MARIA CRISTINA BALEJO PIEDADE

Avaliação estrutural, estereológica e biomecânica do efeito da aplicação do ultrassom no reparo de lesão lacerativa experimental do gastrocnêmio de rato

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

Programa: Fisiopatologia Experimental

Orientação: Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini

SÃO PAULO 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Piedade, Maria Cristina Balejo

Avaliação estrutural, estereológica e biomecânica do efeito da aplicação do ultrassom no reparo de lesão lacerativa experimental do gastrocnêmio de rato / Maria Cristina Balejo Piedade. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Elia Tamaso Espin Garcia Caldini.

Descritores: 1.Terapia por ultrassom 2.Estereologia 3.Biomecânica 4.Histologia 5.Músculo esquelético/lesões 6.Agentes indutores da angiogênese 7.Colágeno

USP/FM/DBD-319/10

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Carlos e Dirce, pelo amor, carinho e dedicação de sempre. À querida orientadora Profa. Dra. Elia Garcia Caldini, agradeço pela orientação nos passos decisivos da tese. Pelo exemplo, não só de professora, mas de ser humano, disposta a oferecer não somente todo o seu conhecimento, mas também sua paciência, carinho, amizade, tempo e dedicação. Por me acolher generosamente em seu laboratório, me fazendo acreditar na conclusão desta etapa, renovando o entusiasmo para projetos futuros.

AGRADECIMENTOS

À querida Profa. Dra. Claudia Naves Battlehner, agradeço por ter fornecido subsídios didáticos para a elaboração do protocolo e análise estereológica. Pela sua orientação sempre que necessária, pelo carinho, respeito e amizade.

Ao querido Cesar Augusto Martins Pereira, sempre muito prestativo, carinhoso e gentil, agradeço por ter me ajudado a desenvolver o equipamento de lesão e a realizar os ensaios biomecânicos.

Aos Professores membros da Comissão Examinadora da Qualificação, Arnaldo José Hernandez, Olga Maria S. Toledo e Teng Hsiang Wei por sua colaboração com generosidade e sábios conselhos.

À Dra. Mariana Matera Veras, pesquisadora do Laboratório de Poluição Atmosférica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, pelo auxílio na aplicação dos métodos estereológicos e valiosas discussões sobre morfometria.

À Profa. Cláudia Borim da Silva, da Universidade São Judas Tadeu, e ao Dr. Marcelo Alves Ferreira, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos e ajuda na análise estatística.

À amiga de pós-graduação Elizabeth Sabater Alves, pela ajuda e dedicação no preparo do material histológico, desde a microtomia até a montagem das lâminas.

À colega de pós-graduação Nilsa Regina Damaceno Rodrigues e à Maria Iris Amorim, funcionárias do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pelo apoio no processamento histológico.

Às Sras. Cristina Fonseca e à Valeria Sales, secretárias do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, por todo auxílio no trabalho administrativo necessário para que esta pesquisa chegasse a bom termo.

Ao Coordenador do Curso de Fisioterapia da Universidade São Judas Tadeu, Prof. Dr. Rubens C. Araújo, pelos ensinamentos de Fisioterapia e incentivo para continuar a carreira acadêmica. A André Hahne, Maria Leide C. do Rio e Antonio P. da Silva, funcionários da Universidade São Judas Tadeu, pelo suporte técnico e empréstimo do equipamento de ultrassom.

Aos queridos alunos do Curso de Fisioterapia da Universidade São Judas Tadeu, Camila Aparecida Morais, Michelle Nascimento de Souza Santos, Regiane Medeiros Cordeiro, Rosimeire Marcos Felisberto, Vanessa da Silva Souza, por terem me ajudado a fazer a aplicação do ultrassom e cuidar dos animais em toda fase experimental.

Aos amigos e prof(s) do curso de fisioterapia da Universidade São Judas Tadeu pela amizade, incentivo e ajuda sempre que necessário, em especial à Ms. Bianca Elisabeth Thurm, Ms. Flavia de Andrade e Souza e Ms. Juliana Valente Francica.

Aos meus pacientes, que de alguma forma, dividiram comigo as alegrias e contratempos deste período importante da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE GRÁFICOS	v
LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS	vii
RESUMO	х
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais do tecido muscular esquelético	1
1.2 Anatomia do músculo gastrocnêmio no rato	3
1.3 Lesão muscular	4
1.4 Aspectos histopatológicos do reparo da musculatura esquelética	5
1.5 Biomecânica	13
1.5.1 Conceitos básicos em biomecânica: força, tensão e deformação	14
1.5.2 Propriedades de materiais baseadas em diagramas de testes de tração	16
1.5.3 Propriedades biomecânicas do tecido muscular esquelético	20
1.6 Tratamento das lesões musculares	21
1.7 Ultrassom terapêutico	24
1.7.1 Características do ultrassom terapêutico	25
1.7.2 Efeitos térmicos e não térmicos do ultrassom	28
1.7.3 Mecanismo de ação e aplicações do ultrassom no reparo tecidual	32
1.8 Estereologia	39
2. OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo Geral	44
2.2 Objetivos Específicos	44
3. MATERIAIS E MÉTODO	46
3.1 Animais	46
3.2 Grupos	46
3.3 Procedimento cirúrgico	48
3.4 Aplicação de ultrassom pulsado	50
3.5 Eutanásia	52
3.6 Estudo histológico	52
3.6.1 Coleta e Fixação do Material	52
3.6.2 Amostragem estereológica	53

3.6.3 Processamento do material para histologia e método de identificação 3.6.4 Análise estereológica dos volumes e das zonas central e regenerativa	55
e volume da lesão	56
3.6.5. Análise estereológica do volume absoluto, da fração de volume, da área	
de superfície e da fração de área de superfície de vasos sanguíneos	59
3.6.6 Análise estereológica do volume absoluto e da fração de volume	
de fibras colagênicas	61
3.7 Estudo Biomecânico	63
3.8 Análise Estatística	66
4. RESULTADOS	68
4.1 Complicações cirúrgicas e avaliação do material obtido	68
4.2. Análise histopatológica qualitativa	70
4.3 Análise estereológica	81
4.3.1 Volume da lesão	81
4.3.2 Fração de Volume da Zona Central e da Zona de Regeneração	82
4.3.3 Volumes Absolutos da Zona Central e da Zona de Regeneração	84
4.3.4 Fração de volume de vasos sanguíneos na lesão	86
4.3.5 Volume absoluto de vasos sanguíneos na lesão	88
4.3.6 Fração de superfície de vasos sanguíneos na lesão	89
4.3.7 Superfície Total de vasos sanguíneos na lesão	90
4.3.8 Fração de volume de fibras colagênicas na lesão	92
4.3.9 Volume total de fibras colagênicas na lesão	93
4.4 Estudo biomecânico	95
4.4.1.Tensão máxima	96
4.4.2 Rigidez	98
4.4.3 Deformação relativa percentual	100
5. DISCUSSÃO	102
6. CONCLUSÃO	124
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Ilustração esquemática das 4 zonas diferentes que se modificam durante o processo de reparo: zona central (ZC); zona de regeneração (ZR) e zona preservada (ZP).
- **Figura 2** Ilustração esquemática do reparo do músculo esquelético ao longo dos dias após lesão traumática.
- **Figura 3 –** Ilustração do diagrama de força X deformação absoluta.
- **Figura 4 –** Ilustração do diagrama de tensão X deformação relativa.
- Figura 5 Fotografia do equipamento para obtenção de lesões musculares lacerativas homogêneas.
- **Figura 6 –** Fotografias ilustrando a incisão na pele do animal
- **Figura 7 –** Fotografia mostrando o posicionamento da pata para a realização da lesão.
- Figura 8 Fotografias do equipamento para lesão muscular lacerativa
- Figura 9 Fotografia mostrando o procedimento de aplicação do ultrassom na pata do rato.
- Figura 10 Ilustração do músculo incluído em agar mostrando o eixo vertical no qual as fatias musculares foram obtidas, segundo o método de cortes verticais uniformes randômicos.
- Figura 11 Ilustração do método de contagem de pontos aplicado para a avaliação do volume das zonas de central e de regeneração e da lesão como um todo.
- Figura 12 Fotomicrografia de corte histológico da lesão muscular aos 7 dias tratada com ultrassom ilustrando o método morfométrico para colágeno.
- Figura 13 Fotografia mostrando o medidor de altura utilizado para o cálculo da área transversal muscular.
- Figura 14 Fotografia mostrando a perna do rato preparada para o ensaio de tração com fêmur fixado ao cilindro.
- Figura 15 Fotografias mostrando a máquina universal de ensaios mecânicos
- **Figura 16** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido de músculo de um animal do grupo 4C.

- **Figura 17 –** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido de músculo de um animal do grupo 4US.
- Figura 18 Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido de músculo de um animal do grupo 4C.
- Figura 19 A Fotomicrografia 19 corresponde a um corte histológico corado com Picrossírius-hematoxilina e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 4C.
- Figura 20 Fotomicrografia do mesmo corte histológico mostrado na figura 19, (corado com PSH) observado sob luz polarizada.
- **Figura 21 –** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com PSH) e observado luz convencional, obtido de um animal do grupo 4US.
- Figura 22 Fotomicrografia do mesmo corte histológico mostrado na figura 21, (corado com PSH) observado sob luz polarizada.
- **Figura 23** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido, obtido de músculo de um animal do grupo 7C.
- Figura 24 Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido de músculo de um animal do grupo 7US.
- **Figura 25** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com PSH) e observado sob luz convencional, obtido de músculo de um animal do grupo 7C.
- Figura 26 Fotomicrografia do mesmo corte histológico mostrado na figura 25, (corado com PSH) observado sob luz polarizada.
- **Figura 27** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com PSH) e observado sob luz convencional, obtido de músculo de um animal do grupo 7US.
- Figura 28 Fotomicrografia do mesmo corte histológico mostrado na figura 27, (corado com PSH) observado sob luz polarizada.
- **Figura 29 –** Fotomicrografia de um corte histológico obtido de um animal do grupo 7US ilustrando grande quantidade de vasos.
- **Figura 30** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com PSH) e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 14C.
- Figura 31 Fotomicrografia do mesmo corte histológico mostrado na figura 30, (corado com PSH) observado sob luz polarizada.
- **Figura 32** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com PSH) e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 14US.

- Figura 33 Fotomicrografia do mesmo corte histológico mostrado na figura 32, (corado com PSH) observado sob luz polarizada.
- **Figura 34** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com PSH) e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 24C.
- Figura 35 Fotomicrografia do mesmo corte histológico mostrado na figura 34, (corado com PSH) observado sob luz polarizada.
- **Figura 36 –** Fotomicrografia de um corte histológico (corado com PSH) e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 24US.
- Figura 37 Fotomicrografia do mesmo corte histológico mostrado na figura 36, (corado com PSH) observado sob luz polarizada.
- Figura 38 Diagrama força X deslocamento gerado durante o ensaio de tração, realizado em um músculo 4USp.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Fenômenos envolvidos na regeneração do músculo esquelético.
- **Tabela 2 –** Média e desvio padrão do peso, em gramas, do músculo gastrocnêmio e resumo do resultado da análise estatística.
- Tabela 3 Média e desvio padrão da Tensão Máxima e resultados da análise estatística para comparação de lesões nos músculos controles (C) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório.
- Tabela 4 Média e desvio padrão da Rigidez e resultados da análise estatística de lesões nos músculos controles (C) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório.
- Tabela 5 Média e desvio padrão de Deformação Relativa e resultados da análise estatística de lesões nos músculos controles (C) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Variação do peso do gastrocnêmio nos diferentes grupos experimentais e na pata íntegra.
- Gráfico 2 Volumes absolutos das lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm3).
- Gráfico 3 Fração de Volume correspondente à Zona Central e à Zona de Regeneração nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em %).
- Gráfico 4 Volumes absolutos da Zona Central nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pósoperatório (média, em mm³).
- Gráfico 5 Volumes absolutos da Zona de Regeneração em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm³).
- Gráfico 6 Fração de Volume de vasos sanguíneos nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em %).
- Gráfico 7 Volume absoluto de vasos sanguíneos em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm³).
- Gráfico 8 Fração de Área de Superfície de vasos sanguíneos nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em %).
- Gráfico 9 Área Superfície total de vasos sanguíneos em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm²).
- Gráfico 10 Fração de Volume de fibras colagênicas nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em %).
- Gráfico 11 Volume total de fibras colagênicas em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pósoperatório (média, em mm³).
- Gráfico 12 Variação da Tensão Máxima em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em kPa).

- Gráfico 13 Variação da Rigidez em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em N/mm).
- Gráfico 14 Variação da Deformação Relativa em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pósoperatório (média, em %).

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

A _A	densidade ou fração de área
Alesão	área da lesão
a/p	área associada a cada ponto
Azc	área da zona central
Azr	área da zona de regeneração
ARE	área de radiação efetiva
b-FGF	fator de crescimento dos fibroblastos básico
С	controle
CG	control group
Ctrl	controle
Drp	deformação relativa percentual
FGF- ß	fator de crescimento dos fibroblastos ß
GC	grupo controle
GT	grupo tratado
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade
	de São Paulo
HE	hematoxilina-eosina
IGF-I	fator de crescimento semelhante à insulina I
IL-8	interleucina-8
IL-1β	interleucina-1β
IUR	isotrópicos uniformes randômicos
JMT	junções miotendíneas
КРа	kilo Pascal
Lv	densidade de comprimento
lf	comprimento final
li	comprimento inicial
LIM	Laboratório de investigações médicas
l/p	relação do comprimento das linhas do retículo pela área
associada a cada p	oonto
Μ	célula muscular preservada
MEC	matriz extracelular

MHz	mega hertz		
MPa	mega Pascal		
N	Newton		
N _A	densidade numérica por área		
NGF	fator de crescimento do nervo		
N∨	densidade numérica		
Ра	Pascal		
PBS	phosphate buffer saline		
Plesão	número de pontos na lesão		
p.o.	pós-operatório		
PSH	picrosirius red-hematoxilina		
PUT	pulsed ultrasound therapy		
Pvasos	número de pontos incidentes nos vasos		
Q _A	densidade numérica por área		
Rig	rigidez		
Sv	densidade ou fração de superfície		
TG	treated group		
TGF-β	fator transformador do crescimento β		
<i>T</i> max	tensão máxima		
TNF	taxa de não uniformidade do feixe		
Toff	tempo off		
Ton	tempo on		
US	ultrassom		
USc	ultrassom contínuo		
USp	ultrassom pulsado / pulsed ultrasound		
V	volume absoluto		
Vcz	central zone volume		
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular		
VL	volume absoluto da lesão / lesion volume		
Vrz	regenerative zone volume		
VUR	verticais uniformes randômicos		
V _V	densidade ou fração de volume		
V _{VZC}	fração de volume da zona central		
V _{VZR}	fração de volume da zona de regeneração		

Vzc	volume absoluto da zona central
Vzr	volume absoluto da zona de regeneração
ZC	zona central
ZP	zona de células musculares preservadas
ZR	zona de regeneração
W	Watts
3	deformação relativa
σ	tensão
∆força	diferença da força
∆def	diferença da deformação absoluta

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do ultrassom pulsado (USp) no reparo muscular em um modelo experimental de lesão lacerativa do músculo gastrocnêmio medial em ratos Wistar. Vinte ratos foram tratados diariamente com USp (50%), 1MHz, 0,57W/cm² de intensidade por 5 min. formando os grupos tratados (GT), e 20 animais constituíram os grupos controle (CG). A análise histológica, morfométrica (usando o método estereológico) e biomecânica (teste de tensão) foi realizada aos 4, 7, 14 e 24 dias após a lesão. As lesões apresentaram um padrão de reparo similar tanto nos GT como nos GC. Os volumes absolutos da lesão (VL) e das zonas central e de regeneração (Vzc e Vzr) diminuíram progressivamente ao longo do processo de reparo tanto nos GT como nos GC. No GT, o VL diminuiu significativamente em todos os dias experimentais, sendo que Vzc uma diminuição significante aos 4 e 7 dias pós-lesão e o Vzr aos 14 dias pós-lesão. A fração de volume de vasos sanguíneos e a fração de superfície de vasos sanguíneos foi maior nos GT aos 4 e 7 dias pós-lesão em relação aos respectivos controles. Apesar de haver uma tendência a um maior volume absoluto de vasos sanguíneos nos GT, a análise estatística mostrou que existe uma maior volume de vasos somente aos 4 dias pós-lesão. Não houve diferença significante na área de superfície total de vasos sanguíneos na lesão quando se comparam os grupos entre si. Houve um aumento significante na fração de volume de fibras de colágeno na lesão nos GT aos 4,7 e 14 dias pós-lesão. Houve um aumento significante na tensão máxima e na rigidez nos GT aos 4 e 24 dias após a lesão. Não houve diferença significante na deformação relativa entre GC e GT. Os resultados sugerem que o USp otimiza a fase inflamatória e estimula as fases proliferativa e de remodelamento, promovendo uma diminuição mais acentuada no volume da lesão, estimulando a angiogênese, assim como, a deposição e a organização do colágeno fibrilar. Os achados histológicos corroboram com os achados biomecânicos, que mostram que os músculos tratados pelo USp tiveram propriedades biomecânicas mais parecidas com as do músculo íntegro.

Descritores: 1.Terapia por ultrassom 2.Estereologia 3.Biomecânica 4.Histologia 5.Músculo esquelético/lesões 6.Agentes indutores da angiogênese 7.Colágeno

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the pulsed ultrasound therapy (PUT) in stimulating muscle repair in an experimental model of lacerative gastrocnemius medialis muscle lesion in 40 Wistar rats. Twenty rats were treated (TG) daily with 1MHz pulsed ultrasound (50%) at 0.57W/cm² for 5 min, and 20 were control animals (CG). Muscle samples were harvested up on postoperative days 4, 7, 14 and 24 for stereological, histological, and biomechanical analyses. The lesions presented similar repair pattern in both TG and CG. The lesion volume (VL) and the central and regenerative zones volumes (Vcz and Vrz) had a progressive deacrease through the post lesion period both in the TG and CG. The VL decrease was significantly greater in the TG in all experimental days, the Vcz decrease was significant in the TG at 4 and 7 days post lesion, and the VRz decrease was significant at 14 days post lesion in the TG. Statistically significant increase was found in the blood vessels volume fraction and in the surface fraction of blood vessels in the TG at 4 and 7 days post lesion compared to respective CG. Although there was a tendency to have a greater blood vessels absolute volume within lesion in the TG, the statistical analysis showed that it was only larger at 4 days after surgery in US treated group. No statistically significant increase was found in the surface total area within lesion in all experimental days between CG and TG. There was a significant increase in the volume fraction of fibrilar collagen within the lesion in the TG at 4, 7 and 14 days post lesion. The biomechanical data showed a significant increase in the maximal stress and stiffness in the TG at 4 and 24 days after lesion, although there was a progressive increase of these variables both in the CG and TG. There was no significant difference in the maximal elongation, between CG and TG.

Our data suggest that the PUT acts as an inflammatory optimizer and stimulates the proliferative and remodeling phases, promoting a greater decrease in the V_L and in the Vcz, stimulating angiogenesis and controlling fibrilar collagen deposition and organization in this experimental model of lacerative gastrocnemius muscle lesion. The histological data are in accordance to the biomechanical data, which shows that the muscles treated by USp have biomechanical properties similar to the noninjuried muscles.

Key words: 1.Ultrasound therapy 2.Stereology 3.Biomechanics 4.Histology 5.Skeletal muscle injury 6.Angiogenesis 7.Collagen

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do tecido muscular esquelético

O músculo esquelético é constituído basicamente por dois componentes principais, as células musculares (também chamadas fibras musculares ou miofibras) e o tecido conjuntivo (considerados também os vasos e nervos). As células musculares ao receberem o estímulo dos motoneurônios α são responsáveis pelo encurtamento contrátil do músculo, enquanto que o tecido conjuntivo promove a união das células musculares individuais entre si e aos ossos, possibilitando a geração de trabalho (YOUNG, HEATH, 2000).

As células musculares esqueléticas são alongadas com o comprimento variando de poucos milímetros, como no músculo estapédio, a 50cm no músculo sartório nos humanos e com diâmetro variando de 15 a 20µm, nos músculos extrínsecos do olho, a mais de 1mm nos músculos treinados de atletas (JÄRVINEN et al., 2005). Cada célula possui um arranjo complexo de filamentos protéicos contráteis e não contráteis e a habilidade do músculo de deformar-se e de recuperar sua forma é dependente dessa malha de filamentos e dos elementos da matriz extracelular do tecido conjuntivo (MALONE et al., 1996).

O tecido conjuntivo presente no músculo cria um suporte mecânico que recebe a força contrátil de cada célula e promove a rigidez estrutural necessária à transmissão de tensão resultando em movimento articular e locomoção eficientes (STONE, 1990). Para tanto o tecido conjuntivo interage estreitamente com as células

musculares, agregando-as em conjuntos hierarquicamente organizados, em níveis cada vez mais complexos, através de bainhas conjuntivas, denominadas endomísio, perimísio e epimísio.

O endomísio é a camada de tecido conjuntivo mais delicada que reveste e separa cada célula muscular individualmente. Nesta localização, o tecido apresenta-se rico em fibras finas de colágeno tipo III (correspondentes às fibras reticulares da histologia clássica), fibras do sistema elástico, capilares e terminações nervosas. O endomísio relaciona-se diretamente com a lâmina basal (rica em colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanos) que reveste cada célula.

A interação entre o conjunto de células musculares e o tecido conjuntivo na região da lâmina basal deve possuir resistência suficiente para suportar cargas de até 1000Kg durante um trabalho de sobrecarga máxima. Para tanto, existem cadeias de moléculas específicas como a distrofina e as integrinas que, direta ou indiretamente, conectam os miofilamentos contrátreis, através da membrana plasmática, à matriz extracelular (KÄÄRIÄINEN et al., 2000a; KÄÄRIÄINEN et al., 2000b; JÄRVINEN et al., 2005).

O perimísio é uma camada de tecido conjuntivo mais fibroso que o endomísio e envolve grupos de 10 a 20 células musculares, formando um fascículo; por fim, envolvendo todo o músculo encontra-se o epimísio, considerada a camada mais resistente e grossa de tecido conjuntivo. Tanto o perimísio como o epimísio contem quantidades maiores de fibras de colágeno tipo I (fibras colágenas propriamente ditas) que fibras reticulares (formadas por colágeno tipo III).

