acta Physiol. Scand.* v. 131, p. 619-622.

JENSEN, J. A.; HUNT, T. K.; SCHEUENSTUHL, H. & BANDA, M. J. (1986). Effect of lactate, pyruvate, and pH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages. *Laboratory investigation*, v. 54, p. 574-578.

JÓZSA, L.; KANNUS, P. (1997) *Human Tendons*. United States of America: Human Kinetics.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1995). *Histologia Básica*. 8.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1999). *Histologia Básica*. 9.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

KITCHEN, S.S. & PARTRIDGE, C.J. (1990.) A review of therapeutic ultrasound part I and II. *Physiotherapy* n. 76, p. 593-599.

KNIGHTON, D.R.; SILVER, I. A. & HUNT, T. K. (1981). Regulation of wound-healing angiogenesis – Effects of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* 90, p. 262-270.

LEECH, S.J. (1997) Review of muscle healing. *Journal of Physiotherapy* 33:15-18.

LEITE, A. J. (1989). Quantificação da ruptura celular produzida por Ultra-som em eritrócitos do sangue humano. Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo.

LIPTON, B.H.; SCHULTZ, E. (1979). Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. *Science*, v. 205, p. 75-80.

MALTIN, C. HARRIS, J. B.; CULLEN, M. J. (1983). Regeneration of mammalian skeletal muscle following the injection of the snake-venom toxin, paipoxin. *Cell. Tissue Res.*, v.232, p. 565-77.

MAXWELL, L. (1992). Therapeutic ultrasound: its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. *Physiotherapy*, v. 78 (6), p. 421-426.

MORTIMER JR, A.; DYSON, M (1988). The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.14, n.6, p.499-506.

MURREL, G. A. C., FRANCIS, M. J. O. & BROMLEY, L. (1990). Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochemical Journal*, v. 265, p. 659 –665.

NASCIMENTO, R. S. T. R. (2002). Estudo experimental dos efeitos do ultrassom terapêutico, onda pulsada sobre o processo de regeneração do tecido conjuntivo e músculo esquelético em ratos wistar. Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro.

OKUNO, E.; CALDAS, I.L.; CHOW, C. (1986). Física para ciencias biológicas e biomédicas. São Paulo, Harba, 490p.

PARIZOTTO, N. A. (1998). A ação do Laser de Hélio-Neônio sobre o processo de reparo tecidual: Um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura, microscopia de força atômica e

espectroscopia por infravermelho. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas.

PATRICK, M.K. (1978). Applications of pulsed therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v. 64, p. 103-104.

PAUL, W.D. & IMIG, C.J. (1955). Temperature and blood flow studies after ultrasonic irradiation. *American Journal of Physical*, v. 34, p. 370-375.

RAMIREZ, A.; SCHWANE, J. A.; McFARLAND, C.; STARCHER, B. (1996). The effects of Ultrasound on Collagen Synthesis and Fibroblast Proliferation *in vitro*. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, p.326-332.

RANTANEN, J.; THORSSON, O.; WOLLMER, P.; HURME, T. & KALIMO, H. (1999). Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle. *American Journal of. Sports. Medicine*, v.27, n.1, p.54-59.

RICHARDSON, p. d. (1989). Piezoelectric polymers. *IEEE. Medicine and Biology Magazine*, jun.

ROBBINS, S. L. ANGELI, M.; KUMAR, V. (2000). *Patologia básica*. São Paulo: Atheneu, EDUSP.

ROBERTSON, T.A.; MALEY, M.A.L.; GROUNDS, M.D. & PAPADIMITRIOU, J.M. (1993). The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Experimental Cell Research* 207:321-331.

ROEBROECK, M.E.; DEKKER, J. & OOSTENDORP, R.A.B. (1998). The use of therapeutic ultrasound by physical therapists in dutch primary health care. *Physical therapy* 78(5):470-478.

ROSS, M. H.; ROWRELL, L. J. (1993). *Histologia: texto e Atlas*. 2ed. São Paulo, Panamericana.

RUBIN, M. J.; ETCHION, M. R.; CONDRA, K. A.; FRANKLIN, T. D.; SNODDY, A. M. (1990) – Acute effects of ultrasound on skeletal muscle oxygen tension, blood flow and capillary density. *Ultrasound in Med & Biol*. V.16, n. 3p.271-277

RUSSEL, B.; DIX, D. J.; HALLER, D. L.; JACOBSEL, J. (1991). Repair of injured skeletal muscle: a molecular approach. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. V.24, n.2, p.189-196.