Além da população de células musculares típicas no músculo esquelético maduro, há ainda outra população de células, conhecidas como células satélites, de aspecto relativamente indiferenciado que se localizam ao longo de toda

extensão da célula muscular pelo lado interno de sua lâmina basal. Demonstrou-se que são estas as células responsáveis pela regeneração do músculo esquelético pós-lesão, mantendo a morfostase tecidual nos casos de morte celular fisiológica ou injúria (ALAMEDDINE et al., 1989; ALLEN;, RANKIN, 1990; BISCHOFF, 1990).

1.2 Anatomia do músculo gastrocnêmio no rato

O músculo gastrocnêmio de rato é constituído por duas cabeças principais que são consideradas músculos distintos, o músculo gastrocnêmio lateral (que se apresenta formado pelas subunidades lateral, intermediária e medial) e o músculo gastrocnêmio medial que não apresenta subdivisões, sendo formado por uma cabeça única (BENNETT et al., 1986; BENNETT et al., 1988). Tanto o gastrocnêmio lateral como o medial são inervados por ramos motores separados originados do nervo tibial. Proximalmente, o músculo gastrocnêmio origina-se no fêmur, e caudalmente, seus tendões se unem ao tendão do músculo sóleo formando o tendão calcâneo comum, conhecido como tendão de Aquiles (HEBEL et al., 1986).

O músculo gastrocnêmio de rato é usado frequentemente em modelos experimentais que avaliam a recuperação eletrofisiológica e funcional durante a regeneração de nervos periféricos (LIU et al., 2003; RAFIUDDIN et., 2003; THOMAS et al., 2003; VALERO-CABRE et al., 2004; VAREJAO et al., 2004). Também é um dos músculos mais utilizados nos modelos de lesão lacerativa (JÄRVINEN et al., 1976; FISHER et al., 1990; CRISCO et al., 1994; MENETREY et al., 1999; FUKUSHIMA et al., 2001; PIEDADE et al., 2008), porém poucos descrevem em que

porção desse músculo a lesão foi realizada, ainda que descrevam de forma precisa o procedimento técnico para obtenção da lesão. Em alguns estudos há relatos de que a laceração foi realizada na porção lateral do músculo gastrocnêmio (MENETREY et al., 1999; FUKUSHIMA et al., 2001; PIEDADE et al., 2008).

Neste trabalho optamos por utilizar um modelo que produzisse lesões lacerativas padronizadas utilizando a cabeça medial do músculo gastrocnêmio, pois o fato de não apresentar subdivisões favorece a realização do estudo estereológico, e também porque essa porção é a mais comumente acometida nos traumas em humanos.

1.3 Lesão muscular

Dentre as patologias tratadas por fisioterapeutas, destacam-se as lesões musculares dos esportistas ou por acidentes, que podem ser decorrentes de uma grande variedade de mecanismos causais, que vão desde um trauma direto, incluindo lacerações e contusões musculares, a traumas indiretos relacionados ao estiramento, exercício excêntrico, isquemia e disfunções neurológicas (GARRETT et al., 1984; FISHER et al., 1990; GARRETT, 1990; CRISCO et al., 1994).

Entretanto, ainda não há um regime adequado para o tratamento dessas lesões, tornando-as um grande desafio para os profissionais da medicina esportiva e da traumatologia (GARRET et al.,1984; CRISCO et al., 1994; MENETREY et al., 1999).

A laceração muscular ocorre quando o músculo é seccionado por um objeto cortante. Este tipo de lesão ocorre freqüentemente na mão e nos membros superiores em decorrência de acidentes automobilísticos e domésticos (GARRET et al.,1984); apesar de ser mais rara nos esportes, quando um atleta sofre este tipo de lesão, o retorno às suas atividades físicas e a ascensão profissional fica fortemente comprometido (MENETREY et al., 1999).

1.4 Aspectos histopatológicos do reparo da musculatura esquelética

Os mecanismos de reparo tecidual sempre receberam grande atenção na área de pesquisa biomédica e farmacológica; são inúmeras as contribuições recentes, tendo em vista o grande interesse despertado pelo uso de células-tronco na regeneração tecidual. Para o estudo aprofundado sobre o reparo tecidual existem excelentes revisões atualizadas (JARVINEN et al., 2007; SMITH et al., 2008).

De modo geral, pode-se dizer que, uma vez estabelecidos durante o desenvolvimento embrionário, os tecidos são mantidos em equilíbrio dinâmico através de um balanço entre morte celular e regeneração durante toda a vida. Porém, quando o tecido é lesado ocorre uma ativação desta maquinaria de modo a promover o reparo. Estudos recentes têm revelado a existência de paralelos entre o desenvolvimento dos tecidos no embrião e sua reconstrução durante episódios de reparo.

De modo geral, pode-se distinguir 4 zonas diferentes que se modificam durante o processo de reparo (Figura 1): zona central (ZC): corresponde à área

onde ocorre a laceração e contém o hematoma nos estágios precoces e mais tarde é preenchida pelo tecido de granulação; <u>zona de regeneração</u> (ZR): localiza-se perifericamente à zona central, nos estágios mais precoces separa a zona central dos cotos de células musculares sobreviventes. Nesta região, ocorre o crescimento dos miotubos durante a regeneração, e <u>zona preservada</u> (ZP): localizada ainda mais perifericamente, corresponde à região que contém os cotos preservados das células musculares.



Figura 1 - Ilustração esquemática das 4 zonas diferentes que se modificam durante o processo de reparo: zona central (ZC); zona de regeneração (ZR) e zona preservada (ZP).

No início do processo de reparo, as mudanças teciduais se dão na presença do processo inflamatório, que compreende a invasão por neutrófilos e, posteriormente, macrófagos no local da lesão. Estas células eliminam os microrganismos invasores e os restos de células e matriz. Além disso, são a fonte de fatores de crescimento e citocinas que possivelmente coordenam vários comportamentos celulares, como a migração, proliferação, síntese de matriz e assim por diante, até o final do reparo (WERNER; GROSE, 2003).

O processo de cicatrização do músculo esquelético segue um padrão relativamente constante independentemente da causa da injúria lacerativa (HURME et al., 1991).

A seqüência temporal, descrita classicamente na literatura, dos fenômenos envolvidos na regeneração do músculo esquelético encontra-se resumida na **Tabela** 1 (KÄÄRIÄINEN et al., 2000).

Tabela 1 -	- Fenômenos	envolvidos r	na regeneração	do músculo	esquelético

Tempo pós-lesão	Eventos
0 a 24 horas	 Retração das células musculares rompidas e preenchimento do espaço por hematoma. Necrose das células rompidas a partir do local da ruptura até uma distância de 1 a 2mm Cilindros de membrana basal preservados são preenchidos por macrófagos. A "banda de contração" é formada permitindo a limitação da extensão da necrose. Células satélites tornam-se ativadas e os primeiros mioblastos desmina-positivos são vistos após 12 horas. Células satélites começam a se proliferar após aproximadamente 24 horas.
2 a 3 dias	 As células satélites se diferenciaram em mioblastos e começaram a se fundir em miotubos. Macrófagos fagocitam partes necrosadas de miofibras. O hematoma é substituído por tecido conjuntivo cicatricial.
5 dias	 Miotubos preenchem a membrana basal preservada. Miofibras em regeneração começam a aderir ao tecido conjuntivo através de seus aspectos laterais
7 dias	 Miofibras em regeneração estendem-se da membrana basal preservada e começam a penetrar a cicatriz. O tecido conjuntivo cicatricial torna-se denso.
14 dias	 Formação de novas junções miotendíneas pequenas nas terminações das miofibras em regeneração.
21 a 56 dias	 O tecido cicatricial diminui e as miofibras em regeneração tornam- se entrelaçadas. As miofibras em regeneração amadurecem e adquirem aparência estriada com mionúcleos localizados perifericamente.

A **Figura 2** ilustra esquematicamente a evolução do processo de reparo ao longo do tempo.



Figura 2 - Ilustração esquemática do reparo do músculo esquelético ao longo dos dias após lesão traumática. Dia 2: as partes necrosadas das células musculares seccionadas são removidas por macrófagos enquanto ocorre a formação de tecido conjuntivo cicatricial por fibroblastos na zona central. Dia 3: as células satélites tornam-se ativadas na zona de regeneração diferenciando-se em mioblastos. Dia 5: mioblastos fundem-se dando origem a miotubos na zona de regeneração e o tecido conjuntivo na zona central torna-se mais condensado. Dia 7: as células musculares em regeneração crescem em direção à zona central e começam a penetrar no tecido cicatricial. Dia 14: a cicatriz torna-se mais condensada e reduzida e as células musculares em regeneração entrelaçadas e virtualmente unidas com pouco tecido cicatricial entre elas (JÄRVINEN et al., 2005).

MENETREY et al. (1999) descreveram três fases distintas após uma laceração muscular: a) <u>fase de destruição</u>, caracterizada pela formação de hematoma, resposta inflamatória celular e degeneração e necrose do tecido muscular; b) <u>fase de reparo</u>, que inclui a fagocitose do tecido danificado, a regeneração do músculo estriado, a produção de tecido conjuntivo cicatricial e o crescimento capilar, e c) <u>fase de remodelamento</u>, na qual o músculo regenerado amadurece, contrai e há reorganização do tecido cicatricial.

a) Fase de destruição

Quando o músculo é lesado, ocorre lesão de membrana nos cotos musculares rompidos deixando-os expostos (JÄRVINEN et al., 2005). Dentro de horas após o trauma, ocorre condensação do material citoesquelético originando uma estrutura chamada "banda de contração", que de forma ainda desconhecida, impede que a necrose da lesão não se estenda por todo o comprimento da célula muscular (THORSSON et al.,1998).

Além do comprometimento das células musculares, os vasos sangüíneos também são rompidos; logo, células inflamatórias têm acesso direto ao foco da lesão. Nas primeiras horas, os polimorfonucleares neutrofílicos são os mais abundantes no local da lesão, mas logo nos primeiros dias, são substituídos por monócitos que dão origem a macrófagos. Alguns fibroblastos também podem ser vistos já nos primeiros dias após a lesão. Nessa fase também se observam hematoma e edema nos espaços intra- e extracelulares, dificultando a chegada do oxigênio às células, favorecendo o aparecimento de lesões secundárias por hipóxia (GARRET et al., 1984; LEHTO et al., 1985; FISHER et al., 1990; HURME et al., 1991; CRISCO et al., 1994).

b) Fases de reparo e de remodelamento

O reparo dos tecidos envolve dois processos distintos: a regeneração, que se refere a substituição das células lesadas por células do mesmo tipo (como acontece no reparo de uma fratura óssea) e substituição por tecido conjuntivo, um processo denominado de fibroplasia ou fibrose, que deixa uma cicatriz permanente (como ocorre no reparo das feridas). Tanto a regeneração quanto a fibroplasia são determinadas por mecanismos similares, envolvendo a migração, proliferação e diferenciação celulares, bem como interações entre célula e matriz extracelular (JÄRVINEN et al., 2005).

Esses dois eventos devem ocorrer no reparo muscular, uma vez que a recuperação funcional do músculo lesado requer também a restauração da matriz extracelular (MEC) do tecido conjuntivo que envolve as células (RANTANEN et al., 1999). Por outro lado, observa-se que a regeneração muscular pode ser dificultada pelo desenvolvimento de fibrose, a qual parece iniciar-se durante a segunda semana após a lesão e aumentar com o passar do tempo (KASEMKIJWATTANA et al., 1998; MENETREY et al., 1999).

Regeneração das células musculares:

Em resposta à lesão tecidual, as células satélites quiescentes entram em ativação, proliferação e diferenciação em mioblastos, que ao fundirem-se formam miotubos multinucleados. Os miotubos neoformados na zona regenerativa fundemse com a região terminal da célula muscular lesada que sobreviveu ao trauma inicial. Ao longo do tempo, as partes em regeneração das células desenvolvem miofibrilas em seu citoplasma, restaurando o aspecto estriado do músculo esquelético, com os núcleos localizados na periferia (HURME et al., 1991). Há evidências que, além destas células satélites, uma população de células tronco localizada no endomísio fora da lâmina basal e também células tronco derivadas da medula óssea podem ser ativadas para proliferação e diferenciação em resposta à lesão (LABARGE, BLAU, 2002; CHARGÉ, RUDNICK, 2004). As células satélites clássicas são já comprometidas com a linhagem muscular e podem se diferenciar em mioblastos imediatamente após a lesão muscular enquanto que as células satélites tronco, que são proliferativas, antes de se diferenciarem, entram em divisão, mantendo uma reserva de células satélites (RANTANEN et al., 1995). Entre essas células satélites também parece haver uma sub-população de células capazes de se desenvolverem em células de outras linhagens (WILLIAMS et al., 1999).

Os cilindros de lâmina basal remanescentes das células musculares lesadas são preenchidos por miofibras em regeneração, que por sua vez, crescem em direção ao tecido conjuntivo cicatricial em formação entre as bordas da lesão. Entretanto, a quantidade de tecido conjuntivo é o fator limitante a esse crescimento; as extremidades das células em regeneração começam a se aderir ao tecido conjuntivo, formando mini-junções miotendíneas com a cicatriz (GARRET et al., 1984; HURME, KALIMO 1992). Com o tempo, o tecido cicatricial diminui em tamanho aproximando os cotos musculares, porém ainda não há evidências de sua fusão, restando algum septo de tecido conjuntivo entre eles (VAITTINEN et al., 2002).

Formação do tecido conjuntivo cicatricial

Imediatamente após a lesão do músculo esquelético, ocorre formação de hematoma no local e logo nas primeiras horas chegam as células infamatórias. Fibronectina e fibrina derivadas do sangue se entrelaçam protegendo o tecido lesado e esta matriz extracelular inicial serve como suporte de sustentação para a chegada dos miofibroblastos (HURME et al., 1991).

11

As células musculares lesadas, as plaquetas, os macrófagos e os leucócitos são fontes de TGF-β1, que entre outras funções, estimula as células fibroblásticas vizinhas ao sítio da injúria a se diferenciarem em miofibroblastos, com objetivo de reconstruir uma nova matriz extracelular e restaurar suas propriedades mecânicas. Todo este processo requer, além de TGF-β1, a ação de forças mecânicas geradas pela própria migração e contração dos miofibroblastos e a presença de fibronectina celular (variante ED-A) produzida por macrófagos e pelos próprios miofibroblastos (TOMASEK et al., 2002).

Os miofibroblastos são caracterizados pela presença simultânea de padrões de células fibroblásticas e de células musculares lisas (como a presença de filamentos finos de α-actina de músculo liso). Assim sendo, estas células possuem capacidade de contração, promovendo a retração tecidual no local da lesão, o que leva à uma rápida e benéfica diminuição da área lesada; ao mesmo tempo, o TGFβ1 estimula a síntese de elementos da matriz extracelular pelos miofibroblastos, visando o reparo tecidual. Quando este processo se completa, os miofibroblastos são eliminados por apoptose.

No entanto, a persistência de miofibroblastos ativos leva à deposição contínua de tecido fibroso, que pode resultar em deformação estrutural com a conseqüente disfunção tecidual (WYNN, 2008). Embora, as situações patológicas atraiam a atenção dos pesquisadores, a existência de uma população controlada de miofibroblastos é essencial para a eficiência de processos fisiológicos de adaptação e remodelamento em tecidos que sofrem alterações mecânicas funcionais como por exemplo, nos pulmões (KAPANCI et al., 1992), no ligamento periodontal (ARORA; MCCULLOCH, 1994) ou ainda na cérvix uterina durante o parto (MONTES et al., 2002).

12

Apesar da grande maioria das lesões do músculo esquelético se recuperar sem a formação de fibrose que leve à disfunção muscular, a proliferação de miofibroblastos pode ser excessiva em casos de traumas musculares maiores ou recidivas de rupturas, resultando na formação de tecido cicatricial denso, o qual cria uma barreira mecânica que atrasa consideravelmente ou restringe completamente a regeneração das miofibras (JÄRVINEN, 1976).

A distribuição dos diferentes tipos de colágeno no processo de reparo de lesão muscular por contusão não é homogênea durante os dias seguintes à lesão, sendo que o colágeno tipo III precede o aparecimento do colágeno tipo I no local da lesão; no entanto, a deposição de colágeno tipo I permanece por muito mais tempo concentrando-se principalmente na região do perimísio (LEHTO et al., 1985).

1.5 Biomecânica

A biomecânica é considerada um ramo da bioengenharia por considerar as aplicações da mecânica clássica para analisar os sistemas biológicos e fisiológicos, utilizando diferentes aspectos da mecânica aplicada. Existem excelentes revisões sobre o tema e vários livros que contem os fundamentos básicos da biomecânica. Os conceitos aqui utilizados foram retirados de NORDIN; FRANKEL (2001).

As atividades de pesquisa em biomecânica podem ser divididas em três áreas: estudos experimentais, análises de modelos e pesquisa aplicada. Estudos experimentais em biomecânica objetivam determinar as propriedades mecânicas de materiais biológicos, incluindo osso, cartilagem, músculo, tendão, ligamento, pele e sangue, como um todo, ou como partes que os constituem.

1.5.1 Conceitos básicos em biomecânica: força, tensão e deformação

a) Força

Força pode ser definida com uma perturbação mecânica ou carga aplicada a um objeto que pode movê-lo, deformá-lo, mudar seu estado de movimento ou todas estas ações combinadas. A unidade internacional de medida de força é Newton (N), de modo tal que 1 N = (1 kg)(1 m/s2). Forças podem ser classificadas de vários modos, de acordo com os efeitos que causam nos objetos aos quais são aplicadas ou de acordo com as suas orientações comparadas umas com as outras. Por exemplo, uma força pode ser interna ou externa, normal (perpendicular) ou tangencial; de tensão, compressão ou de deslizamento; gravitacional (peso) ou de fricção.

Uma ou mais forças agindo em um único corpo podem ser coplanares (agindo em uma superfície de plano bidimensional); colinear (tendo uma linha de ação comum); concorrentes (linhas de ação que se interceptam em um único ponto); ou paralelas.

Objetos sob a aplicação de forças externas podem transladar na direção da resultante de força e podem girar na direção do torque resultante. Se um objeto está submetido a forças externas e continua em equilíbrio estático, então é

provável que esteja ocorrendo alguma mudança local na sua forma, conhecida como deformação. A extensão da deformação que um objeto pode sofrer depende de muitos fatores, incluindo propriedades dos materiais que o constituem, seu tamanho e sua forma, além de fatores ambientais, como calor e umidade; e a magnitude, direção e duração das forças aplicadas.

Um modo de distinguir forças é observando suas tendências em deformar o objeto no qual são aplicadas. Por exemplo, é dito que o objeto está sob tensão se o corpo do objeto tende a alongar e sob compressão se tende a encolher, na direção das forças aplicadas. O deslizamento é diferente da tensão e da compressão pois é causado por forças aplicadas tangencialmente à área que resiste à força, enquanto que tensão e compressão são causadas por forças colineares aplicadas perpendicularmente às áreas nas quais atuam. É comum chamar forças de tensão e compressão de forças normais ou axiais, enquanto que forças de deslizamento são tangenciais.

b) Tensão

A intensidade da força distribuída (força por unidade de área) é conhecida como tensão. Quando a força resultante na seção cortada for perpendicular ao plano do corte, a tensão correspondente é chamada de tensão normal ou axial. Tensões normais causadas por forças que tendem a alongar (estirar) materiais são especificamente conhecidas como tensões de estiramento, enquanto tensões normais que tendem a encolher materiais são conhecidas como tensões de compressão.
c) Deformação

Deformação é uma medida do grau de distorção. A deformação normal é definida como a razão entre a variação do comprimento e o comprimento inicial. Se o objeto aumenta na direção da tensão aplicada, então a distorção é conhecida como tensional ou positiva; no entanto, se o objeto diminui na direção em que a tensão é aplicada, denomina-se deformação negativa ou compressão.

As deformações podem ser elásticas ou plásticas. Elasticidade é definida como a habilidade de um material em retornar seu tamanho e forma original (livre de estresse) quando as cargas aplicadas são removidas. Em outras palavras, se uma carga é aplicada em um material de forma que o estresse gerado no material seja igual ou menor que o limite elástico, as deformações que acontecerão serão completamente recuperadas, uma vez que as cargas aplicadas sejam removidas. A partir daí, o material sofrerá deformações plástica que é irrecuperável. Portanto, o conceito de plasticidade implica deformações permanentes: deformações plásticas podem ocorrer após deformações elásticas quando a carga está além do limite elástico do material.

1.5.2 Propriedades de materiais baseadas em diagramas de testes de tração

Um diagrama de Força **x** Deformação Absoluta pode ser construído colocando-se o objeto a ser testado em um equipamento que promove sua extensão a uma velocidade constante até a ruptura. Este procedimento é conhecido como

teste de tração durante o qual são captadas as dimensões da força (carga, em Newtons) e deformação absoluta (em milímetros) para geração da curva (**Figura 3**).



Figura 3 – Diagrama de força X deformação absoluta. Levando-se em consideração que na porção linear da curva a deformação é diretamente proporcional à força, é possível calcular a rigidez do material como a razão entra a variação de força e a variação do comprimento.

Conhecendo-se a área da secção transversa do objeto testado, o seu comprimento final (**l**f), e seu comprimento inicial (**l**i) é possível obter a curva Tensão-Deformação Relativa (Figura 4), através da normalização da força pela área da secção transversal e pela normalização da variação do comprimento pelo comprimento inicial:

Tensão (
$$\sigma$$
) = Força/Área

Deformação relativa (
$$\varepsilon$$
) = $\frac{\ell_i - \ell_f}{\ell_i}$

A tensão (σ) tem como unidade Pascal (Pa = N/mm²), enquanto que a deformação relativa (ϵ) por ser uma razão entre dois comprimentos é adimensional, sendo expressa tanto em porcentagem como em mm/mm.

O diagrama tensão-deformação (**Figura 4**) fornece informações importantes sobre as propriedades mecânicas e o tipo de comportamento do objeto testado sobre sua rigidez, sobre elasticidade, deformação máxima obtida antes de perder a capacidade de resistir, limite elástico, entre outros dados.



Figura 4 - Diagrama tensão X deformação relativa. A região aproximadamente linear no seu início é denominada região elástica, dentro da qual cada deformação é reversível e o material retorna completamente ao seu formato original, após a retirada da carda aplicada. devido ao realinhamento das cadeias macromoleculares longas e flexíveis. A partir do ponto limite de elasticidade, entra-se na região plástica da curva, na qual, a deformação subseqüente é quase toda irreversível. Nesta fase, inicialmente, o material ainda resiste à tração externa, exigindo uma tensão maior para se deformar. A tensão continua subindo, até atingir o limite de resistência do material ou ponto de resistência máxima, ao qual correspondente o valor de tensão máxima do sistema.

Um material flexível é aquele que exibe uma grande deformação plástica antes de atingir a resistência máxima. Um material quebradiço, como um

copo de vidro, atinge o ponto de limite elástico e se rompe de maneira súbita, sem sofrer deformação plástica considerável.

O valor de tensão máxima é utilizado para a especificação dos materiais industriais nas normas internacionais, pois é o único resultado preciso obtido no ensaio de tração, sendo utilizado como base de cálculo de todas as outras tensões derivadas neste ensaio. Por exemplo, um determinado tipo de aço apresenta um limite de resistência de aproximadamente 700 MPa. Na produção de novo lote desse aço, deve-se executar seu ensaio para verificar se o novo lote realmente possui esta resistência. Ou seja, esta especificação é utilizada para comparar a resistência de um material produzido com o valor referencial da norma.

Além destes dados diretos é possível calcular ainda o módulo elástico (σ / ϵ) em qualquer ponto dentro da região linear da curva, em que a deformação é totalmente reversível e proporcional à tensão. Essa habilidade do material em armazenar ou absorver energia sem deformação permanente é chamada de elasticidade. Quanto mais alto o módulo elástico, mais rígido é o material e maior é a sua resistência à deformação. O conceito de Resiliência está relacionado à elasticidade do material, sendo definido como a capacidade do material de absorver energia até o seu limite elástico.

Outras propriedades podem ser deduzidas dos diagramas construídos a partir dos testes de tração, como por exemplo, a **tenacidade** que é a capacidade do material de absorver energia até a sua ruptura completa e não somente até a força máxima. 1.5.3 Propriedades biomecânicas do tecido muscular esquelético

A organização e a biomecânica muscular advem de uma associação entre células musculares e tecido conjuntivo, na qual o músculo pode ser considerado o elemento contrátil ativo e o tecido conjuntivo como o elemento elástico que distribui a força ativa da contração através de alongamento passivo e, ao mesmo tempo, mantém a posição relativa das fibras (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1984). O perimísio tem sido considerado o maior componente elástico em paralelo às fibras musculares (BORG; CAULFIELD, 1980) e as alterações nas propriedades biomecânicas musculares tem sido relacionadas a alterações também no perimísio e no endomísio. É interessante observar que o perimísio aparece nos dias inicias dos experimentos de imobilização, mesmo antes de evidências de perdas sarcoméricas. Nos tempos mais tardios de imobilização observa-se aumento de espessura do endomísio (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1984).

Há evidências que simultaneamente à deposição progressiva de proteínas da matriz extracelular no local de uma lesão muscular ocorre aumento da resistência biomecânica. Os ensaios mostram que, nos primeiros 10 dias após a lesão, ao se aplicar forças de tensão ao músculo em regeneração, ocorre ruptura do tecido no interior do tecido cicatricial recém formado e, após este período, a ruptura se dá nas fibras musculares propriamente ditas em região próxima às suas extremidades, como normalmente acontece com fibras musculares saudáveis (KÄÄRIÄINEN et al., 1998). Os dados morfológicos deste estudo, por sua vez, mostraram que no local da lesão, nas fases iniciais da cicatrização, estavam presentes elementos da matriz extracelular que apresentam baixa capacidade de

suportar as forças de tração, como a fibrina, a fibronectina, o ácido hialurônico e as fibras de colágeno do tipo III, conhecidas como fibras reticulares (LEHTO et al., 1985). Estes achados explicariam a baixa resistência da cicatriz encontrada (KÄÄRIÄINEN et al., 1998) nos ensaios biomecânicos, nas fases iniciais do reparo.

Desta forma percebe-se que, para a recuperação da performance biomecânica, a síntese e deposição adequada dos elementos da matriz extracelular são tão importantes quanto a regeneração das células musculares propriamente ditas.

Levando-se em consideração que o processo de maturação de colágeno na área de reparo tecidual pode contribuir para melhora da força mecânica, nos propomos a realizar o estudo da distribuição do colágeno fibrilar associado à investigação do comportamento biomecânico das lesões tratadas com US em diferentes fases do processo de reparo.

1.6 Tratamento das lesões musculares

Apesar da freqüência e da importância das lesões musculares, há poucos estudos clínicos sobre o tratamento dessas lesões e isso se deve à grande variação da severidade e também ao fato desses traumas acometerem diferentes músculos. Dessa forma, o tratamento baseia-se em estudos experimentais e observações clínicas empíricas (JÄRVINEN et al., 2007).

O quadro clínico das lesões musculares depende da severidade da lesão e da natureza do hematoma, ou seja, com o sem ruptura da fascia, uma vez que no segundo caso há maior perda de sangue (JÄRVINEN et al., 2007). No entanto sempre haverá a formação de edema intersticial.

O planejamento terapêutico deve levar em consideração o grau de lesão muscular. JÄRVINEN et al. (2005) definiu 3 categorias com base na disfunção clínica apresentada: <u>leve</u> (grau I): representa uma lesão de poucas fibras musculares com edema e desconforto mínimos, nenhuma ou pouca perda de força e restrição de movimento; <u>moderada</u> (grau II): maior comprometimento do músculo com perda acentuada da habilidade de contrair, e <u>severa</u> (grau III): a lesão se estende por toda área transversal do músculo, resultando em perda completa da função.

No entanto, outros parâmetros também devem ser utilizados na classificação das lesões, a saber: lesão aguda, crônica, exacerbação aguda de um problema crônico ou alterações sub-clínicas. Além disso, cada lesão muscular deve ser analisada por outros aspectos levando em consideração as adaptações funcionais presentes e a sobrecarga tecidual (KIBLER, 1990). Sendo assim, somente através da análise de todas essas variáveis, é possível desenvolver um bom plano de reabilitação.

As modalidades terapêuticas empregadas para o tratamento das lesões musculares variam de acordo com seu tipo e severidade. A conduta sugerida inclui imobilização nas fases iniciais da regeneração; mobilização precoce; o princípio do repouso-gelo-compressão-elevação para o tratamento imediato; tratamento progressivo mais ativo após 3 a 5 dias, incluindo treinamentos isométrico, isotônico e isocinético; tratamento cirúrgico e medicamentoso; terapia hiperbárica e aplicação de modalidades fisioterapêuticas, dentre elas o ultrassom. Entretanto, vários autores concordam que o melhor tratamento para os diversos tipos de lesões

musculares ainda não está claramente padronizado (KASEMKIJWATTANA et al., 1998; THORSSON et al., 1998; GUILLODO, SARAUX, 2009).

O músculo lacerado pode restaurar uma função satisfatória, mas sua recuperação não é completa do ponto de vista morfológico e funcional, quando suturado após a lesão (GARRETT et al., 1984). Este comprometimento funcional tem sido atribuído à formação de tecido cicatricial (MENETREY et al., 1999). O uso dos fatores de crescimento como NGF, FGF-ß, IGF–I, pode auxiliar a regeneração muscular estimulando o crescimento e a secreção de proteínas pelas células músculo-esqueléticas, mas é incapaz de evitar a formação persistente de tecido cicatricial no músculo lesado (KASEMKIJWATTANA et al., 1998).

Uma abordagem interessante estuda a possibilidade de utilização de mecanismos biológicos de bloqueio do desenvolvimento da fibrose muscular. O decorim é um proteoglicano que inativa o efeito estimulante do TGF-β sobre os miofibroblastos e, por isso, tem uma ação benéfica anti-fibrose em vários órgãos, tais como, nos pulmões e nos rins (ISAKA et al., 1996; GIRI et al., 1997). No tecido muscular lacerado, a aplicação de decorim também tem um efeito anti-fibrose levando a uma melhor regeneração e força muscular (FUKUSHIMA et al., 2001).

A terapia com anti-inflamatórios não esteroidais, após a lesão muscular, não influencia significativamente a proliferação de células satélites e de fibroblastos, de miotubos e na regeneração vascular (THORSSON et al., 1998).

O uso da fototerapia tem sido estimulado para o tratamento de lesões musculares como indutor da proliferação das células satélites, inibidor da fibrose cicatricial e da degeneração muscular (ORON, 2006).

A aplicação de concentrado plaquetário tem sido proposta como uma terapia alternativa às formas terapêuticas convencionais para acelerar o reparo das lesões musculares. O coágulo inicial é substituído pelo concentrado plaquetário, que mantém o espaço regenerativo, promove concentrações suprafisiológicas de fatores de reparo e ativador das fases iniciais do processo inflamatório. Os resultados apontam para a recuperação total das capacidades funcionais na metade do tempo esperado e sem a formação de fibrose (HALL et al., 2009).

A aplicação do ultrassom é freqüentemente realizada na reabilitação como uma terapia complementar no tratamento de várias disfunções músculoesqueléticas, sendo indicado com o objetivo de melhorar a taxa de reparo tecidual, promover o melhor alinhamento das fibras colágenas, reduzir a dor, aumentar a extensibilidade e a reparação do tecido muscular (segue-se uma revisão da literatura sobre as diversas aplicações do US). Apesar de haver muitos relatos clínicos e laboratoriais sobre os efeitos e aplicações do ultrassom terapêutico, existem ainda conclusões contraditórias.

Uma vez que este trabalho de pesquisa visa estudar mais profundamente os efeitos do ultrassom na regeneração muscular, faz-se necessária uma revisão crítica da literatura sobre os conceitos que envolvem esta modalidade terapêutica.

1.7 Ultrassom terapêutico

Há aproximadamente 80 anos foi sugerido o uso médico das interações entre as ondas sonoras de alta freqüência (ondas ultrassônicas) e o tecido vivo (SPEED, 2001). Desde então, o US tem sido utilizado na medicina em três áreas distintas: a cirúrgica, a diagnóstica e a terapêutica. É um dos recursos mais freqüentemente utilizado para o tratamento de uma variedade de afecções em atletas (WILKIN et al., 2004). Estima-se que seja utilizado por 94% dos fisioterapeutas canadenses, por 65% dos terapeutas dos Estados Unidos da América. No Reino Unido, a terapia ultrassônica é aplicada em aproximadamente 50% de todos os tratamentos em pacientes privados e em 20% dos tratamentos realizados nos Serviços de Saúde Nacional (BELANGER, 2002; WATSON, 2008).

Apesar de seu uso freqüente, a revisão de trabalhos randomizados, controlados com placebo utilizando métodos adequados, não confirma a existência de importância clínica ou diferenças estatisticamente significativas a favor do US no tratamento das afecções músculo-esqueléticas. A evidência científica sobre sua efetividade ainda traz resultados conflitantes (WATSON, 2008). Tem-se proposto que além do efeito analgésico produzido pela micromassagem, as ondas ultrassônicas de alta freqüência podem incrementar o estágio inicial da regeneração muscular. Entretanto, apesar da aparente promoção da fase proliferativa da miorregeneração (RANTANEN et al., 1999; PIEDADE et al., 2008), o US terapêutico parece não ter um efeito positivo no resultado final do reparo muscular (RANTANEN et al., 1999; MARKET et al., 2005).

1.7.1 Características do ultrassom terapêutico

O US produz vibrações de alta freqüência quando um cristal piezoelétrico sofre deformação mecânica ao ser estimulado por energia elétrica. As

25

ondas produzidas são transmitidas por propagação através da vibração e colisão molecular, com uma perda progressiva da intensidade de energia durante a passagem pelo tecido, devido à absorção e dispersão da onda (TER HAAR, 1987).

A quantidade total de energia no feixe ultrassônico é sua potência, expressa em watts. A quantidade de energia que efetivamente alcança um local específico depende de várias características do US (como freqüência, intensidade, foco e uniformidade do feixe) e depende também do tipo de tecido através do qual se propaga (SPEED, 2001). No caso do tecido muscular, a porcentagem de atenuação do feixe ultrassônico de 1 MHz é de 24%/cm (MCDIARMID et al., 1996).

Para uso terapêutico, o US se caracteriza por uma freqüência que varia de 0,75 a 3 MHz, sendo que a maioria dos equipamentos disponíveis oferecem freqüências de 1 e 3 MHz. O US de 1MHz atinge tecidos a uma profundidade de 3 a 5 cm, enquanto que 3MHz é indicado para lesões mais superficiais a profundidades de 1 a 2 cm (MCDIARMID et al., 1996).

As ondas ultrassônicas podem ser emitidas de forma contínua (ultrassom contínuo – USc) ou pulsada (ultrassom pulsado – USp). No USc a intensidade se mantém constante, enquanto que no USp a intensidade é intermitentemente interrompida, de modo que durante o tempo total de aplicação, há períodos de tempo nos quais o US atinge o tecido (*Ton*) e períodos nos quais está desligado (*Toff*). Desta forma, o ciclo útil do USp é calculado a partir da seguinte equação:

ciclo útil = duração do pulso (Ton) período do ciclo (Ton + Toff) 26

Os ciclos úteis típicos dos equipamentos de US estão entre 0,05 (5%) a 0,5 (50%), sendo que o ciclo útil mais utilizado é o de 20% (MCDIARMID et al., 1996).

A intensidade do US é a relação entre o total de energia administrada por unidade de área do cabeçote. Uma vez que o feixe ultrassônico não é uniforme, ou seja, algumas regiões desse feixe são mais intensas que outras, o valor da intensidade efetiva mostrada pelo aparelho, quando usado em modo contínuo, corresponde a uma intensidade média, denominada intensidade média espacial, expressa em unidades de watts por cm² (W/cm²). A maioria dos equipamentos de fisioterapia disponibiliza intensidades que variam de 0,25 a 2,0 W/cm². Quando o modo de emissão é pulsado, deve-se ter em mente que, na realidade, a intensidade será zero durante o *Toff* e máxima durante o *Ton*; assim sendo, o aparelho fornece um valor de intensidade que corresponde à média da intensidade durante os períodos *on/off*, denominada intensidade média temporal. Por exemplo, para um modo pulsado a 50% e uma intensidade de pico temporal de 2,0W/cm², teremos uma intensidade média temporal de 1,0W/cm² (2,0W/cm² X 0,5 = 1,0W/cm²).

Diferentemente da energia eletromagnética, que se propaga através do ar, a energia ultrassônica é extremamente atenuada pelo ar e totalmente refletida nas interfaces ar-tecido. Logo é necessário um meio de acoplamento para que a energia ultrassônica seja transmitida do cabeçote para a superfície irradiada. Entre esses meios, o mais comumente utilizado é o gel, mas também a água e alguns tipos de óleo podem ser utilizados desde que excluam o ar entre o cabeçote e a área tratada (SPEED, 2001; BISHOP et al., 2004).

Durante a aplicação, o cabeçote pode ser movimentado continuadamente ou ser mantido estacionário, o que aumentará o risco de

sobreposição de uma onda incidente a uma onda refletida levando à formação de uma onda estacionária com amplificação dos efeitos e conseqüente lesão tecidual (DYSON, 1982).

O tempo adequado de aplicação depende da área tratada e do tamanho do cabeçote. Para áreas menores que o tamanho do cabeçote usa-se em geral de 3 a 5 minutos de tratamento e para áreas maiores, estipula que a duração mínima de tratamento seja de 1min/cm², sendo de 15 minutos o tempo máximo recomendado para aplicação do US (LEHMANN, 1994).

1.7.2 Efeitos térmicos e não térmicos do ultrassom

Tradicionalmente, dividem-se os efeitos biofísicos resultantes da interação entre o US e o tecido vivo em dois grupos: 1) Efeitos térmicos: produzidos pela sua capacidade de elevar a temperatura tecidual e 2) Efeitos não térmicos: atribuídos a outros mecanismos que não a elevação da temperatura tecidual (DYSON, 1987; MCDIARMID et al., 1996).

Apesar de serem apresentados como dois grupos mutuamente exclusivos, parece claro que essas duas categorias ocorrem simultaneamente e que alguns efeitos podem ser de causa tanto térmica como não térmica. Não há evidências suficientes sobre a existência de um limiar verdadeiro para os efeitos biológicos térmicos e não térmicos do US (BAKER et al., 2001). De qualquer forma, há uma redução do aquecimento tecidual quando se utiliza o USp, proporcional à relação *Ton: Toff* (TER HAAR, 1987).

a) Efeitos térmicos

Para que o calor tenha uma ação terapêutica, a temperatura tecidual deve ser mantida entre 40 e 45°C por pelo menos 5 minutos. As intensidades mais altas disponíveis nos equipamentos de US (próximas a 2,0W/cm²) podem produzir um aquecimento fisiológico que leva o tecido a esta faixa de temperatura ideal.

O aquecimento local que se alcança através do US depende de alguns fatores: a) tipo de tecido tratado, pois tecidos com alta concentração protéica, tais como músculos e tendões, absorvem a energia ultrassônica mais rapidamente, que aqueles com alta concentração lipídica; b) fluxo sanguíneo da região pois, o calor produzido no tecido pode ser dissipado pela circulação sanguínea e c) freqüência do equipamento sendo que altas freqüências são absorvidas mais rapidamente que as baixas (DYSON, 1987).

A técnica de aplicação também interfere no efeito térmico do US, sendo recomendada a utilização de uma interface de gel/bolsa de gel/gel ou gel somente para atingir maior aquecimento (BISHOP et al., 2004).

Intensidades médias de 0,1 a 0,2 W/cm² não são suficientes para promover a elevação da temperatura a níveis terapêuticos; logo, nesses casos, devem estar envolvidos mecanismos não térmicos (DYSON, 1982).

b) Efeitos não térmicos

Os efeitos celulares não térmicos do US incluem mudanças associadas ao fluxo acústico, à cavitação e às ondas estacionárias (DYSON, 1982). O fluxo acústico é o aumento da circulação constante de fluidos próxima às células induzida por forças de radiação. Como esses movimentos têm proporções microscópicas são denominados microfluxo, enquanto que a cavitação é a formação e a pulsação de bolhas de gás nos fluidos teciduais e no sangue como resultado das mudanças de pressão provocadas pela passagem da radiação ultrassônica pelo organismo. A cavitação é considerada estável, quando ocorre apenas a pulsação dessas bolhas, ou transiente, quando há colapso dessas bolhas resultando em lesão tecidual (TER HAAR, DANIELS, 1981; MCDIARMID et al., 1996).

Tanto o microfluxo como a cavitação estável podem alterar a permeabilidade da membrana celular e influenciam o transporte de íons e metabólitos. Dependendo do tipo celular, a resposta pela mudança iônica pode representar maior síntese protéica (fibroblastos), secreção de agentes quimiotáxicos (mastócitos) mudanças na motilidade celular (células endoteliais) e alívio da dor (células nervosas) (DYSON, 1982).

As ondas estacionárias amplificam os efeitos não térmicos do US provocando o aparecimento de cavitação transiente, com aumento de radicais livres que pode resultar em lesão tecidual (DYSON, 1987).

Há atualmente um interesse crescente no papel em potencial do US terapêutico na angiogênese tecidual, que é um processo essencial da fase proliferativa.

O modo mais eficiente de se promover a angiogênese terapêutica é através de procedimentos cirúrgicos (tais como a enxertia de retalhos autólogos com vascularização não comprometida e com alto potencial angiogênico), porém há dados experimentais, assim como alguns dados clínicos preliminares, que apóiam a estimulação de fatores angiogênicos, tais como o IL-8, b-FGF e VEGF, como uma possibilidade para a angiogênese terapêutica (REHER et al., 1999). O uso da terapia ultrassônica pode ser uma forma simples de promover a angiogênese terapêutica, como proposto por PALIWAL e MITRAGOTRI (2008) pela estimulação indireta de fatores angiogênicos (REHER et al., 1999; DOAN et al., 1999). Embora a idéia possa ser potencialmente viável, não há estudos sobre o efeito do ultrassom na produção de citocinas (DOAN et., 1999).

Inicialmente foi descrita a indução à angiogênese através do uso do US por YOUNG e DYSON (1990) utilizando um modelo experimental animal de cicatrização de pele. Recentemente, RAMLI et al (2009) confirmaram esta possibilidade demonstrando a capacidade do US como promotor de angiogênese em um elegante experimento usando a membrana córion-alantoideana, que por ser fina e transparente permite a observação direta da rede vascular neoformada.

RAWOOL et al. (2003) demonstraram um aumento de 33% na vascularização em modelo de osteotomia em cães tratados com US de baixa intensidade, sugerindo que, nestas circunstâncias, pode ocorrer estimulo da angiogênese, a qual é crítica para o sucesso da osteogênese.

O tratamento in vitro com US de células que estão tipicamente envolvidas com o reparo de fraturas (osteoblastos, fibroblastos e monócitos) mostrou a secreção de citocinas inflamatórias (IL-1β) e de fatores indutores da angiogenêse (IL-8, b-FGF, and VEGF) induzindo a proliferação celular, a produção de colágeno, a formação óssea e a angiogênese (DOAN et al., 1999; REHER et al., 1999).

Uma vez que a angiogênese eficiente é uma das condições necessárias para o reparo no tecido muscular e que há evidências da ação do US como promotor da angiogênese, nos propomos a realizar uma avaliação quantitativa das dimensões da rede vascular na área da lesão nos animais controles e tratados com US.

1.7.3 Mecanismo de ação e aplicações do ultrassom no reparo tecidual

Apesar de haver evidências consideráveis que o US terapêutico pode estimular o reparo tecidual, ainda especulam-se os mecanismos fisiopatológicos envolvidos neste fenômeno que podem envolver a estimulação direta dos fibroblastos em cultura (com aumento significativo na síntese protéica de elementos da matriz extracelular por estimulação direta com US) assim como a estimulação mediada pelas células inflamatórias (KARNES, BURTON, 2002; HARVEY et al., 1975). É interessante observar que há um estímulo geral sobre a síntese protéica, inclusive de colágeno (WEBSTER et al.,1980).

A proliferação dos fibroblastos também parece ser estimulada positivamente pelo US (RAMIREZ et al., 1997). Sabe-se que a aplicação de US por longo tempo pode levar a dano tecidual, com morte celular, e, portanto, especula-se que o estímulo à proliferação, poderia ser devido a um mecanismo compensatório para equilibrar a população celular e não somente um efeito direto da aplicação do US (DE DEYNE, KIRSCH-VOLDERS, 1995). O US aciona a rede complexa de sinalização específica envolvendo a ativação de integrinas β1 (proteínas de membrana responsáveis pela adesão da célula ao substrato), que agem como mecanotransdutores, traduzindo a energia acústica pulsada percebida pela membrana em sinais bioquímicos intracelulares, induzindo a proliferação celular. As

proteínas do citoesqueleto interagem (pela face interna da membrana) com as estruturas de adesão da célula à matriz, constituindo assim a base física para a transdução das forças mecânicas em respostas bioquímicas (ZHOU et al., 2004).