SARVAZYAN, A. P. (1983). Some General Problems of Biological Action of Ultrasound. *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics*, v.30, n.1, p.2-12, Jan.

SCHULTZ, E. & DARR, K. (1990). The role of satellite cells in adaptative or induced fiber transformations. In: The dynamic state of muscle fibers. Berlin; Walter de Gruyter, p. 667-680.

SILVA, O. L. (1987). Estudo do mecanismo da ação do ultra-som na estimulação do tecido ósseo. São Carlos. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

TER HAAR, G. (1978). Basic physics of therapeutic ultrasound. Physiotherapy, vol.64, n.4., p.100-103.

TER HAAR, G.; DANIELS, S.; EASTAUGH, K.C.; HILL, C.R. (1982). Ultrasonically induced cavitation in vivo. BR. J. Cancer, vol. 45, supl. 5, n.151.

TER HAAR, G. (1987). Physic of Therapeutic Ultrasound. London, Physiotherapy, v. 73, n.3, Mar.

TRELSTAD, R. L. , LAWLEY, K. R. & HOLMES, L. B. (1981). Non-enzymatic hydroxylations of proline and lisien by reduced oxygen derivatives. Nature, 289, 310 – 312.

WELLS, P. N. T. (1977). Biomedical ultrasonics. London: Academic Press, 635p.

WHITE, M. J. & HECKLER, F. R. (1990). Oxygen free radicals and wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*, v. 17, p. 473-484.

WILLIAMS, P.L.; WARWICK, R.; DYSON, M.;BANNISTER, L.H. (1995) *Gray Anatomia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. V.1.

WILLIAMS, R. A. (1983). *Ultrasound: biological effect and potential hazards*. London, Academic Press.

XAVIER, C.; DUARTE, L. R. (1983). Estimulação ultrtrasônica do calo ósseo. *Revista Brasileira Ortopédica*, v. 18, n. 3, p. 73-80, maio/jun.

YOUNG, S.R.; DYSON, M. (1990). Effects of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesion. *Ultrasonics* 28:175-180,.

YOUNG, S.R.; DYSON, M. (1978). Macrophage Responsiveness to Therapeutic Ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.16, n.8, p. 809-816, 190.

9. ABSTRACT

Skeletal muscle is the most abundant woven of the human body and one of the most adjustable prompt to adaptations. Several researches are developed searching to accelerate the muscular regeneration. Production of personal micro-lesions in muscular fibers for the rigorous exercise, any device preferentially non-punch which assures an acceleration of the repair of the harmed muscle is highly desirable, mainly if it be not linked to a functional and economical damage. US therapeutic ultrasound is one of the many electrofisics agents widely and frequently used in the treatment of muscle-skeletal lesions and soft woven. Principal physical effects involved in the ultrasound therapy are usually classified in thermal effects and non-thermal effects. Principal biological alterations refer to increase of the membranes permeability and cellular diffusion, to increase calcium ions transport through the cells membranes and mastocits disgranulation, to increase protein synthesis in the fibroblasts and incentive the angiogenisys. Twenty seven (27) male and sedentary mice (wistar) with sixty days old were divided in six groups randomly, to value the ultrasound effects in the muscular regeneration process which was accomplished an incisive lesion of 3mm (width) X 3mm (depth) in the previous tibial muscle of the paw right-rear. Mice from four groups were treated with ultrasound in the continuous way kept in frequency of 1 MHz during 1 minute, once a day and intensity of $0,2W/cm^2$ to A and C groups, $0,4W/cm^2$ to B and D groups. E and F groups were not submitted to the ultrasound. After treatment period animals from six groups were sacrificed

to remove their muscles making sheets. Sheets were photographed in optical photomicroscope to register the woven morphologic alterations. We noticed the phagocytes of the necrotics fibers remains harmed was more efficient in the animals treated with US, independently of the intensity used on that, as well as we noticed fibroblasts and mioblastos (for the activation of the satellite cells), the angiogenesis was mainly stimulated in the animals submitted to US, and the myotubes formation occurred earlier on them. And we concluded US favors the muscular regeneration process.