A degranulação de mastócitos significativamente maior no local da aplicação do US sugere que a liberação de histamina pode ser um dos fatores responsáveis pelos efeitos de recuperação tecidual atribuídos ao US, por promover um aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular (FYFE, CHAHL, 1984; BYL et al., 1992; TER HAAR, 1999). A liberação de agentes quimiotáxicos atraindo leucócitos granulares e monócitos para o tecido lesado também tem sido atribuída ao uso do US (DYSON, 1987). Há sugestões de uso de US em parâmetros que provoquem a destruição tecidual, através da ação mecânica de microvibração não discriminatória, para facilitar a resolução de processos de remodelamento com intensa fibrose e inflamações crônicas (DE DEYNE, KIRSCH-VOLDERS, 1995).

Especula-se também que o USp pode diminuir as atividades da catalase e da superoxido dismutase, protegendo o tecido muscular de lesões oxidativas, especialmente no primeiro dia após lesão lacerativa (FREITAS et al., 2007).

O tratamento com ultrassom diminui a expressão do RNAm para IGF-I produzida no músculo esquelético lesado de animais . Por ter sua expressão regulada por atividades mecânicas na musculatura esquelética, o IGF-I tem sido chamado de fator de crescimento mecânico e destaca-se como um importante fator no processo de regeneração muscular (MCBRIER et al., 2007).

Ainda que os mecanismos moleculares que explicariam a ação terapêutica do USp ainda serem pouco entendidos, existem evidências experimentais em modelos animais ou trabalhos clínicos que sustentam o seu uso como terapia complementar para promover a reparação tecidual. Segue-se uma pequena revisão sobre as aplicações mais comuns do US terapêutico.

a) Aplicações do ultrassom em lesão de pele e tecido subcutâneo

O trabalho de DYSON et al., 1968 em reparo de orelhas de coelho, utilizando USp com as várias intensidades, mostrou que a intensidade ideal foi 0,50W/cm² e que a aplicação nos estágios mais precoces do processo regenerativo (14 a 28 dias após a lesão) é mais eficiente que nos tempos mais tardios. O fato de este trabalho ter encontrado resultado com aplicação de USp de baixa intensidade e ciclo útil de 20% (que não provocam aquecimento) mostra que o processo de reparo foi afetado principalmente pelo efeito de fluxo acústico do US. O mesmo tipo de conclusão foi obtido em estudo com granulomas sub-cutâneos, onde o efeito benéfico do US sobre a síntese e deposição de colágeno foi alcançado pela sua ação mecânica (POSPISILOVÁ, 1976).

A aplicação de USp em feridas experimentais melhora a cicatrização, diminuindo o tempo de reparo e dando maior força incisional (DRASTICHOVÁ et al., 1973; BYL et al., 1992).

BALLARD, 2001 apresenta uma revisão interessante, considerando o US uma opção terapêutica válida para o tratamento de úlceras crônicas da perna, desde que administrado por profissionais adequadamente treinados e fundamentados em parâmetros de aplicação cientificamente comprovados.

Há demonstração concreta que o US induz a proliferação celular em fibroblastos promovendo reparo da pele e, neste caso, conhece-se inclusive a rede

complexa de sinalização envolvendo integrinas, RhoA/ROCK- e Src-ERK induzida pelo US (ZHOU et al., 2004).

b) Aplicação do ultrassom em lesões tendíneas

Diferentemente da maioria dos tecidos moles, os tendões e outros tecidos conjuntivos densos têm taxa de reparo lenta, e precisam de várias semanas de recuperação para adquirir a capacidade necessária para transmissão da força gerada por seus músculos homônimos. Além da proliferação celular, deve ocorrer a síntese de grandes quantidades de colágeno suficientemente polimeralizado e organizado para transmitir as forças de suporte de peso e locomoção (ENWEMEKA, 1989; GUM et al., 1997).

As lesões tendíneas (seja durante a fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento) tem sido beneficiadas pela aplicação do US em experimentos realizados com ratos e coelhos (ENWEMEKA, 1989; JACKSON et al., 1991; GUM et al., 1997; NG et al., 2003).

Os estudos envolvendo a aplicação precoce do US nas lesões tendíneas mostram efeitos benéficos de sua aplicação quando se avalia a taxa de deposição de colágeno (JACKSON et al., 1991; GUM et al., 1997) e os parâmetros como eficiência biomecânica como a força máxima de ruptura e a capacidade de absorção de energia (ENWEMEKA, 1989; GUM et al., 1997; Ng et al., 2003).

O uso do US no tratamento de tendinites calcificadas de ombro foi investigado por EBENBICHLER et al., 1999, através de mensurações objetivas e subjetivas incluindo: avaliação radiológica, dor, atividades da vida diária, amplitude de movimento ativa, força e qualidade de vida. Tanto na avaliação radiológica como

na clínica, o grupo tratado com o US obteve resultados significativamente melhores, que persistiram por pelo menos 9 meses após o experimento.

GAN et al., 1995, ao examinar os efeitos do USp aplicado em diferentes intervalos pós-operatórios, nos tendões flexores cirurgicamente reparados, em um modelo experimental utilizando galinhas, relatou resultados histológicos e funcionais benéficos dessa modalidade terapêutica. Nos grupos tratados com o US houve uma diminuição do infiltrado inflamatório e um padrão mais regular da formação cicatricial, principalmente quando a aplicação do US era feita precocemente. A amplitude de movimento nos animais tratados com o US também foi beneficiada sem qualquer efeito adverso sobre a força tensional dos tendões.

Em resumo, os resultados indicam que a aplicação de US promove regeneração eficiente do tendão, uma vez que estimula a deposição de grandes quantidades de colágeno, que é o principal componente da matriz extracelular destes órgãos (NG et al., 2003).

c) Aplicação do ultrassom nas lesões cartilagíneas e ósseas

O USp de baixa intensidade também tem sido indicado como um recurso biofísico para melhorar o reparo de fraturas. A revisão de HADJIARGYROU et al., 1998 relata sua capacidade de acelerar e melhorar a reparação de fraturas agudas, bem como sugere a eficácia desse tratamento nos casos de retarde de consolidação e de pseudoartroses. É interessante observar que variáveis individuais, tais como sexo, idade, início da descarga de peso, grau, tipo e localização da fratura, não influenciaram os resultados positivos da aplicação de US (HECKMAN et al., 1994).

Além do efeito benéfico na consolidação de fraturas, ocorre uma significativa atividade osteoblástica, formação óssea, fusões maduras e diminuição de fibrose em coelhos submetidos à artrodese de coluna que receberam tratamento com USp de baixa intensidade (AYNACI et al., 2002).

Em modelo de osteoartrite em ratos (estágios I, II e III) demonstrou-se que o US estimula o reparo da cartilagem nos estágios precoces e previne a deterioração adicional nos casos avançados (HUANG et al., 1997).

BINDER et al. (1985) ao avaliar o efeito do US pulsado na recuperação de pacientes com epicondilite lateral com diferentes graus de gravidade, relatou resultados positivos em 63% dos pacientes tratados com essa modalidade e em 29% dos que receberam o US placebo, sendo que a melhora nas variáveis estudadas (dor e atividades funcionais) foi sempre significativamente maior no grupo tratado em relação ao placebo a partir da quarta semana de tratamento acentuando-se na oitava.

d) Aplicação de ultrassom em lesão muscular

A aplicação do ultrassom é freqüentemente realizada na reabilitação como uma terapia complementar no tratamento de várias disfunções músculoesqueléticas (WILKIN et al., 2004). Tem sido indicada com o objetivo de promover analgesia (ESENYEL et al., 2000; ALMEIDA et al., 2003), reduzir hematomas (STRATTON et *al.*, 1984; GIOMBINI et al., 2001); aumentar a capacidade de extensibilidade muscular (WESSLING et al., 1987) e estimular o reparo do tecido muscular propriamente dito (RANTANEN et al., 1999; KARNES; BURTON, 2002; WILKIN et al., 2004; PIEDADE et al., 2008).

37

O estudo experimental dos efeitos do US em lesões musculares tem como marco o trabalho de RANTANEN et al., 1999, em modelo de músculo gastrocnêmio de ratas após uma contusão e posterior tratamento com o USp. A avaliação do processo de reparo foi feita através da quantificação da área coberta por miotubos e da proliferação dos fibroblastos e das células satélites. Embora neste estudo não tenha sido possível verificar o aumento de miotubos nos animais tratados, detectou-se um aumento de atividade proliferativa das células precursoras miogênicas e dos fibroblastos. Desta forma a proliferação dos fibroblastos poderia incrementar a produção de tecido fibroso, comprometendo o possível efeito positivo do US sobre a proliferação das células satélites e conseqüente regeneração muscular.

A aplicação do US pulsado sobre o músculo gastrocnêmio lacerado de ratos promoveu um aumento estatisticamente significativo na quantidade de miotubos na zona de regeneração aos 14 dias após a lesão nas lesões tratadas com o US (PIEDADE et al., 2008). Contraditoriamente, os resultados de WILKIN et al., 2004, obtidos em um elegante estudo morfométrico que avaliou a área ocupada por miotubos e a quantidade de núcleos de células musculares em modelo de contusão em rato, sugerem que o US não promove efeito benéfico sobre a regeneração muscular.

Nas lesões de gastrocnêmio tratadas com USp, PIEDADE et al. (2008) demonstraram o aparecimento de fibras grossas de colágeno (constituídas por colágeno do tipo I) já aos 4 dias após a lesão, sugerindo que o US poderia estimular a síntese precoce de fibras colágenas com maior grau de agregação. Ainda assim, apesar da radiação ultra-sônica induzir a deposição e a agregação de fibras colágenas, essa maior quantidade de tecido conjuntivo parece não foi suficiente para impedir a miogênese. Outra observação interessante é que as lesões tratadas com US, apesar de apresentarem fibras colágenas mais grossas na zona de regeneração, possuíam um melhor arranjo estrutural com um alinhamento mais regular dos miotubos em formação (PIEDADE et al., 2008). Considerando essa evidência, que confirma a sugestão de TERADA et al., 2001 sobre a relação entre o alinhamento das fibras colágenas e das células musculares em regeneração, pode-se supor que o papel benéfico US no remodelamento muscular poderia resultar em uma melhor performance biomecânica (DYSON et al., 1968; GAN et al., 1995).

O efeito benéfico da aplicação do US também foi demonstrado do ponto de vista biomecânico em um modelo de lesão da musculatura esquelética por contrações excêntricas repetidas, no qual uma série de aplicações diárias de USc melhorou significantemente o índice funcional de lesão dos músculos do grupo tratado que reflete a força tetânica máxima (KARNES; BURTON, 2002).

Neste contexto, sugere-se que o US representa um estímulo mecânico, que se soma aos estímulos inflamatórios presentes na lesão muscular, aos quais as células respondem com alterações adaptativas, com ativação da proliferação celular e fibrogênese. Dessa maneira, é possível sugerir que a proliferação de células satélites também poderia ser estimulada pelo efeito mecânico do US.

1.8 Estereologia

A necessidade de produzir dados quantitativos confiáveis sobre os componentes dos tecidos estimulou o desenvolvimento e o uso de métodos

39

estereológicos nas ciências biológicas. Através da estereologia podem-se obter informações sobre os tecidos (estruturas tri-dimensionais) baseadas em dados medidos em cortes histológicos (bi-dimensionais). A estereologia pode ser definida como: "Um conjunto de métodos matemáticos, relacionando parâmetros tridimensionais que definem uma estrutura com medidas bi-dimensionais obtidas em cortes dessa estrutura" ou ainda "Um conjunto de procedimentos geométricos e estatísticos que permitem obter informações sobre estruturas tridimensionais, a partir da análise de imagens planas, bidimensionais, como aquelas obtidas em cortes histológicos preparados para a microscopia de luz e eletrônica" (WEIBEL, 1979).

Desse modo, medindo-se parâmetros dos perfis das estrutruras observáveis em cortes dos tecidos, podem-se extrapolar informações sobre as estruturas no espaço tri-dimensional.

A estereologia estima densidades: densidades de volume (Vv); densidade de comprimento (Lv); densidade de superfície (Sv) e densidade numérica (Nv). Também podem ser estimadas densidades por área, como por exemplo, densidade de área (A_A) e densidade numérica por área (N_A ou Q_A) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003)

A base da estereologia se encontra no princípio formulado pelo geologista francês August Delesse, em 1847: "A densidade de volume dos componentes de uma rocha é igual à sua densidade das áreas destes componentes que aparecem em cortes representativos feitos ao acaso". Pelo princípio de Delesse pode-se afirmar:

Area do componente		Volume do componente	
Á	rea da rocha		Volume da rocha
ou seja:		$A_A = V_V$	

As medidas estereológicas só são válidas se as amostras forem representativas do tecido e tomadas randomicamente. Desse modo, podem-se obter resultados fidedignos se forem feitos cortes randômicos de estruturas que não se distribuem de maneira aleatória no tecido, ou num único corte se as estruturas apresentarem uma distribuição randômica. Seguindo-se esse princípio, não é necessário assumir qualquer padrão para a estrutura de interesse antes do início dos estudos (GUNDERSEN et al., 1988).

Para garantir uma amostragem randômica do material de estudo devese considerar que as estruturas biológicas geralmente não são homogêneas, apresentando variações regionais, e não são isotrópicas, ou seja, a aparência dos perfis varia dependendo da orientação do tecido. Isso porque as estruturas biológicas raramente apresentam uma distribuição aleatória nos tecidos. Se o material de estudo for isotrópico, ou seja, não apresentar uma orientação preferencial, como os alvéolos pulmonares, por exemplo, é utilizado o esquema de cortes Isotrópicos Uniformes Randômicos (cortes IUR) para a amostragem do material. Por outro lado, em algumas situações, como na pele, faz-se necessário algum controle sobre como o tecido é fatiado para amostragem. Para isso foi desenvolvido outro esquema para escolha dos locais de amostragem, que ainda garante randomicidade, chamados cortes Verticais Uniformes Randômicos (VUR) No método de amostragem de cortes verticais deve-se considerar um plano horizontal e um eixo vertical, perpendicular a ele, paralelo ao qual os cortes serão realizados. O plano horizontal pode ser escolhido pelo pesquisador, entretanto, a orientação do corte no eixo vertical deve ser determinada aleatoriamente, de forma que qualquer direção tenha a mesma chance de ser escolhida (GUNDERSEN et al., 1981).

41

Podem-se obter informações sobre o número, o volume, o comprimento e a área de superfície das estruturas, empregando-se regras simples para a contagem. As medidas são feitas nos cortes, tendo-se como base o perfil bidimensional dos componentes de interesse. É indispensável que seja determinado um compartimento de referência, pois as medidas são obtidas como densidades ou concentrações: número de mitocôndrias no citoplasma, densidade de volume dos núcleos no epitélio, comprimento dos vasos no glomérulo, área de superfície das circunvoluções no córtex cerebral.

Quando se analisam razões corre-se sempre o risco de que aconteçam alterações nos dois componentes (objeto e compartimento de referência) e isso pode levar a conclusões equivocadas. Se há um aumento proporcional nas duas estruturas, a razão medida não se altera, dando a falsa impressão de que não houve mudanças. Por isso, o ideal é calcular sempre os valores absolutos sobre o objeto, pois isso fornece resultados fidedignos e indubitáveis, além de permitir a comparação entre os dados de diferentes grupos de estudo. Se a densidade de área, ou volume, for multiplicada pelo volume do compartimento de referência, teremos o valor absoluto do volume do componente analisado.

$V_V \times V$ olume da rocha = Volume total do componente na rocha

O volume total do órgão pode ser obtido pesando-se o tecido a fresco. Pesa-se um frasco contendo uma solução com a mesma densidade do tecido, mergulha-se o tecido por completo na solução e pesa-se novamente. A diferença entre as pesagens corresponde ao peso do tecido; o volume do órgão em questão (em mm³) pode ser considerado como o peso (em gramas) x 1000 (SCHERLE, 1970). Em algumas situações, este método pode não ser adequado, ou, é necessário saber o volume de um compartimento de referência que não é um órgão inteiro, mas sim parte de um órgão (volume da valva mitral no coração, por exemplo). Pode-se utilizar o método de Cavalieri que, no século XVII, demonstrou que o volume de qualquer objeto pode ser estimado se o objeto for seccionado em fatias paralelas de espessura conhecida, a seguir somam-se todas as áreas de todos as fatias do objeto e multiplica-se este resultado pela espessura dos cortes.

Em relação à análise morfológica do reparo muscular, a descrição histopatológica da lesão já foi feita por muitos autores, no entanto, apenas nosso grupo de pesquisa realizou um estudo quantitativo (PIEDADE et al., 2008). Como já foi comentado anteriormente, os nossos resultados mostram que ainda que o USp estimule a deposição das fibras colagênicas, há uma quantidade maior de miotubos, sugerindo que o aumento na deposição de colágeno não foi capaz de impedir o crescimento e diferenciação das células musculares. No entanto, não foram aplicados os conceitos da estereologia para obtenção desses dados morfométricos, de modo que não foi possível avaliar como o USp afeta as dimensões reais da lesão (e de cada uma de suas zonas), assim como a dimensão real da deposição de colágeno.

Assim sendo, no presente estudo pretende-se determinar o volume ocupado pelas lesões no músculo, assim como o volume ocupado pelo colágeno na lesão, através da aplicação de técnicas da estereologia, no sentido de contribuir para a análise do efeito do ultrassom no fechamento da ferida e cicatrização.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar os efeitos da aplicação do ultrassom no reparo de lesão muscular em modelo experimental de lesão lacerativa do gastrocnêmio de ratos, com ênfase na avaliação biomecânica e na avaliação estereológica do volume da lesão, volume de tecido fibrótico e densidade vascular.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar o volume absoluto da lesão e de cada um dos seus compartimentos (zona central e zona regenerativa), pela aplicação de métodos estereológicos em diferentes tempos do processo de reparo de laceração.
- Estimar o volume absoluto da lesão ocupado por fibras colagênicas, pela aplicação de métodos estereológicos em diferentes tempos do processo de reparo de laceração.

- Estimar o volume absoluto de vasos na lesão, pela aplicação de métodos estereológicos em diferentes tempos do processo de reparo de laceração.
- Avaliar o comportamento biomecânico do músculo lesado, através de teste de tração, em diferentes tempos do processo de reparo de laceração.

3 MATERIAIS E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O estudo histomorfométrico foi realizado no Laboratório de Biologia Celular (LIM 59), enquanto que os testes biomecânicos foram realizados no Laboratório de Biomecânica (LIM 41).

3.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com 4 meses, machos, pesando cerca de 400 gramas, procedentes do Biotério da FMUSP. Para o estudo histológico foram utilizados 40 animais e outros 40 para o estudo biomecânico. Os animais foram mantidos a 22ºC, em gaiolas com livre acesso à água e alimento, e iluminação artificial (luzes acesas das 8:00 às 18:00 hs).

3.2 Grupos

Oitenta animais foram submetidos à lesão da cabeça medial do músculo gastrocnêmio direito, utilizando um equipamento elétrico desenvolvido para

este estudo no Laboratório de Biomecânica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), cuja aplicabilidade foi testada antes do início desse experimento (**Figura 5**).



Figura 5 – Fotografia do equipamento para obtenção de lesões musculares lacerativas homogêneas. Associado à lâmina que produz a lesão localiza-se um paquímetro digital que orienta a profundidade do corte. Na imagem à esquerda aparece o equipamento inteiro constituído por uma haste acoplada a uma plataforma de madeira (apontada pela seta verde) onde é colocado o animal. Na extremidade inferior da haste está presa a lâmina giratória (indicada pela seta vermelha) que produz a lesão muscular. Na região central da haste há um paquímetro (visível na imagem da direita) que permite controlar a profundidade da lesão.

Metade dos animais recebeu tratamento local com o ultrassom pulsado (USp) a partir do dia 02 de pós-operatório, considerando o dia da cirurgia como dia zero; outros 40 animais constituíram os grupos controles, que sofreram a lesão muscular e não receberam tratamento algum. Os animais controles e tratados foram sacrificados em cada tempo experimental (4, 7, 14 e 24 dias após a lesão), formando os grupos 4C e 4US, 7C e 7US, 14C e 14US, e 24C e 24US, respectivamente, cada um deles constituído por 10 animais (estes dias foram escolhidos por corresponderem a diferentes fases do processo cicatricial). As aplicações de USp foram realizadas diariamente, até os 14 dias após a lesão e a cada 2 dias após este

período, de modo que os animais receberam 2, 5, 12 ou 22 aplicações de USp durante o experimento; dos 10 animais de cada grupo, 05 foram utilizados para o estudo morfológico e 05 foram utilizados para o estudo biomecânico.

3.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de quetamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Após a indução anestésica, foi feita uma incisão em "Y" na pele da pata traseira direita (face posterior) para permitir o acesso ao músculo gastrocnêmio, localizado sob o músculo bíceps femoral. Uma vez identificada, a cabeça medial do gastrocnêmio foi separada dos demais músculos da pata, sem desinserção dos tendões, através de uma pequena espátula (**Figura 6**).



Figura 6 - 6A: Fotografia mostrando a incisão em "Y" na pele da pata traseira direita para permitir o acesso ao músculo gastrocnêmio. 6B: Fotografia mostrando a cabeça medial do gastrocnêmio separada dos demais músculos através de uma espátula.

Com uma das extremidades da espátula fixada à máquina com um parafuso, a lâmina era encostada no músculo através de outro parafuso de ajuste fino. A posição da lesão foi padronizada em todos os animais: posicionando-se o calcanhar a 90º na borda da plataforma, realizava-se o corte 2,5cm em direção cranial, a partir da borda do calcâneo (**Figura 7**).



Figura 7. Fotografia mostrando o posicionamento da pata para a realização da lesão. Calcanhar a 90º, com a lâmina encostada no músculo à 2,5cm em direção cranial, a partir da borda do calcâneo.

A lâmina era encostada ao músculo e acionada eletricamente, girando inicialmente no sentido horário, até ser atingida metade da profundidade desejada (1,5 mm), sendo essa distância indicada pelo paquímetro digital (**Figura 8A**), em seguida, a rotação da lâmina era invertida para o sentido anti-horário e completava o corte até atingir 3,0 mm (**Figura 8B**). A medida final de cada lesão foi de 11mm x 3mm. A **Figura 8C** mostra o aspecto final da lesão.



Figura 8. 8A: Visor do paquímetro mostrando a profundidade de 1,5mm com o sentido horário de rotação da lâmina. 8B: Visor do paquímetro, ao final do procedimento de corte, mostrando 3mm de profundidade com o sentido anti-horário de rotação da lâmina. 8C: Fotografia mostrando a secção transversal da cabeça medial do músculo gastrocnêmio medindo 11mm de largura e 3mm de profundidade.

Após hemostasia por compressão, o músculo bíceps femoral foi suturado com fio catgut simples 5.0, recobrindo a lesão e, em seguida, a pele foi suturada com fio de nylon tech-lon* 4-0 com aplicação de álcool iodado para evitar infecção. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sem restrição de movimentação até a eutanásia. Foi administrado paracetamol diluído em água até o dia da eutanásia para analgesia.

3.4 Aplicação de ultrassom pulsado

Para aplicação do USp foi utilizado o modelo US Pro Seven 1MHz 977 Standard, da marca Quark, cedido pela Universidade São Judas Tadeu (**Figura 9**). Foi feita uma depilação da área tratada e após a aplicação com gel como meio de acoplamento, esse era removido com papel toalha, e até a cicatrização do epitélio foram feitas aplicações de iodopovidona.



Figura 9 – Fotografia mostrando o procedimento de aplicação do ultrassom na pata do rato.

A escolha dos parâmetros do US seguiu as indicações de PIEDADE et

al. (2008). O quadro abaixo resume os parâmetros utilizados:

Distância entre o cabeçote e a área tratada: 5mm Frequência de operação: 1MHz Modo de operação: Pulsado Ciclo útil: 50%, com *Ton* de 5ms e *Toff* de 5ms Frequência de repetição dos ciclos: 100Hz Potência de saída: 4W Intensidade efetiva: 0,57W/cm² Área geométrica do cabeçote: 8,5cm² Área de radiação efetiva (ARE): 3,5cm² mais ou menos 20% Taxa de não uniformidade do feixe (TNF): < 6,0 Tempo de aplicação: 5 minutos Técnica de aplicação: Circular com gel Frequência e início das aplicações: diárias, iniciando no segundo dia de pós-operatório, sendo o dia da cirurgia considerado "dia zero".
3.5 Eutanásia

No 4º, 7º, 14º e 24º dias após a lesão, a cabeça medial do músculo gastrocnêmio foi coletada com os animais anestesiados e na seqüência foi aplicada uma dose excessiva de anestésico para eutanásia. As carcaças dos animais foram descartadas segundo as normas do Grupo de Gerenciamento de Resíduos descritas na Cartilha de Orientação para Descarte de Resíduos no Sistema do HCFMUSP.

3.6 Estudo histológico

Para obtenção dos dados morfométricos foram aplicadas técnicas de estereologia, de modo a obter informações quantitativas de forma simples, eficiente, precisa e imparcial, ou seja, sem vício ou tendência (GUNDERSEN, 1988). Os procedimentos descritos a seguir são indispensáveis para garantir a eficiência e a imparcialidade da técnica estereológica.

3.6.1 Coleta e Fixação do Material

A cabeça medial do músculo gastrocnêmio foi retirada, a porção tendínea foi desprezada e o ventre muscular pesado em uma balança de alta

precisão. Para tanto, pesou-se um frasco contendo solução fisiológica e em seguida mergulhou-se músculo por completo na solução e pesou-se novamente. A diferença entre as pesagens, em gramas, correspondeu ao peso muscular, que é igual ao seu volume em milímetros cúbicos (SCHERLE, 1970).

Após a pesagem, a face muscular sem lesão foi colocada sobre um papel de filtro para evitar a torção; a fixação foi feita em paraformaldeído a 4% em PBS por 24 horas, à temperatura ambiente.

3.6.2 Amostragem estereológica

Uma vez que existe uma orientação preferencial para a observação da lesão ao microscópico, necessita-se obter cortes histológicos que passassem transversalmente ao maior eixo da lesão, optou-se pelo recorte do material seguindo a técnica de cortes verticais uniformes randômicos (VUR), segundo GUNDERSEN (1981). O músculo foi emblocado em ágar a 4% e mantido sob refrigeração em geladeira por 2 horas, até endurecerem para conferir maior precisão de corte.

O eixo vertical foi estabelecido passando paralelamente ao maior eixo do músculo. As fatias de tecido foram obtidas randomicamente, porém sempre paralalemente ao eixo vertical. Para tanto, coloca-se o bloco de ágar sobre o centro de um disco orientador com marcações não eqüidistantes (GUNDERSEN, 1981). Usando-se uma tabela de números randômicos determina-se aleatoriamente uma direção para o plano de corte em cada músculo (**Figura 10**). Em um mesmo músculo, as fatias foram obtidas de acordo com este único plano, ou seja, todas as fatias de um mesmo músculo foram paralelas entre si, portanto, todas as fatias corresponderam a cortes musculares longitudinais. Para o músculo seguinte determinava-se uma nova direção de corte, porém sempre paralela ao eixo vertical.



Figura 10 – Ilustração do músculo (*) incluído em agar (seta) de acordo mostrando o eixo vertical e do procedimento de randomização para obtenção da fatias musculares, segundo o método de cortes verticais uniformes randômicos (VUR). O bloco de agar colocado aleatoriamente sobre o disco orientador de construção não equidistante. A lâmina era posicionada sobre o bloco de agar na direção indicada pela tabela de números randômicos.

Seguindo esse plano, foram feitos cortes seqüenciais com aproximadamente 1,0 mm de espessura de todo o músculo. Para se atribuir um valor de espessura a estas fatias (uma vez que é muito difícil que todas meçam exatamente 1,0 mm), as fatias foram empilhadas e a espessura total foi medida com um paquímetro. Assim, foi possível determinar a espessura média das fatias. O número de fatias variou entre os casos em razão da determinação aleatória da direção de corte em cada caso.

As fatias de cada músculo foram então cuidadosamente organizadas em sequência e numeradas. Uma das faces de cada fatia foi marcada com nanquim, para que pudesse ser colocada voltada para cima quando da inclusão em parafina. 3.6.3 Processamento do material para histologia e método de identificação

Os fragmentos foram lavados e desidratados em gradientes de concentração de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina com a face marcada com nanquim para cima. Cortes seriados de 5µm de espessura foram obtidos e distendidos em lâminas de vidro. Foram obtidos cortes histológicos de cada uma das fatias de músculo, em todos os casos. As lâminas foram codificadas e o código revelado somente após a obtenção dos dados quantitativos para garantir uma análise cega. Após hidratação, as lâminas foram coradas pelos seguintes métodos de identificação histológica:

a) Hematoxilina-eosina

Os cortes de tecido foram corados pela hematoxilina-eosina para estudo histológico geral, por ser esta uma coloração clássica para identificação histopatológica de rotina.

b) Picrossírius-polarização

Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e corados durante uma hora com Sirius Red 0,1% (Sirius Red F 3 B 200, Mobay Chemical Co. Union, New Jersey, EUA) dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico sendo, em seguida, rapidamente lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina de Harris, por 5 minutos (JUNQUEIRA et al., 1978).

Com a coloração pelo Picrossírius, além da possibilidade de identificar o colágeno que adquire uma intensa coloração vermelha quando analisado sob luz convencional, também é possível realizar a avaliação qualitativa de seu grau de agregação quando as lâminas são analisadas sob luz polarizada, conforme o método descrito por JUNQUEIRA et al. (1978): além de se mostrarem birrefringentes, as fibras que contêm colágeno, assumem intensidades de birrefringência variadas, resultantes dos diferentes graus de agregação física do colágeno; dessa forma, fibras finas, como as presentes no tecido de granulação jovem, são reveladas como estruturas esverdeadas fracamente birrefringentes, enquanto as fibras grossas, que caracterizam lesões fibróticas maduras, definem-se por sua forte birrefringência de coloração amarela a vermelha.

3.6.4 Análise estereológica dos volumes e das zonas central e regenerativa e volume da lesão

Um corte histológico, corado com HE, de cada uma das fatias musculares foi usado para o cálculo dos volumes das zonas central e regenerativa (cuja soma corresponde ao volume ocupado pela lesão no músculo como um todo), tanto nos grupos controle como tratados com ultrassom nos diferentes tempos póslesão.

A coloração do HE foi escolhida, pois se identificam facilmente as zonas central (ZC), de regeneração (ZR) e de células musculares preservadas (ZP).

Foi considerada ZC aquela região entre os cotos musculares com infiltrado inflamatório, coágulo e presença de tecido de granulação. Já a ZR, foi identificada entre a ZC e a ZP como sendo uma área com miotubos e mioblastos e nas lesões mais recentes com a presença de fibras musculares em sofrimento. A ZR foi diferenciada da ZP pelas diferenças estruturais entre os miotubos e as células musculares maduras, uma vez que essas células são mais eosinófilas que os miotubos além de serem mais calibrosas e possuírem núcleos periféricos (THORSSON et al., 1998; PIEDADE ET al., 2008).

Foram obtidas imagens digitais de cada corte histológico em que a laceração foi observada, utilizando-se objetiva de 4 vezes, de modo a cobrir toda a extensão da laceração, incluindo as zonas central, de regeneração e a transição com o tecido preservado. Para captação da imagem utilizou-se um sistema composto por um microscópio Nikon Eclipse E600 acoplado a uma câmara de vídeo digital Nikon DXM1200F. Imagens digitais de alta resolução foram gravadas pelo programa Nikon ACT-1 em um microcomputador acoplado ao sistema.

A seguir, as imagens obtidas foram transferidas para o programa Image J, do National Institute of Health (USA), para facilitar o armazenamento dos dados obtidos. Um retículo de pontos, com uma área relacionada a cada ponto de 40.000µm², foi sobreposto às imagens e foram contados os pontos que incidiram sobre as zonas central e de regeneração (**Figura 11**).



Figura 11 – Ilustração do método de contagem de pontos aplicado para a avaliação do volume das zonas de central e de regeneração e da lesão como um todo. A seta verde mostra um ponto sobre a zona de regeneração e a seta preta mostra um ponto sobre a zona central.

Para o estudo quantitativo da fração de volume ocupada pelas ZC e ZR

na lesão foram considerados os pontos contados separadamente para cada zona.

Para cada corte histológico, determinou-se a área correspondente à

cada zona, pela multiplicação do número de pontos incidentes sobre a ZC ou ZR

pela área associada a cada ponto do retículo.

 $Azc = (Pontos ZC \times 0.04 mm^2)$

 $A_{ZR} = (Pontos ZR \times 0.04 mm^2)$

A soma das áreas da ZC e ZR corresponde à área da lesão como um

todo em um determinado corte histológico.

Alesão = AZC + AZR

A seguir, pelo método de Cavalieri (GUNDERSEN, 1981), a soma da área da lesão em todos os cortes histológicos estudados de cada músculo, foi multiplicada pela espessura média das fatias cortadas segundo a técnica VUR, para obtermos o volume total da lesão em cada músculo. Para se compreender qual é a contribuição de cada zona para o volume total da lesão, foi calculado a fração de volume (Vv) da ZC ou da ZR (Vvzc ou VvzR) dividindo o volume da zona central ou regenerativa pelo volume da lesão para cada tempo experimental. Para melhor compreensão, esta razão foi apresentada em porcentagem.

$$Vvzc = (Vzc) / Vlesão) x 100$$

 $VvzR = (VzR) / Vlesão) \times 100$

3.6.5. Análise estereológica do volume absoluto, da fração de volume, da área de superfície e da fração de área de superfície de vasos sanguíneos

Para o estudo quantitativo dos vasos sanguíneos na lesão, foram analisadas as lâminas coradas com HE tanto nos grupos controle como tratados com ultrassom nos diferentes tempos pós-lesão.

Foram obtidas de 2 a 4 imagens digitais randomicamente selecionadas de cada corte histológico contendo a lesão, utilizando-se objetiva de 20x. Para captação da imagem utilizou-se um sistema composto por um microscópio Nikon Eclipse E600 acoplado a uma câmara de vídeo digital Nikon DXM1200F. Imagens digitais de alta resolução foram gravadas pelo programa Nikon ACT-1 em um microcomputador acoplado ao sistema.

A seguir, as imagens obtidas foram transferidas para o programa Image J, do National Institute of Health (USA), para facilitar o armazenamento dos dados obtidos. Um retículo de 63 pontos e ciclóides, com uma área associada a cada ponto (a/p) de 3610,23µm² e uma relação do comprimento das linhas do retículo pela área associada a cada ponto (I/p) de 36,56µm foi sobreposto às imagens para a obtenção dos dados. Neste experimento, por se tratar de cortes verticais uniformes randômicos (VUR), o uso de um retículo de ciclóides é necessário para avaliação de superfícies, ao invés do retículo de fragmentos de retas, que servem para avaliar superfícies em cortes sem orientação preferencial.

Para a estimativa da fração de volume e do volume absoluto de vasos sanguíneos na área da lesão foram contados os pontos que incidiram sobre vasos sanguíneos e o total de pontos que incidiram na lesão. A fração de volume (expressa em porcentagem de vasos snguíneos na lesão) foi assim calculada:

.

O volume absoluto de vasos sanguíneos foi obtido multiplicando a fração de volume de vasos pelo volume absoluto da lesão previamente estimado pelo método de Cavalieri.

A equação utilizada para o cálculo da fração de superfície de vasos sanguíneos na lesão foi:

$$Sv = (2 \times i) / (I/p \times P)$$
 onde

 i = o número de intersecções entre a parede dos vasos sanguíneos e as ciclóides;

 (l/p) = a relação do comprimento das ciclóides do retículo pela área associada a cada ponto (no caso, 36,56µm);

P = o número de pontos incidentes sobre a lesão

A área total de superfície dos vasos sanguíneos na lesão foi obtida multiplicando a fração de superfície de vasos sanguíneos pelo volume absoluto da lesão previamente estimado por Cavalieri.

3.6.6 Análise estereológica do volume absoluto e da fração de volume de fibras colagênicas

Para o estudo quantitativo do volume absoluto (V) e da fração volumétrica (Vv) de tecido ocupado por fibras que contém colágeno, foram analisadas as lâminas coradas com Picrossírius-hematoxilina; por esta técnica o colágeno fibrilar aparece corado em vermelho intenso quando observadas sob luz convencional (não polarizada).

Foram obtidas de 2 a 4 imagens digitais da lesão usando uma amostragem randômica uniforme em cada corte histológico contendo a lesão, utilizando-se objetiva de 10 vezes. Para captação da imagem utilizou-se um sistema composto por um microscópio Nikon Eclipse E600[®] acoplado a uma câmara de vídeo digital Nikon DXM1200F[®]. As imagens digitais de alta resolução foram captadas em um microcomputador acoplado ao sistema.

Cada imagem obtida dos cortes corados com Picrossírius-hematoxilina foram processadas, com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0[®], de modo a selecionar, por escala de cores, apenas as fibras colagênicas, visualizadas por sua intensa coloração em vermelho (**Figura 12**).



Figura 12 – 12 A – Fotomicrografia de corte histológico da lesão muscular aos 7 dias tratada com ultrassom. O corte foi corado com Picrossírius-hematoxilina. O colágeno aparece fortemente corado em vemelho. 12 B – Imagem da mesma área do corte anterior, mostrando a seleção do colágeno. Imagens semelhantes foram utilizadas para avaliação da área ocupada por colágeno no campo microscópico.

As imagens foram então transferidas para o programa Image J[®], do *National Institute of Health*, que permitiu o cálculo da área a área ocupada pelo colágeno fibrilar na lesão e área da lesão.

Sabendo-se que a fração de área ocupada por uma estrutura num dado compartimento de referência num corte bidimensional (ex.: fração de área ocupada por colágeno fibrilar no processo de reparo medida em cortes histológicos) corresponde à fração de volume dessa mesma estrutura no espaço tridimensional do tecido onde ela se encontra, pode-se calcular:

Vvfibras colagênicas = Aafibras colágenas / Área da lesão

Multiplicando a fração de volume de fibras colagênicas pelo volume total da lesão (já calculado por Cavalieri), pode-se calcular o volume absoluto das fibras colagênicas na lesão.

3.7 Estudo Biomecânico

Ao término de cada tempo experimental proposto, os animais destinados aos testes de tração foram anestesiados e, com o animal ainda vivo para evitar a degeneração muscular, o fêmur foi desarticulado com a origem da cabeça medial do músculo gastrocêmio preservada e também sua inserção na pata do animal. Todas as outras estruturas (tíbia, fíbula e outros músculos da pata) foram retiradas (JÄRVINEN, 1976), deixando a cabeça medial do gastrocnêmio como a única estrutura de ligação entre o joelho e a pata do animal. O tempo máximo entre a retirada do material dos animais e a realização do teste de tração não foi superior a 10 minutos.

O material retirado para o ensaio biomecânico foi colocado em solução fisiológica e procedeu-se à avaliação da área transversal do terço médio do ventre muscular. Para tanto, foi músculo foi encaixado longitudinalmente em uma canaleta com 8,0 mm de largura; esta canaleta estava acoplada a um sistema composto a uma haste associada a um medidor de altura (relógio comparador, marca Mitutoyo, com resolução de 0,01mm). A haste era baixada até encostar-se à superfície muscular e a leitura do seu deslocamento era anotada. A variação do deslocamento da haste na caneleta vazia e na canaleta contendo o músculo correspondeu à altura do músculo (**Figura 13**). Á área da secção transversal foi calculada pela multiplicação de 8,0 pela altura do músculo medida na canaleta (base x altura).



Figura 13 - Medidor de altura utilizado para o cálculo da área transversal muscular

Essa medida foi realizada com o objetivo de levar em consideração as possíveis variações individuais que poderiam existir entre os espécimes testados no momento de determinar a força de ruptura do músculo. Dessa forma, os resultados do teste de tração serão apresentados em termos de tensão máxima e não força máxima.

Os espécimes foram preparados para os testes fixando-se as regiões dos terços distal e médio do fêmur dentro de um cilindro confeccionado para esse estudo que fornecia um acoplamento perfeito do osso (**Figura 14**).



Figura 14 – Perna preparada para o ensaio de tração com fêmur fixado ao cilindro.

O ensaio de tração do complexo músculo-tendíneo foi feito em máquina universal de ensaios mecânicos KRATOS® 5002, com célula de carga (dinamômetro) de 100 kgf com escala ajustável para 10 kgf e resolução de 0,010 kgf.

Os valores de força e deformação foram adquiridos em tempo real por um sistema de aquisição de dados marca LYNX® modelo ADS2000, diretamente em um computador. A velocidade de ensaio foi de 20 mm/minuto.

O cilindro contendo o fêmur foi posicionado de modo que o gastrocnêmio ficasse paralelo ao eixo longitudinal da máquina, com a inserção distal do músculo para cima. O cilindro foi preso à base da máquina através de um torno de bancada. Na outra extremidade, a pata foi fixada a uma garra conectada à célula de carga presa na parte móvel da máquina de ensaios, permitindo que o complexo músculo-tendíneo se alinhasse ao eixo de movimento da máquina (**Figura 15**).



Figura 15 – 15A: Máquina universal de ensaios mecânicos com o músculo já posicionado pronto para o teste de tração. 15B: Detalhe da aparência normal do músculo preso à garra e à morsa no início do teste. 15C: Aparência estirada do músculo já na fase final do teste de tração. Antes do início do ensaio, o espécime foi submetido a uma pré-carga de 0,5N (CRISCO et al., 1994) por 30 segundos com o objetivo de promover a acomodação do sistema.

Após a pré-carga, o ensaio prosseguiu e a carga aplicada foi registrada pelo software em intervalos regulares de alongamento até o momento de ruptura do músculo. A partir dos gráficos força-deformação, de cada ensaio, foram obtidas e analisadas as seguintes propriedades mecânicas:

a) Tensão máxima (*T*max) em kiloPascal (kPa), calculada pela razão da força máxima pela área do músculo ensaiado.

b) Rigidez do tecido (*Rig*) em Newtons por milímetros (N/mm), definida pela razão da diferença da força (∆força) pela diferença da deformação absoluta (∆def) entre dois pontos presentes na região linear do gráfico.

c) Deformação relativa percentual (Drp), calculada pela razão da deformação absoluta pelo comprimento inicial multiplicada por 100.

3.8 Análise Estatística

A homogeneidade de variância e a normalidade da distribuição dos dados foram previamente verificadas, pelos testes de *Levene* e *Shapiro-Wil,* respectivamente. *Quando esses* parâmetros foram atendidos, usou-se os testes de *ANOVA one factor* (para comparação de mais de 2 grupos ao longo dos diferentes tempos pós-lesão), o teste *t-Student* independente para comparação entre 2 grupos tratado x controle e o *teste t-Student* pareado para comparação entre 2 grupos

submetidos ao mesmo tratamento nos diferentes tempos. Quando os parâmetros de normalidade e homogeneidade não foram atendidos, o teste *Kruskal-Wallis* foi usado para substituir o *ANOVA*, o *Mann-Whitney* para substituir o *t-Student* independente, e o *Willcoxon* para substituir o *t–Student* pareado.

Em todas as análises, quando o teste de ANOVA indicou diferença entre os grupos testados, o teste Post Hoc Tukey foi aplicado para localizar esta diferença e investigar se era estatisticamente significante ou não.

Para todos os testes realizados foi utilizado um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Desta forma, foram considerados estatisticamente significantes os testes com nível descritivo menor que 5% (p < 0,05). Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão.

4 Resultados

4.1 Complicações cirúrgicas e avaliação do material obtido

Observou-se que no segundo ou terceiro dia após a cirurgia houve a abertura de dois ou três pontos do total de 12 pontos que suturavam a pele em alguns ratos tanto do grupo controle como do grupo tratado. O animal era anestesiado e a sutura era refeita.

Todos os animais foram pesados antes da eutanasia e os músculos retirados para estudo histológico também foram pesados. O peso médio dos animais controles foi de 386,27 ± 39,42 e dos tratados com ultrassom foi de 398,05 ± 42,70. A análise estatística do peso dos animais mostrou que não houve variação significativa entre os grupos estudados em nenhum dos tempos de pós-operatório.

O peso muscular foi analisado do ponto de vista estatístico: o teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar o peso muscular nos diferentes tempos pós-operatório dentro de um mesmo tratamento; o teste t-Student independente para comparar músculos controles X músculos tratados com US em cada tempo estudado e o teste t-Student pareado para a comparação do peso do músculo de cada grupo em relação ao músculo esquerdo íntegro.

Observou-se que o músculo íntegro pesa mais que os músculos lesados tratados e dos controles nos dias 7, 14 e 24 do pós-operatório. No entanto, os músculos dos grupos 4C e 4US eram significativamente mais pesados que os

íntegros. As demais comparações não apresentaram diferenças significativas. A

Tabela 2 e o Gráfico 1 resumem os resultados obtidos para o peso muscular.

Tabela 2 – Média e desvio padrão do peso, em gramas, do músculo gastrocnêmio e resumo do resultado da análise estatística. O valor de p encontra-se na intersecção entre linhas e colunas. As diferenças são estatisticamente significativas quando o valor de p é menor que 0,05.

	Íntegro 0,887 ± 0,08							
4C 0,923 ± 0,04	(0,004)	4C 0,923 ± 0,04						
7C 0,857 ± 0,09	(0,006)	ns	7C 0,857 ± 0,09					
14C 0,760 ± 0,09	(0,005)	ns	ns	14C 0,760 ± 0,09				
24C 0,841 ± 0,04	(0,014)	ns	ns	ns	24C 0,841 ± 0,04			
4US 0,900 ± 0,02	(0,004)	ns				4US 0,900 ± 0,02	_	
7US 0,748 ± 0,10	(0,003)		ns			ns	7US 0,748 ± 0,10	
14US 0,685 ± 0,05	(0,004)			ns		(0,01)	ns	14US 0,685 ± 0,05
24US 0,825 ± 0,08	(0,044)				ns	ns	ns	ns

ns = diferença não significativa





p < 0,05 comparado a todos os grupos controles e tratados com US; * p < 0,05 entre os grupos assinalados.

4.2. Análise histopatológica qualitativa

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina foram avaliadas para descrição dos achados histopatológicos e as lâminas coradas com o Picrossírius foram usadas para avaliação da distribuição e agregação das fibras colagênicas na matriz extracelular.

A reação tecidual à lesão seguiu um padrão estrutural semelhante em todos os animais, tanto naqueles tratados com USp como não-tratados: o tecido inflamatório se infiltrou na lesão e houve a promoção do reparo tecidual.

De forma geral, pôde-se identificar, em todos os grupos as três zonas clássicas que caracterizam o tecido de reparo nos músculos traumatizados: zona central (ZC), a zona de regeneração (ZR) e a zona de células musculares preservadas (ZP).

a) Avaliação histopatológica aos 4 dias

A **Figura 16** ilustra o aspecto das ZC e da ZR aos 4 dias pós-lesão. Neste tempo, a área de reparo, de maneira geral, se caracterizava por uma grande quantidade de vasos e de células inflamatórias, ao lado de alguns perfis de células musculares em processo de degeneração.

Em relação aos elementos responsáveis pela regeneração muscular, especificamente na zona de regeneração, observaram-se células alongadas uninucleadas, com perfil estrutural de mioblastos (**Figura 17**) e alguns miotubos (resultantes da fusão dos mioblastos neoformados) na zona da lesão vizinha às células musculares preservadas (Figura 18). A zona central mostrou-se aparentemente menor nas lesões tratadas com ultrassom, em relação às não-tratadas.

As lâminas coradas pelo Picrossírius-hematoxilina foram examinadas sob luz convencional e luz polarizada para identificação do grau de agregação e disposição das fibras colagênicas. Com a luz convencional, as fibras colagências mostraram-se coradas em vermelho intenso. A análise mostra que: a) na zona central não foram identificadas fibras colagênicas, tanto nas lesões controles como nas tratadas com USp; b) de maneira oposta, na zona de regeneração, fibras de colágeno foram observadas nas lesões controles e nas lesões tratadas com ultrassom. Estas fibras apareceram mais grossas na região adjacente à zona preservada, enquanto que se mostraram mais delgadas, formando uma delicada trama tridimensional, na zona regenerativa (**Figuras 19 a 22**).



Figura 16 – Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido de músculo de um animal do grupo 4C. Esta imagem foi escolhida para ilustrar o aspecto histológico do reparo uma vez que, pode-se observar toda a extensão da lesão em corte transversal. Vêem-se as três regiões características do processo de reparo muscular: zona central (ZC); zona de regeneração (ZR), onde se notam as porções terminais das células musculares em regeneração que se apresentam sob a forma de estruturas celulares alongadas (seta) dispostas em direção ao centro da lesão. Na região mais periférica, podem ser observadas as células musculares preservadas, caracterizando a zona preservada (ZP).

Figura 17– Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido de músculo de um animal do grupo 4US. Reparar no intenso processo inflamatório que domina inicialmente a lesão. O asterisco indica restos de fragmentos de células musculares em degeneração. A seta amarela aponta para um neutrófilo (no rato, estas células apresentam o núcleo com forma anelada), enquanto que a seta vermelha mostra um macrófago. É possível observar a presença de mioblastos, que se mostram como células alongadas com um único núcleo e citoplasma basófilo (setas pretas). Em V: vaso sanguíneo; em M: célula muscular preservada.

Figura 18 – Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido de músculo de rato do grupo 4C. Nesta imagem pode-se observar melhor a zona de regeneração (ZR), com numerosas células musculares em desenvolvimento (setas pretas), denominadas miotubos: são células multinucleadas, longas e de pequeno diâmetro, quando comparadas com a célula muscular madura (apontada na micrografia com um asterisco). Esta fase do processo de reparo se caracteriza pela presença de grande infiltrado inflamatório e numerosos vasos (setas verdes), típicos do tecido de granulação. Estes aspectos foram observados tanto nos animais controles como naqueles tratados com ultra-som. ZC: zona central



Figura 19 - Fotomicrografia de um corte histológico corado com Picrossírius-hematoxilina e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 4C. Esta imagem de pequeno aumento mostra um corte coronal à lesão. Pode se observar a região central (ZC), ainda rica em tecido inflamatório, e as bordas da lesão, constituídas pela zona regenerativa (ZR). Fibras constituídas por colágeno coradas em vermelho intenso aparecem na região preservada e se acumulam na interface entre a zona regenerativa e a zona preservada (ZP).

Figura 20 – Fotomicrografia do mesmo histológico mostrado na Figura 19, corado com Picrossíriushematoxilina e observado sob luz polarizada . Nestas condições as fibras que contém colágeno mostraram-se birrefringentes, brilhando contra o fundo escuro. É possível identificar os perfis das estruturas teciduais ao fundo: a zona central da lesão (ZC), a zona regenerativa (ZR) e a zona preservada (ZP). Notar que as células musculares (cm) apresentam-se também ligeiramente birrefringentes, devido à organização paracristalina de suas miofibrilas. Observar as grossas fibras colagênicas fortemente birrefringentes brilhando contra o fundo escuro (setas verdes). Estas fibras apresentam-se alinhadas às células preservadas e mostram-se orientadas em direção à lesão.

Figura 21- Fotomicrografia de um corte histológico corado com Picrossírius-hematoxilina e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 4US. Nos animais tratados com ultrassom também apareceu de forma exuberante o acúmulo de colágeno a interface entre a ZP e a ZR. Notar que as fibras colágenas grossas correspondem ao perimísio do tecido muscular.

Figura 22 – Fotomicrografia de mesmo corte histológico mostrado na Figura 21, corado com Picrossírius-hematoxilina e observado sob luz polarizada. Notar que as fibras que contém colágeno presentes tanto na zona regenerativa (ZR) como na região preservada a adjacente a esta (ZP) se apresentam espessas e com uma birrefringência intensa. As setas verdes apontam para estas fibras grossas no perimísio. É interessante notar que as fibras colagênicas do endomísio mostram-se finas e delicadas, acompanhando cada célula muscular (setas amarelas).

b) Avaliação histopatológica aos 7 dias

Aos 7 dias de reparo, a lesão mostrou-se reduzida em todos os animais; em algumas lesões tratadas com ultrassom, a zona de regeneração ocupava praticamente toda a extensão da lesão (**Figuras 23 e 24**).

Tanto nas lesões tratadas como nas controles, a zona de regeneração apresentou um aspecto histológico diferente daquele observado aos 4 dias, com uma grande concentração celular adjacente à zona central. Nesta localização, foram identificados numerosos mioblastos e miotubos, constituindo um tecido conjuntivo muito celularizado. A zona central mostrou-se muito reduzida nos músculos tratados com ultrassom, sendo que em muitos casos o tecido de regeneração já ocupava completamente o espaço da lesão (**Figura 24**).

Em relação à distribuição das fibras colagênicas, a análise das lâminas coradas com Picrossírius-hematoxilina mostrou que: 1) nas lesões controles as fibras colágenas mais grossas continuavam concentradas na interface entre a zona de regeneração e a zona preservada, respeitando a zona central (**Figuras 25 e 26**); 2) em contraste, em muitos casos de lesões tratadas com ultrassom, devido ao maior desenvolvimento da zona de regeneração, as fibras colagênicas delgadas apresentavam-se direcionadas centralmente de modo a unir as bordas da lesão (**Figuras 27 e 28**).

Embora, a grande quantidade de vasos sanguíneos tenha sido notada desde os 4 dias de reparo tanto nas lesões controles como nas tratados com ultrassom, a vascularização foi mais facilmente discriminada aos 7 dias de reparo devido à melhor organização tecidual quando comparada ao 4º dia (**Figura 29**).



Figura 23 – Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido de músculo de um animal do grupo 7C. Notar a grande concentração celular na interface entre a zona regenerativa (ZR) e a zona central (ZC), característica dos tecidos neoformados. A barra marca a extesão da zona central.

Figura 24 – Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido de músculo de um animal do grupo 7US. Notar que a zona central (ZC) apresenta-se diminuída (barra) e a zona de regeneração (ZR) ocupa a maior parte do perfil da lesão.





Figura 25 – Fotomicrografia de um corte histológico corado com Picrossírius-hematoxilina e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 7C. Notar a existência de uma zona central (ZC) ainda bastante proeminente.

Figura 26 – Fotomicrografia do mesmo corte histológico mostrado na Figura 25, corado com Picrossírius-hematoxilina e observado sob luz polarizada, obtido de um animal do grupo 7C. O colágeno aparece representado em toda a zona regenerativa (ZR) sob a forma de uma trama delicada formada por fibras finas pouco birrefringentes entremeada às células em processo de regeneração, enquanto que na zona preservada vizinha à zona de regeneração se observa o espessamento do colágeno (setas verdes) do perimísio (já descrito para os animais aos 4 dias póslesão); ZC: zona central.

Figura 27– Fotomicrografia de um corte histológico corado com Picrossírius-hematoxilina e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 7US.

Figura 28-- Fotomicrografia do mesmo corte histológico corado com Picrossírius-hematoxilina e observado sob luz polarizada, obtido de um animal do grupo 7US. Pode-se observar a grande concentração de colágeno na zona regenerativa, sob a forma de fibras relativamente finas, dispostas de forma organizada, formando feixes paralelos aos miotubos em regeneração. Notar que a maior concentração do colágeno (setas verdes) ocorre na vizinha da zona muscular preservada, enquanto que em direção à zona central, as fibras colagênicas apresentam-se mais finas e menos birrefringentes.

Figura 29 - Fotomicrografia de um corte histológico obtido de um animal do grupo 7US ilustrando a grande quantidade de vasos sanguíneos (seta) observadas na zona regenerativa (ZR).

c) Avaliação histopatológica aos 14 dias

Nesta fase observou-se uma diminuição ainda maior da área de lesão, com aproximação das bordas de regeneração. Embora todos os animais tenham alcançado o fechamento total ou quase total da lesão em termos macroscópicos, a análise histológica mostrou que o processo de formação de miotubos estava ainda em atividade (**Figura 30**).

Aos 14 dias após a lesão a zona central estava bastante reduzida em todas as lesões estudadas. No entanto, as lesões que receberam tratamento com ultrassom mostraram padrões de organização espacial do tecido neoformado mais semelhantes ao tecido muscular original. As **Figuras 30 e 32** ilustram estes aspectos.

Com relação às fibras colagênicas, os padrões de distribuição foram diferentes entre os grupos principalmente no que diz respeito à zona mais central da área de reparo. Tanto nas lesões tratadas com ultrassom como nas lesões controles foram observadas fibras de colágeno mais grossas na região periférica à lesão, porém nas lesões tratadas, as fibras colagênicas localizadas mais centralmente tinham um aspecto mais delgado, formando um delicado arcabouço de sustentação (**Figuras 31 e 33**).



Figura 30 – Fotomicrografia de um corte histológico corado com Picrossírius-hematoxilina e observado sob luz convencional, obtido de um animal do grupo 14C. As fibras de colágeno aparecem coradas de vermelho intenso, enquanto que as células musculares apresentam citoplasma claro. É possível notar que na zona central (ZC) ainda persiste no tecido e a ZR apresenta-se bastante desorganizada espacialmente. A zona de regeneração apresenta elementos cicatriciais, como os miotubos (seta preta), associados a quantidades crescentes de colágeno.

Figura 31- Quando o mesmo corte da Figura 30 é observado sob luz polarizada, nota-se que as fibras de colágeno grossas do perimísio (setas pretas) se continuam com fibras espessas de colágeno (seta brancas) que passam a ocupar também a zona de regeneração.

Figura 32 – A Fotomicrografia corresponde a um corte histológico corado com Picrossíriushematoxilina e observado com luz convencional, obtido de um animal do grupo 14US. Nesta imagem observa-se que, embora a quantidade de fibras colagênicas seja grande, o tecido da zona de regeneração (ZR) mostra-se mais organizado que aquela da figura anterior. As setas mostram que o epimísio já está praticamente cobrindo a lesão.

Figura 33 - Quando o mesmo corte histológico da Figura 32 é analisado com luz polarizada, nota-se que, apesar da presença de fibras de colágeno grossas, o tecido mostra maior organização estrutural, de modo geral. Observar que na região neoformada, as fibras colagênicas se apresentam mais finas e menos birrefringentes (setas brancas), acompanhando o maior eixo das células em regeneração. Notar o espessamento do perimísio (setas pretas) e a intensa birrefringência do epimísio recobrindo a lesão.

d) Avaliação histopatológica aos 24 dias

Nesta fase do processo cicatricial, a lesão apresentava as bordas totalmente aproximadas e, nos animais tratados com ultrassom, toda a área da lesão estava já ocupada por células musculares novas, preferencialmente arranjadas paralelamente entre si. Nas lesões controles, as fibras musculares apresentavam-se dispostas de modo mais desorganizado espacialmente, ainda que cobrissem praticamente toda a lesão (**Figuras 34 e 36**).

A análise pelo método da Picrossírius-polarização permitiu observar que as lesões controles mostravam acúmulos de fibras colágenas grossas na interface da zona preservada e da zona cicatricial; além disso, fibras grossas se imiscuíam por entre as fibras musculares novas, formando uma trama relativamente desorganizada em várias direções. Já nas lesões tratadas com ultrassom, as fibras de colágeno eram mais delgadas e acompanhavam o maior eixo das fibras musculares, conferindo um caráter mais organizado ao tecido como um todo (**Figura 35 e 37**).



Figura 34 - A Fotomicrografia corresponde a um corte histológico corado com Picrossíriushematoxilina e observado com luz convencional, obtido de um animal do grupo 24C. A imagem mostra o tecido cicatricial bem desenvolvido no local da lesão. No centro da cicatriz pode-se observar ainda a atividade de mioregeneração (ZC). A seta aponta para o epimíso recobrindo o local da lesão.

Figura 35 – Fotomicrografia do mesmo campo da imagem anterior, observado sob luz polarizada. Notar que o epimísio (seta amarela) está constituído por grande quantidade de fibras colágenas fortemente birrefringentes densamente agregadas. Este mesmo tipo de organização do colágeno pode ser visto no interior da cicatriz (setas brancas) substituindo a rede delicada de fibras colagênicas finas que caracteriza o endomísio normal, o qual pode ser apreciado na Zona Preservada (ZP).

Figura 36 - A Fotomicrografia corresponde a um corte histológico corado com Picrossíriushematoxilina e observado com luz convencional, obtido de um animal do grupo 24US. É possível observar que, embora haja uma maior densidade de fibras colágenas (coradas em vermelho) na zona de regeneração (ZR), quando se compara com a zona preservada (ZP), a organização tecidual é mas alinhada, levando a um tecido de reparo que se assemelha mais ao tecido normal que nas lesões não tratadas com USp (comparar com a Figura 34).

Figura 37 – Fotomicrografia do mesmo campo da imagem anterior, observado sob luz polarizada. Notar que existem apenas alguns grumos de fibras colágenas grossas, fortemente birrefringentes (seta amarela) e que a maioria das fibras colagênicas aparece como fibras finas, fracamente birrefringentes que se dispõem de maneira organizada ao longo das fibras musculares (setas brancas). O tecido cicatricial das lesões do grupo 24 US se assemelha mais à zona preservada do que aquele das lesões que não foram tratadas com o USp (comparar com a figura 35).

4.3 Análise estereológica

Fragmentos de tecido muscular em regeneração nos dias 4, 7, 14 e 24 pós-lesão dos grupos controle e tratados com o USp foram estudados estereologicamente para a estimativa do volume da lesão, volume das zonas central e de regeneração, volume e área de superfície dos vasos sanguíneos, e volume das fibras colagênicas.

4.3.1 Volume da lesão

Uma vez terminada a tomada de dados quantitativos, através da contagem dos pontos do retículo que incidiram sobre a lesão (segundo Cavalieri) foram aplicadas ferramentas estatísticas para avaliação comparativa dos dados obtidos.

O teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar as lesões tratadas com ultrassom ao longo dos diferentes tempos pós-lesão; para as lesões controles não se observou homogeneidade de variância pelo teste de Levene e, assim sendo, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as lesões controle entre si ao longo do tempo. O teste t-Student independente foi usado para comparar lesões controles X lesões tratadas com ultrassom em cada tempo estudado. A análise dos dados mostra que, tanto nas lesões controles como naquelas tratadas com ultrassom, a lesão diminuiu significativamente ao longo do tempo. Porém, o volume da lesão tratada com ultrassom é sempre significativamente menor quando comparado com as lesões controles em cada tempo experimental (**Gráfico 2**).

Gráfico 2 – Volumes absolutos das lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm³).



 $\diamond = p < 0.03$ comparado a 4 Ctrl; # = p < 0.02 comparado a 7 Ctrl; § = p < 0.02 comparado a 14 Ctrl; ¥ = p < 0.05 comparado a 24 Ctrl; *p < 0.05 entre os grupos conectados.

4.3.2 Fração de Volume da Zona Central e da Zona de Regeneração

A fração de volume das zonas central e de regeneração corresponde à

porcentagem de volume que cada uma das zonas ocupa na lesão total e foi obtida
por contagem de pontos incidentes sobre as duas zonas separadamente, nos cortes histológicos. Os resultados para a fração de volume da Zona de Regeneração são complementares aos valores da Zona Central (% ZR + % ZC = 100). O teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento (controle ou US); o teste t-Student independente foi usado para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado.

A análise estatística mostrou que a redução da fração de volume da zona central é significativa quando se compara o 4º dia pós-operatório com os demais tempos experimentais, tanto para os animais tratados com ultrassom como para os controles. Não houve diferenças significativas entre os grupos controles e os grupos tratados com ultrassom (**Gráfico 3**).

Gráfico 3 – Fração de Volume correspondente à Zona Central e à Zona de Regeneração nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em %). Cores claras correspondem à Zona Central e cores escuras à Zona de Regeneração para cada tempo experimental.



*p < 0,05 entre os grupos conectados.

4.3.3 Volumes Absolutos da Zona Central e da Zona de Regeneração

Os volumes absolutos de cada zona foram obtidos por Cavalieri.

a) Volume da Zona Central

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os volumes da Zona Central entre os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento, uma vez que o teste de Levene não demonstrou homogeneidade de variância. O teste t-Student independente foi usado para comparar os grupos controles x USp em cada tempo.

Os valores encontrados e o resultado da análise estatística para o volume absoluto da Zona Central nas lesões controles e nas tratadas com ultrassom estão mostrados no **Gráfico 4**.

A análise estatística mostrou que o volume da zona central reduziu-se significativamente mais nos grupos 4US e 7US em relação aos grupos 4C e 7C. Além disso, a diminuição do volume da zona central é significativa quando se comparam as lesões aos 7, 14 e 24 dias com aquelas aos 4 dias de pós-operatório, tanto para lesões controles como tratadas com ultrassom. O volume da zona central reduziu-se também significativamente entre os 7 e 14 dias de pós-operatório nas lesões tratadas com ultrassom.

Gráfico 4 – Volumes absolutos da Zona Central nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm³).



 \diamond = p < 0,005 comparado a 4 Ctrl; # = p < 0,02 comparado a 7 Ctrl; *p < 0,05 entre os grupos conectados.

a) Volume da Zona de Regeneração

Para o tratamento de dados originários da morfometria da zona de regeneração, o teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar os grupos US, ao longo dos diferentes tempos entre si e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os grupos controles entre si, uma vez que o teste de Levene não demonstrou homogeneidade de variância. O teste t-Student independente foi usado para comparar os controles x US em cada tempo estudado (**Gráfico 5**).

Comparando-se os grupos controles e US a análise dos dados demonstrou-se que o volume da Zona de Regeneração já é menor no grupo 14US

quando comparado com 14C. A análise mostra que nos grupos controles houve uma redução significante quando se compara o grupo 4C com os outros três tempos estudados, enquanto que para os grupos tratados com US, a redução é significativa entre o grupo 4US e os grupos 14US e 24US.

Gráfico 5 – Volumes absolutos da Zona de Regeneração em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm³).



g = p < 0.02 comparado a 14 Ctrl; *p < 0.05 entre os grupos conectados.

4.3.4 Fração de volume de vasos sanguíneos na lesão

Foram analisados, por contagem de pontos, os preparados histológicos corados com HE correspondentes à resposta tecidual nos quatro tempos estudados após a lesão para se estimar a fração de volume de vasos sanguíneos na lesão total.

O teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento, tanto para os controles como para os tratados com US. O teste t-Student independente para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado (**Gráfico 6**).

Gráfico 6 – Fração de Volume de vasos sanguíneos nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em %).



◊ = p < 0,05 comparado a 4 Ctrl; # = p < 0,05 comparado a 7 Ctrl; *p < 0,05 entre os grupos conectados.

A análise estatística mostrou que a fração de volume de vasos sanguíneos na área da lesão é significativamente maior nos grupos tratados com US em relação aos grupos controle aos 4 e 7 dias após a lesão. Comparando-se entre si os diferentes tempos controles não foi possível encontrar diferenças significativas; já a comparação dos grupos tratados com US mostra diferenças estatisticamente significativas entre grupo 4US e os outros três tempos estudados. 4.3.5 Volume absoluto de vasos sanguíneos na lesão

O volume absoluto de vasos sanguíneos na lesão em cada tempo de cada tratamento foi obtido pela multiplicação das frações de volume pelo volume da lesão, já determinado por Cavalieri. O teste de ANOVA foi usado para comparar os grupos controles entre si e, para a comparação entre os grupos tratados com US entre si foi feito o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que o teste de Levene não indicou homogeneidade de variância. O teste t-Student independente comparou os grupos controle x US em cada tempo, com exceção aos 14 dias; para esse tempo foi usado o teste de Mann-Whitney, uma vez o grupo 14US não demonstrou normalidade de distribuição de dados pelo teste de Shapiro-Wilk (**Gráfico 7**).

Gráfico 7 – Volume absoluto de vasos sanguíneos em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm³).



 \Diamond = p < 0,05 comparado a 4 Ctrl; *p < 0,05 entre os grupos conectados.

Conforme o **Gráfico 7**, a análise dos dados mostra que o grupo 4US possui um volume absoluto de vasos maior quando se compara com o grupo 4C; a comparação dos grupos controles entre si dos tratados com ultrassom entre si mostra diferenças estatisticamente significativas entre o 4º dia e os outros três tempos estudados. Também há diferença significativa entre os grupos 7US e 24US.

4.3.6 Fração de superfície de vasos sanguíneos na lesão

Foram analisados os preparados histológicos corados com HE nos quatro tempos estudados após a lesão para se estimar a fração de superfície de vasos sanguíneos na lesão, contando-se as intersecções das paredes vasculares com as ciclóides de um retículo sobreposto à imagem microscópica.

O teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar os grupos controles entre si e os tratados com US entre si ao longo do tempo. O teste t-Student independente comparou os grupos controle x US em cada tempo estudado.

A análise estatística mostrou que a fração de superfície de vasos sanguíneos na área da lesão é significativamente maior nos grupos tratados com US em relação aos grupos controle aos 4 e 7 dias após a lesão. Os diferentes tempos controles não mostraram diferenças entre si, enquanto que a comparação ao longo dos tempos entre os grupos tratados com US mostrou que o grupo 4C possuía fração de área de superfície de vasos maior que no grupo 24US (**Gráfico 8**).

Gráfico 8 – Fração de Área de Superfície de vasos sanguíneos nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pósoperatório (média, em %).



 \diamond = p < 0,05 comparado a 4 Ctrl; # = p < 0,05 comparado a 7 Ctrl; *p < 0,05 entre os grupos conectados.

4.3.7 Superfície Total de vasos sanguíneos na lesão

A área total da superfície de vasos sanguíneos na lesão em cada tempo pós-operatório para cada tratamento foi obtida pela multiplicação das frações de área da superfície dos vasos pelo volume absoluto da lesão, já determinado por Cavalieri.

O teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar os grupos controles entre si, ao longo dos diferentes tempos e para a comparação entre os grupos tratados com US, foi feito o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que o teste de Levene não indicou homogeneidade de variância. O teste t-Student independente comparou os grupos controles x US em cada tempo estudado.

A análise dos dados não mostrou diferenças significativas na área de superfície total de vasos sanguíneos na lesão entre os grupos controle e US em todos os tempos estudados. Quando se compara os diferentes tempos entre si dentro de um mesmo tratamento, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos 4C e os outros grupos controles e entre 4US e os outros grupos tratados com US. Os dados encontrados e o resultado da análise estatística, tanto nos animais do grupo controle bem como do grupo tratado com ultrassom, estão dispostos no **Gráfico 9**.

Gráfico 9 – Área Superfície total de vasos sanguíneos em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm²).



*p < 0,05 entre os grupos conectados.

4.3.8 Fração de volume de fibras colagênicas na lesão

Foram analisados os preparados histológicos corados com PSH nos quais o colágeno corado em vermelho foi selecionado digitalmente; a área ocupada pelo colágeno foi medida e dividida pela área da lesão.

O teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento, tanto para os controles como para os tratados com US. O teste t-Student independente para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado.

Gráfico 10 – Fração de Volume de fibras colagênicas nas lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em %).



 \diamond = p < 0,03 comparado a 4 Ctrl; # = p < 0,02 comparado a 7 Ctrl; *p < 0,05 entre os grupos conectados.

Foi encontrado um aumento estatisticamente significativo na fração de volume ocupada pelas fibras colagênicas nos grupos tratados com ultrassom aos 4 e 7 dias após a lesão quando comparado aos respectivos controles (**Gráfico 10**).

Além disso, quando se comparam os diferentes tempos do mesmo protocolo, no grupo tratado com US observa-se um aumento significativo da fração de volume de fibras colagênicas nos grupos 7US e em relação ao grupo 4US. Aos 24 dias há uma diminuição da fração de volume de fibras colagênicas quando se compara com o valor encontrado no grupo 7US. Ao se comparar os diferentes tempos no grupo controle observa-se um aumento significativo da fração de volume correspondente às fibras colagênicas nos grupos 7C, 14C e 24C em relação ao grupo 4C (**Gráfico 10**).

4.3.9 Volume total de fibras colagênicas na lesão

O volume total de fibras de colágeno foi obtido pela multiplicação das frações de volume de colágeno pelo volume total da lesão, calculado por Cavalieri. O teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento. O teste t-Student independente para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado.

Foi encontrado um aumento estatisticamente significativo no volume total de fibras colagênicas na lesão nos grupos tratados com ultrassom aos 4 e 7 dias quando comparados aos controles (**Gráfico 11**).

Gráfico 11 – Volume total de fibras colagênicas em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em mm³).



 \Diamond = p < 0,05 comparado a 4 Ctrl; # = p < 0,05 comparado a 7 Ctrl; *p < 0,05 entre os grupos conectados.

Ainda no **Gráfico 11**, se observa que o volume total de fibras colagênicas não variou ao longo do tempo nos grupos controles. Já nos grupos tratados com ultrassom o volume de colágeno é maior aos 4 dias quando comparado com os 14 e 24 dias, assim como o volume de colágeno aos 7 dias é maior que aos 14 e 24 dias.

4.4 Estudo biomecânico

Cinco animais de cada grupo foram testados, totalizando 40 músculos submetidos ao teste de tração. O comprimento de cada pata a ser submetida ao teste de tração foi medido após a dissecação. Para cada teste foi gerado um diagrama força x deslocamento, como o pertencente a um animal do grupo 4US, exemplificado na Figura 38.



Figura 38 - Diagrama força X deslocamento gerado durante o ensaio de tração, realizado em um músculo 4USp. A Força está no eixo da ordenada e o deslocamento está na abscissa. A Força Máxima corresponde ao pico da curva, a partir do qual o músculo não oferece mais resistência à tração.

Para os músculos lesados a separação entre as extremidades distendidas, durante o teste de tração, iniciou-se sempre na região que continha o foco da lesão, muitas vezes no interior da própria lesão. Já nos músculos íntegros a separação iniciou-se sempre no terço médio do ventre muscular.

4.4.1.Tensão máxima

Os resultados obtidos para os valores de Tensão máxima para o músculo íntegro e para os grupos controles e tratados com ultrassom estão resumidos na Tabela 3 e no Gráfico 12.

Tabela 3 – Média e desvio padrão da Tensão Máxima e resultados da análise estatística para comparação de lesões nos músculos controles (C) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório. O valor de p encontrase na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05 (média em kPa).

	Íntegro 690,60 ± 68,4	48						
4C 287,90 ± 71,66	(< 0,001)	4C 287,90 ± 71,6	66					
7C 405,38 ± 60,50	(< 0,001)	ns	7C 405,38 ± 60,5	50				
14C 480,19 ± 77,48	(< 0,001)	(0,005)	ns	14C 480,19 ± 77,4	48			
24C 597,08 ± 29,72	(< 0,001)	(< 0,001)	(0,001)	ns	24C 597,08 ± 29,7	2		
4US 442,71 ± 05,17	(< 0,001)	(0,049)				4US 442,71 ± 105,	17	
7US 461,89 ± 65,54	(< 0,001)		ns			ns	7US 461,89 ± 65,5	54
14US 484,77 ± 16,74	(< 0,001)			ns		ns	Ns	14US 484,77 ± 16,74
24US 701,40 ± 83,96	(< 0,001)				(0,039)	(0,005)	(0,006)	(0,011)

O teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar os grupos de cada tratamento entre si (controle ou US) ao longo do tempo. Os grupos 4C e 14 US não apresentaram normalidade. Assim sendo, o teste t-Student pareado foi usado para comparar os grupos controle ou US em cada tempo estudado com o músculo esquerdo íntegro, exceto para os grupos 4C e 14 US, para os quais foi utilizado o teste Wilcoxon. O teste t-Student independente serviu para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado, exceto para os grupos 4C e 14US que foram analisados pelo teste Mann-Whitney.

Da análise dos dados pode-se observar que a tensão foi sendo maior à medida que o processo cicatricial progrediu no tempo, tanto para os controles como para os tratados. O tratamento pelo ultrassom melhorou o desempenho já aos 4 dias quando o músculo tratado atingiu um grau de resistência à tração que seria atingido pelo controle somente a partir do 7º. dia. Aos 24 dias pós-lesão, o músculo tratado com ultrassom mostrou um desempenho significativamente maior. Ao compararmos a Tensão Máxima dos grupos controle e ultrassom com os valores do músculo contralateral íntegro, que a Tensão Máxima é significativamente maior no músculo íntegro em todos os tempos analisados, porém no músculo tratado com US, aos 24 dias tende a se aproximar mais do valor encontrado no músculo íntegro.

Gráfico 12 - Variação da Tensão Máxima em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em kPa).



p < 0,05 comparado a todos os grupos controles e tratados com US; \Diamond = p < 0,05 comparado a 4 Ctrl; ¥ = p < 0,05 comparado a 24 Ctrl; *p < 0,05 entre os grupos assinalados.

Os resultados obtidos para os valores de Rigidez estão resumidos na

Tabela 4.

Tabela 4 – Média e desvio padrão da Rigidez e resultados da análise estatística de lesões nos músculos controles (C) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05 (média em N/mm).

	Íntegro							
4C 1,46 ± 0,41	(< 0,001)	4C 1,46 ± 0,41						
7C 2,37 ± 0,90	(< 0,001)	ns	7C 2,37 ± 0,90					
14C 2,53 ± 0,61	(< 0,001)	ns	ns	14C 2,53 ± 0,61				
24C 3,38 ± 0,30	(< 0,001)	(0,008)	ns	ns	24C 3,28 ± 0,30			
4US 2,47 ± 0,37	(< 0,001)	(0,036)				4US 2,47 ± 0,37		
7US 2,78 ± 0,37	(< 0,001)		ns			ns	7US 2,78 ± 0,37	
14US 2,71 ± 0,35	(< 0,001)			ns		ns	ns	14US 2,71 ± 0,35
24US 3,99 ± 0,38	(< 0,001)				(0,027)	(0,002)	(0,007)	(0,005)

O teste de ANOVA *one factor* foi usado para comparar os grupos de cada tratamento (controle ou ultrassom) entre si ao longo dos diferentes tempos póslesão. O teste t-Student pareado foi usado para comparar os grupos controle e US em cada tempo estudado com o músculo esquerdo íntegro. O teste t-Student independente para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado. O **Gráfico 13** apresenta os resultados obtidos no teste biomecânico para rigidez e a análise estatística.

Da análise dos dados pode-se observar que a rigidez cresceu ao longo do processo de reparo muscular, tanto para os controles como para os tratados, sendo que a rigidez dos músculos tratados com ultrassom foi significativamente maior no 4º e no 24º dias pós-lesão quando comparado aos respectivos controles.

A Rigidez do músculo contralateral íntegro mostrou-se significativamente maior quando comparada aos grupos controle e ultrassom, em todos os tempos analisados.

Gráfico 13 - Variação da Rigidez em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em N/mm).



p < 0,05 comparado a todos os grupos controles e tratados com US; $\diamond = p < 0,05$ comparado a 4 Ctrl; $\neq = p < 0,05$ comparado a 24 Ctrl; p < 0,05 entre os grupos assinalados.

4.4.3 Deformação relativa percentual

Os resultados obtidos para os valores de Deformação relativa percentual estão resumido na **Tabela 5.**

Tabela 5 – Média e desvio padrão de Deformação Relativa e resultados da análise estatística de lesões nos músculos controles (C) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05 (média, em %).

	Íntegro							
	22,84 ± 3,54							
4C	(~ 0.001)	4C						
15,07 ± 3,30	(< 0,001)	15,07 ± 3,30						
7C	(< 0,001)	ns	7C					
17,34 ± 4,82			17,34 ± 4,82					
14C	(< 0,001)	ns	ns	14C				
18,00 ± 2,31				18,00 ± 2,31				
24C	(< 0.001)	ns	ns	ns	24C			
16,18 ± 3,44	(< 0,001)	115	115	110	16,18 ± 3,44			
4US	(< 0,001)	ns				4US		
17,12 ± 1,68						17,12 ± 1,68		
7US	(< 0,001)		ns			ns	7US	
12,81 ± 2,12							12,81 ± 2,12	
14US	(< 0,001)			ns		ns	ns	14US
14,51 ± 2,01								14,51 ± 2,01
24US	(< 0.001)				ns	ns	ns	ns
15,88 ± 3,18	(10,001)							

O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os grupos, controle e US, ao longo dos diferentes tempos pós-lesão. O teste t-Student pareado foi usado para comparar os grupos controle e US em cada tempo estudado com o músculo esquerdo íntegro. O teste t-Student independente para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado.

Os resultados estão ilustrados no Gráfico 14.

Gráfico 14 - Variação da Deformação Relativa em lesões nos músculos controles (Ctrl) e tratados com ultrassom (US) aos 4, 7, 14 e 24 dias de pós-operatório (média, em %).



p < 0,05 comparado a todos os grupos controles e tratados com US.

Ao compararmos a Deformação relativa porcentual dos grupos controle e ultrassom com os valores do músculo contralateral íntegro, pode-se observar na que a Deformação relativa porcentual é significativamente maior no músculo íntegro em todos os tempos analisados. Além disso, não houve diferenças significativas entre os valores de deformação relativa percentual em nenhum dos tempos estudados, tanto nos grupos controles como nos tratados com ultrassom.

5. DISCUSSÃO

A proposta do presente estudo é corolário da recente necessidade de se utilizar modalidades terapêuticas aplicadas à lesão muscular que possam ao mesmo tempo estimular a regeneração muscular e proporcionar a adequada resistência à tensão por modulação do colágeno fibrilar. Para a interpretação dos resultados foram realizados testes biomecânicos que possibilitam analisar toda a unidade músculo-tendínea, e avaliações histológicas qualitativas e quantitativas do tecido muscular lacerado, sendo possível fazer uma correlação entre as alterações biomecânicas e as alterações biológicas durante o processo de reparo.

Os trabalhos experimentais com utilização de US são de extremo interesse para profissionais de reabilitação, uma vez que seu uso é disseminado e, em muitos casos, faltam evidências científicas definitivas para seu uso clínico. Por exemplo, BAKER et al., 2001 revisaram as publicações sobre a efetividade do US terapêutico e concluíram que há pouca evidência de que o US é mais efetivo que o tratamento placebo para o controle da dor ou para promover a reparação do tecido mole.

Os resultados conflitantes podem estar relacionados com uma série de variáveis, tais como, problemas na calibração dos aparelhos, no desenho dos estudos clínicos, na negligência dos fatores causais das afecções estudadas, na complexidade das lesões do tecido mole e nos diferentes parâmetros de aplicação do US (SPEED, 2001).

A escolha por estudar especificamente a lesão por laceração e não por contusão ou exercício repetitivo deve-se ao fato de que estas lesões são muito importantes em membros superiores; apesar disso, a literatura é pobre em dados sobre a regeneração deste tipo de lesão, estando focada principalmente em reparo de lesões por contusão (CRISCO et al., 1994) ou estiramento muscular (GARRET, 1990) uma vez que predominam nos atletas. Além disso, a lesão por laceração implica em perda de continuidade da pele, o que se constitui em um fator complicante a mais para a aplicação do US.

Para realizar esta pesquisa foi escolhido o rato como animal de experimentação. Algumas características desse animal são vantajosas no âmbito experimental como a pronta, rápida e farta obtenção dos animais associada à facilidade de controle e manutenção em gaiolas, além da ótima aceitação de dieta e elevada resistência à infecção. Além disso, em virtude das similaridades anatômicas e biomecânicas entre o rato e os humanos, é provável que os resultados obtidos nos estudos experimentais de cicatrização, utilizando esse animal, possam ser extrapolados para o homem. Mais ainda, para que o tratamento clínico dos pacientes possa evoluir faz-se necessário associar os resultados obtidos com as avaliações clínicas, às alterações morfofisiológicas provocadas pelas diversas modalidades terapêuticas, informação essa que só é possível de se obter através de estudos experimentais com animais e *in vitro*. Vale ressaltar que ainda é pequeno, o conhecimento sobre os mecanismos de ação e os efeitos do ultrassom.

Durante a realização das lesões, não houve dificuldades em utilizar o equipamento. Foi possível observar macroscopicamente a semelhança entre as dimensões das lesões, e apesar do músculo ter uma consistência mais gelatinosa que rígida, pelo fato do corte ter sido feito com uma lâmina giratória nos dois sentidos, horário e anti-horário, foi possível realizar as lacerações de forma centralizada no ventre muscular. Além disso, pelo fato das lesões terem sido

realizadas por uma lâmina acionada eletricamente, sendo a profundidade controlada por um paquímetro digital foram eliminados problemas com a padronização em relação às lesões que são feitas manualmente, como aquelas de GARRET et al. (1984) e RANTANEN et al. (1995).

Outro ponto a ser destacado no presente estudo é a escolha de se realizar a lesão na cabeça medial do músculo gastrocnêmio. Apesar de ser um dos músculos mais utilizados nos estudos de lesão muscular (JARVINEN et al., 1976; MENETREY et al., 1999; FUKUSHIMA et al., 2001), a maioria dos autores não especifica a informação sobre em qual das cabeças desse músculo a lesão foi feita. A literatura deixa claro que, apesar das duas cabeças do músculo gastrocnêmio possuirem origem e inserção comuns, estas são inervadas por ramos motores separados originados do nervo tibial (HEBEL ET AL., 1986) e são consideradas músculos distintos, denominados músculo gastrocnêmio lateral -que tem três subdivisões- e músculo gastrocnêmio medial, formado por uma cabeça única (BENNETT et al., 1986; BENNETT et al., 1988).

A cabeça medial do gastrocnêmio foi considerada ideal para o presente modelo de lesão por que: a) cirurgicamente tem fácil acesso, b) a cabeça medial do músculo gastrocnêmio é bem inserida aos músculos adjacentes através de seu epimísio, o que previne uma retração muito grande da área lesada, c) é um músculo longitudinal unipenado, ou seja, suas fibras se estendem paralelamente de sua origem proximal até sua inserção distal, o que garante que o corte lacerativo irá cortar todas as miofibras uniformemente em um único local perpendicularmente.

Outro fator que contribuiu para a eficiência da aplicação do ultrassom e a ausência de complicações no pós-operatório foi o fato de ter sido utilizado o cabeçote em movimento, evitando a formação de ondas estacionárias no interior dos tecidos, que poderiam provocar maior lesão tecidual e inflamação, pela formação de radicais livres (DYSON, 1982; 1987).

A extrapolação direta para seres humanos dos resultados deste trabalho deve ser cautelosa, principalmente pelo fato de que a aplicação de ultrassom em feridas cirúrgicas recentes pode aumentar os riscos de infecções pelo uso do gel e manipulação. Existe a recomendação do uso de parafina estéril e outros protetores como possíveis meios de acoplamento que apresentariam menos riscos nas lesões precoces (DRASTICHOVÁ et al., 1973).

Também foi interessante confirmar que a freqüência de 1MHz, já usada com sucesso para reparo de tendões (NG et al., 2003) e para a prevenção de contraturas musculares após período de imobilização (OKITA et al., 2009) pode ser utilizada com eficiência para a regeneração muscular, como proposto por PIEDADE et al. em 2008. Relatos anteriores, que falharam em demonstrar qualquer efeito positivo da aplicação do US na regeneração muscular (WILKIN et al., 2004; MARKET et al., 2005), usaram freqüência de 3 ou 3,3 MHz.

Do mesmo modo, a escolha da intensidade de 0,57W/cm², para evitar o aquecimento da lesão e, ao mesmo tempo, reproduzir as condições propostas por DYSON et al. (1968) mostrou-se adequada e agrega mais um resultado positivo do uso do ultrassom a esta intensidade para regeneração de lesões musculares na literatura científica, o que parece extremamente desejável em um campo onde há tantas controvérsias. Intensidades inferiores a 0,5W/cm² parecem não ter a mesma eficácia na regeneração muscular em relação às intensidades iguais ou maiores a esse valor (MARKET et al., 2005; MCBRIER et al., 2007).

Reforçando de modo positivo a intensidade de US usada no presente trabalho está a evidência de que USp pode proteger o tecido muscular de lesões oxidativas usando-se intensidades de 0,5W/cm², pela diminuição das atividades da catalase e da superoxido dismutase, especialmente no primeiro dia após lesão lacerativa particularmente com as intensidades mais altas (FREITAS et al., 2007).

Neste modelo foi possível detectar com clareza o mesmo processo temporal e as mesmas etapas estabelecidas para a cicatrização de lesão muscular apontadas por JÄRVINEN et al. (2005). Além disso, o fato de ter sido realizada a análise qualitativa e quantitativa nos mesmos compartimentos teciduais bem estabelecidos por estes autores (zona central, de regeneração e preservada) faz com que os dados do presente estudo possam ser facilmente incorporados na literatura sobre este assunto.

Apesar do US eliciar efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos parece que o estímulo mecânico do US exerce efeitos terapêuticos sobre os biomarcadores da regeneração do músculo esquelético não havendo necessidade de aquecimento para que isso aconteça (SILVEIRA et al., 2010).

O papel dos mecanismos não térmicos do US na regeneração tecidual e no reparo de tecidos moles tem sido amplamente estabelecido. Enquanto muitas estruturas celulares são estacionárias, muitas estão flutuando livremente e podem ser levadas a se moverem ao redor de muitas estruturas estacionárias. Essa pressão mecânica aplicada pelas ondas produz um movimento unidirecional de fluidos ao redor das membranas celulares. O mecanismo através do qual o US auxilia o reparo tecidual está provavelmente relacionado ao seu efeito mecânico de cavitação sobre os tecidos, produzindo alterações na permeabilidade de membrana e estimulando o transporte de substâncias mensageiras secundárias, tais como o cálcio através da membrana celular. Esses mensageiros secundários provavelmente estimulam a proliferação de células miogênicas, e no caso do músculo esquelético, de células satélites (SILVEIRA et al. 2010).

Como pode ser observado, aos 4 dias pós-lesão, o músculo lesado (tanto no grupo 4C como no 4US) era mais pesado que no animal íntegro. Este achado está de acordo com os dados da literatura que relatam um maior peso do músculo no segundo dia pós-lesão quando comparado com dias mais tardios de pós-operatório (JARVINEN, 1976; KAARIAINEN et al., 1998). Esta diferença de peso pode ser atribuída ao edema inicial e hematoma que contribuiriam para o aumento de peso muscular no início do processo inflamatório.

A formação de edema é uma etapa importante e necessária para liberação e circulação local das citocinas. Sabe-se que o quadro clínico das lesões musculares depende tanto da severidade da lesão como da natureza do hematoma. Os vasos sanguíneos intramusculares são facilmente rompidos como resultado de um trauma, originando um hematoma intra- ou intermuscular. Quando o sangue extravasado fica dentro da fáscia intacta há um aumento da pressão intramuscular, que comprime os vasos sanguíneos rompidos, limitando o tamanho do hematoma. Por outro lado, se a fáscia também for rompida há a formação do hematoma intermuscular, no qual o sangue extravasado tem acesso livre no interstício e espaços interfasciais sem que haja um aumento significante da pressão dentro do músculo, logo a perda sanguíneo é geralmente maior (JÄRVINEN et al., 2007).

Após o aumento detectado no 4D pós-lesão, o peso absoluto dos músculos lesados se manteve menor do que no músculo íntegro ao longo dos dias de pós-operatório. Nem mesmo aos 24 dias, os músculos tratados e os controles atingiram o peso do músculo íntegro. A explicação para este fato pode ser a atrofia que acometeria os músculos lesados. Um mecanismo possível para explicar esta atrofia seja a inibição reflexa do motoneurônio alfa devido à dor. Outro estudo também relata a perda de peso muscular aos 14 dias após a lesão lacerativa e também aventa a hipótese da atrofia para explicar seus achados (KAARIAINEN et al., 1998). Talvez o restabelecimento completo do trofismo normal e, portanto, do peso muscular, pudesse ser alcançado em tempos maiores que os propostos neste estudo, uma vez que há uma tendência de aumento de peso muscular entre o 14º. e 24º dias. Na prática clínica observa-se que de fato a restauração do trofismo é mesmo um processo mais tardio que demanda cuidados específicos e que se estabelece após ser atingido o equilíbrio biomecânico do sistema músculoesquelético.

Observa-se que, embora não significativa, houve uma tendência constante do peso do músculo tratado com ultrassom ser menor que o músculo controle em cada tempo estudado (4, 7, 14 e 24 dias). Esta tendência pode estar relacionada ao fato da lesão ter se reduzido de forma mais eficiente, ocupando um volume menor nos animais tratados com ultrassom em todos os tempos experimentais, como foi demonstrado neste presente estudo. Nos animais controles, a atrofia muscular provavelmente também está presente (uma vez que houve uma tendência de menor peso ao longo do tempo neste grupo), porém causa menos impacto no peso, talvez pelo fato de que a presença do edema mais permanente e acentuado tenha um efeito compensatório para o peso.

As alterações histológicas durante o processo de reparo demonstraram uma capacidade de recuperação do músculo lacerado tanto no grupo tratado como no controle, da mesma forma que já foi demonstrado em contusões graves (HURME et al., 1991). De modo geral, as fibras musculares em regeneração foram capazes

de penetrar através do tecido cicatricial, restaurando a continuidade funcional do músculo através da zona central.

As lesões foram feitas seguindo um protocolo padronizado para todos os animais, de modo que a lesão no dia zero era idêntica para todos os animais. No entanto, aos 4 dias p.o. se observa uma diferença de menos da metade no volume da lesão nos animais tratados com US em relação ao controle (21,05 mm³ X 44,47 mm³). O fato de que esta diferença no volume da lesão tenha aparecido já no primeiro tempo do presente estudo (4 dias após a lesão) faz pensar que o efeito do ultrassom deu-se no período anterior aos 4 dias, ou seja, na fase aguda do processo inflamatório atuando na diminuição do edema inicial. Esta suposição encontra apoio na literatura no trabalho de STRATTON et al. (1984); GIOMBINI et al. (2001) que encontraram uma redução de hematoma e edema logo nos primeiros dias pós-lesão muscular com tratamento com ultrassom.

A fase inflamatória se caracteriza pela formação do coágulo sanguíneo e por uma vasodilatação local e extravasamento de fluido para o meio extracelular. Esses eventos produzem os sinais cardinais da inflamação que são o eritema, o calor, o edema e a dor e a atração de neutrófilos e monócitos para a área lesada. Essas células possuem um papel importante na fase inflamatória secretando citocinas e fatores de crescimento. Além disso, altas quantidades de espécies reativas de oxigênio são essas células, e sua produção excessiva pode danificar os lipídios de membrana (peroxidação lipídica) e causar necrose celular (ROSSI et al., 2008). FREITAS et al. (2010) preconiza que o uso do US diminui as lesões oxidativas aos lipídeos, sugerindo que esse recurso terapêutico pode acelerar a fase inflamatória. Assim sendo, a diminuição do estresse oxidativo promovida pelo o ultrassom, principalmente no primeiro dia pós-lesão, com conseqüente redução do edema e aceleração do processo cicatricial, foi proposto por FREITAS et al. (2007) como provável mecanismo de ação do ultrassom na aceleração da resolução do processo inflamatório.

Nos tempos seguintes, 7, 14 e 24 dias p.o. o volume da lesão também é significativamente menor nos animais tratados quando comparados com os respectivos controles, mostrando que a ação do ultrassom não se faz sentir apenas na redução do hematoma e edema iniciais, mas também nos processos de miorregeneração e remodelamento da matriz extracelular que caracterizam os tempos mais tardios do reparo. Assim sendo, esta associação de efeitos iniciais e tardios resulta em um processo de reparo mais rápido e eficaz. Estes mecanismos aqui propostos podem ser a base da recomendação para o início precoce da aplicação do ultrassom, conforme RANTANEN et al., 1999; KARNES, BURTON, 2002; FREITAS et al. 2007, OKITA et al., 2009.

Quando se analisa a contribuição de cada compartimento da lesão para a redução da ferida, através da análise da fração de volume ocupada pela zona central e pela zona de regeneração ao longo do tempo, observa-se que, apesar do volume da lesão ser menor nos grupos tratados pelo ultrassom, a proporção entre zona central e zona regenerativa não se altera quando se comparou os animais tratados com os controles, ou seja, o ultrassom promove a redução da lesão como um todo sem alterar a proporção das zonas que a constituem.

Desta forma, a simples avaliação das frações de volume das ZC e ZR poderia levar a uma falsa interpretação dos dados; por exemplo, a ZC do grupo 4C ocupa cerca de 30% da lesão e no grupo 4US ocupa cerca de 25% (diferença esta não significativa), levando a uma falsa impressão de que a ZC é semelhante nos dois grupos. No entanto, a avaliação dos volumes absolutos mostrou que o volume absoluto da ZC no grupo 4C é cerca de 13mm³ enquanto que do US é significativamente menor, 5mm³ (62% menor). Esta análise mostra a importância de se obter valores absolutos para a análise morfométrica de tecidos, especialmente aqueles que estão em processo de remodelamento, no qual as alterações dimensionais se dão tanto na estrutura analisada (no caso do exemplo, a zona central) como no compartimento tecidual que a contem (no caso, a lesão). Em resumo, em termos absolutos a ZC reduziu-se 62% em relação ao controle, porém a proporção da ZC na lesão não se alterou, pois a lesão também reduziu 52%.

A análise dos volumes absolutos da ZC e da ZR confirma a suposição de que o ultrassom age no controle do processo inflamatório, pois os resultados mostram o volume da ZC (que contem o hematoma, edema e infiltrado inflamatório) se reduz significativamente rapidamente com a aplicação do US enquanto que a ZR apresenta o mesmo volume nos controles e nos tratados com ultrassom nos primeiros dois tempos experimentais (4 e 7 dias de p.o.).

É interessante observar que as lesões não tratadas com US, apesar de apresentarem um volume de tecido inflamatório maior no inicio do reparo (quando comparada com as lesões tratadas), se resolvem do mesmo modo que as tratadas como se observou aos 24 dias de p.o.. Assim, pode-se supor que a ação do US não modifica essencialmente o curso do processo inflamatório, mas apenas o otimiza em tempos precoces após a lesão.

Sabe-se já que o US tem efeito estimulante sobre os mastócitos, plaquetas, células brancas com função fagocitária e macrófagos (NUSSBAUM 1997; TER HAAR 1999; FYFE, CAHAL 1982), que são as células efetoras do processo inflamatório. Aumentado a atividade dessas células a influência terapêutica do US é certamente pró-inflamatória e não anti-inflamatória. Estudos que tentaram demonstrar o efeito anti-inflamatório do US falharam (EL HAG et al., 1985; HASHISH 1986, 1988). O US parece ser efetivo em promover uma normalização dos eventos inflamatórios, tendo dessa forma um valor terapêutico na promoção geral do reparo tecidual (TER HAAR, 1999).

Dessa forma, o benefício do US parece não ser diminuir ou aumentar a inflamação, uma vez que esta é essencial para a efetividade final do reparo tecidual; os eventos mediados pelas substâncias inflamatórias estão associados com a estimulação da fase proliferativa, e dessa forma ao otimizar o processo inflamatório elas podem também promover a fase proliferativa; assim sendo, quanto mais eficientemente a fase de inflamação for resolvida, mais eficientemente o tecido pode progredir nas fases proliferativa e de remodelamento cicatricial.

Uma observação importante é que a aplicação do US promove a redução da ZC da lesão em termos volumétricos, porém aos 14 já não existe diferenças significativas neste parâmetro entre as lesões tratadas com ultrassom e as controles. Ainda que seja mera especulação, é interessante supor que os mecanismos reguladores da morfostase prevaleceriam neste tempo e as ondas ultrassônicas não teriam a capacidade de estimular indiscriminadamente a redução tecidual, além dos limites fisiológicos.

O presente trabalho fornece subsídios para se confirmar que a aplicação do US durante as fases inflamatória é benéfica não por promover mudanças na sequência normal dos eventos, mas pela sua capacidade de estimular ou melhorar os eventos normais e dessa forma aumentar a eficiência dessas fases (HAAR, 1999). Em termos de aplicação clínica, parece que se há algum comprometimento ou inibição no reparo tecidual, a aplicação do US terapêutico com os parâmetros apropriados irá melhorar esta atividade. Se o tecido está se

recuperando normalmente, a aplicação do US parece acelerar o processo e dessa forma capacitar o tecido a alcançar sua fase final mais rapidamente (WATSON, 2008).

Uma das observações mais interessantes do presente trabalho diz respeito à quantificação de vasos sanguíneos na lesão. Quando se analisou o volume total de vasos, notou-se que aos 4 dias p.o. a lesão tratada com ultrassom apresentava o dobro do volume de vasos quando comparado ao respectivo controle. Além disso, quando se levou em consideração que o volume absoluto da lesão reduziu-se pela metade em relação ao controle, concluiu-se que a densidade de vasos por volume de lesão foi muito maior no ultrassom que no controle (como pode ser visto analisando-se a fração de volume de vasos, que neste caso é 3 vezes maior nos animais tratados com ultrassom. Portanto, o controle e a aceleração da fase inflamatória do reparo conseguido pela aplicação do ultrassom se associa ao aumento da vascularização da lesão.

Anteriormente nesta Discussão ressaltou-se a importância da análise de valores absolutos na morfometria de tecidos. Neste momento, é necessário ressaltar a importância de se conhecer também as densidades em situações como o estudo da vascularização tecidual. Isto se deve ao fato de que os vasos tem um território limitado de ação dentro do tecido, de modo que importa muito saber a quantidade de vasos <u>por</u> unidade de volume tecidual. Neste caso, a análise da fração de volume complementa o dado do valor absoluto, colaborando na interpretação do fenômeno biológico, ao invés de constituir-se em uma armadilha, como aconteceu para a avaliação das Zonas Central e de Regeneração.

O sistema vascular promove a troca de nutrientes, oxigênio e produtos metabólicos em uma rica população tridimensional de células para a qual a simples

difusão entre essas células e o meio ambiente em que elas se encontram seria inadequada Uma neovascularização regular é necessária para o reparo tecidual sem comprometimento, devido ao aumento de volume tecidual na lesão e à necessidade de eficiência extrema nos processos de troca e alimentação do sistema em termos do afluxo de nutrientes e células. Os agentes capazes de induzir a angiogênese e ou a proliferação de células endoteliais são chamados de fatores angiogênicos (REHER et al., 1999).

Apesar de que não ter sido medida a densidade vascular e nem mesmo o volume vascular no músculo íntegro no presente trabalho, certamente no músculo lesionado controle, aos 4 dias p.o., houve um aumento destes valores, devido à proliferação vascular típica do processo inflamatório. No grupo tratado com ultrassom estes valores foram muito maiores ainda. Porém, o mais interessante aqui é entender o que aconteceu nos tempos experimentais seguintes com os volumes absolutos e as densidades dos vasos: tanto para os controles como para o ultrassom, o volume total de vasos (que era alto aos 4 dias) rapidamente decresceu ao longo do tempo com resultado normal do processo inflamatório; já quando se analisou a densidade (fração de volume de vasos) notou-se que, nos controles, a densidade vascular permaneceu igual em todos os tempos de p.o., o que indica que volume vascular absoluto maior aos 4 dias no controle era devido apenas a um maior volume de lesão neste tempo, ou seja, é um aumento proporcional às dimensões maiores do tecido; porém, a maior densidade vascular aos 4 dias nas lesões tratadas com US (3 vezes mais que o controle) não pode ser atribuída ao aumento do volume do tecido, uma vez que este era 2 vezes menor que o controle. A análise dos tempos subsequentes das lesões tratadas com US revela que este valor inicial desproporcionadamente alto da densidade vascular caiu ao longo do

tempo, de modo que aos 24 dias, a densidade vascular era igual em ambos os tratamentos. Pode-se concluir, portanto, que de fato, o ultrassom tem um papel de promover um aumento não somente no volume de vasos no tecido, mas também um aumento da vascularização por unidade de volume, o que certamente melhora a eficiência da fase inflamatória do reparo. Desta forma, é lícito supor que o aumento da vascularização promovido pelo ultrassom é um dos mecanismos que explica a maior eficiência do processo inflamatório nas lesões tratadas.

Os dados obtidos para a superfície de área são muito interessantes também e acompanham os resultados já discutidos para volume absoluto e fração de volume de vasos, ou seja, nos animais controles a fração de superfície foi constante ao longo do tempo, enquanto que nos tratados com ultrassom houve um imcremento significativo nesta variável no início do processo de reparo, resultando em ganho real de superfície endotelial por unidade de volume da lesão. Diferentemente do que foi encontrado para o volume absoluto vasos na lesão (que é significativamente maior na lesão tratada com o ultrassom), a área de superfície total de vasos é semelhante nas lesões controles e tratadas. Isto é uma aparente uma incongruência, pois parece lógico que um aumento significativo de volume acarrete necessariamente um aumento significativo de superfície. Porém, deve-se levar em conta que pequenos aumentos de superfície provocam aumentos não proporcionais de volume, uma vez que a área de superfície aumenta ao quadrado da dimensão linear, enquanto o volume aumenta ao cubo. Este princípio, conhecido como "Lei do Quadrado do CUBO" foi formulado no século XVI e explica que se dobra o tamanho linear de uma estrutura, iremos aumentar a área de sua superfície pelo quadrado de 2, ou seja, 4 vezes, e seu volume pelo cubo de 2, ou seja, 8 vezes. Aplicando-se este princípio aos dados do presente trabalho, é fácil entender que é possível que

tenha havido um aumento de superfície de vasos na lesão tratada com US que foi não significante quando comparado à lesão controle, mas que se refletiu em um aumento significante de volume vascular na lesão tratada com US.

A angiogênese é um fenômeno fisiológico de curta duração, que ocorre sob um controle restrito. Ela ocorre durante o desenvolvimento embrionário, durante a regeneração endometrial e durante o reparo tecidual. A neocapilarização envolve a ativação, a degradação da membrana basal, a migração e a proliferação de células endoteliais a partir de vênulas preexistentes, formação de tubos capilares e maturação de novos capilares.

O termo angiogênese terapêutica tem sido sugerido para descrever intervenções que induzam ou estimulem de forma controlada a neovascularização e a neocelularização para prevenir ou tratar os efeitos teciduais indesejáveis causados pela hipóxia local ou para melhorar o reparo tecidual em uma variedade de condições isquêmicas. O reparo e a regeneração tecidual pode ser melhorada ou acelerada pela angiogênese terapêutica (CAO, 2010).

Há várias evidências na literatura sugerindo que a terapia ultrassônica pode ser uma forma simples de promover a angiogênese terapêutica e o mecanismo através do qual o US induz a angiogênese e o reparo de tecidos moles, de fraturas e da osteoradionecrose parece estar relacionado ao fato dele estimular a produção de fatores angiogênicos tais como o IL-8, bFGF e VEGF (PALIWAL; MITRAGOTRI, 2008).

Em um estudo de mecânica recente, demonstrou-se que o potencial terapêutico do US se origina do recrutamento de células submetidas à radiação ultrassônicas do local da área inflamada produtoras de fator de crescimento. É interessante notar que o tratamento combinado de arteriogênese acionada por US e

o transplante de células mononucleares derivadas da medula óssea facilita a restauração do fluxo sanguíneo tanto estimulando a angiogênese como a arteriogênese em um modelo de isquemia em ratos (PALIWAL; MITRAGOTRI, 2008).

No presente estudo não houve avaliação separada de capilares e vasos de maior calibre. Assim sendo, não é possível afirmar se o efeito do US foi sobre a angiogênese ou sobre a arteriogênese, ou ainda, sobre ambos.

Uma proposta para estudos futuros de vascularização ou o remodelamento vascular é quantificar tanto os dados relativos como os valores absolutos de comprimento. O volume expressa o tamanho geral e o mecanismo através do qual esse volume é alcançado pode envolver o crescimento linear e ou mudanças no calibre (expresso como áreas de sessão transversa ou diâmetros). Seguindo esse mesmo raciocínio a superfície de área é determinada pelo comprimento e calibre (expresso como perímetro da sessão transversa ou diâmetro). O benefício de se obter os perímetros transversais (P) e área (A) é que eles podem ser usados também para avaliar o remodelamento de forma do vaso calculando-se o coeficiente adimencional P²/A. Uma outra variável de interesse pode ser o número de células endoteliais, pois ele pode permitir avaliar se esse crescimento é proliferativo e ou envolve remodelamento da forma da célula. Assim a área de superfície dos capilares dividida pelo número de células endoteliais fornece uma medida conveniente da área do pavimento endoteliai (MAYHEW et al. 2004).

O tecido conjuntivo interage estreitamente com as células musculares, agregando-as em conjuntos hierarquicamente organizados, em níveis cada vez mais complexos, através de bainhas conjuntivas (endomísio, perimísio e epimísio). Além disso, as extremidades das fibras musculares se conectam a tecidos conjuntivos especializados, como tendões e fáscias, formando as chamadas junções miotendíneas (JMT). A recuperação ideal de uma lesão muscular necessita de um equilíbrio entre a regeneração das células musculares e dos componentes do tecido conjuntivo (HURME AND KALIMO, 1992), de modo a permitir o restauro da capacidade de suportar as cargas impostas normalmente ao tecido muscular.

O colágeno é um componente essencial do tecido conjuntivo muscular. O seu arranjo é responsável pela manutenção da micro-arquitetura muscular mantendo o alinhamento das células musculares e, portanto, contribuindo, para a eficiência da contração muscular (PURSLOW, 2002).

Os achados relativos à deposição das fibras colagênicas durante o reparo muscular confirmam as observações anteriores de PIEDADE et al. (2008) e avançam no sentido de identificar que o acúmulo inicial do colágeno ocorre no perimísio que permaneceu fibrótico em todos os tempos experimentais, exceto aos 24 dias pós-lesão nos músculos que receberam aplicação do ultrassom. Assim sendo, é lícito supor que o ultrassom atua positivamente no remodelamento do colágeno cicatricial nas etapas mais avançadas do processo inflamatório.

O estudo das quantidades absolutas de colágeno foi um dos passos importantes deste trabalho para levar a uma compreensão dos fenômenos envolvidos no reparo muscular e como o US age nestes processos. A observação de que nas lesões controles não houve aumento do volume absoluto de colágeno ao longo do tempo é intrigante, pois tem-se sempre em mente que o reparo cicatricial leva a um aumento da deposição de colágeno ao longo do tempo. Ao invés disso, nossos dados mostram que, no caso do reparo muscular, há um depósito inicial de colágeno (predominantemente no perimísio do tecido muscular preservado adjacente à lesão) que cujo valor absoluto se mantem constante nos controles. No
entanto, a fração de volume ou densidade de colágeno aumentou com o tempo, devido principalmente à redução da lesão. Já nas lesões tratadas com ultrassom o volume absoluto de colágeno é maior aos 4 e aos 7 dias p.o., ainda que o volume da lesão seja menor, o que caracteriza um ganho real de deposição de fibras colagênicas. No entanto, aos 24d. p.o., tanto a densidade como o volume de fibras de colágeno apresentavam-se semelhantes ao controle, o que indica uma alta atividade metabólica no remodelamento deste colágeno depositado. Assim sendo, o ultrassom poderia ter estimulado o remodelamento da matriz extracelular nos tempos mais tardios do processo de reparo, promovendo a expressão gênica de diferentes tipos de colágeno e metaloproteinases que contribuíram para a estabilização morfológica e funcional do músculo.

O tecido cicatricial é um componente essencial para o reparo tecidual, e para a maioria dos tecidos músculo-esqueléticos, representa o melhor reparo que pode ser alcançado. A regeneração tecidual completa seria o ideal, mas não ocorre na maioria dos tecidos músculo-esqueléticos. Um tecido cicatricial funcional pode ser considerado o segundo melhor resultado, mas o objetivo da aplicação terapêutica seria promover a construção de um tecido cicatricial o mais eficiente possível.

HARVEY et al., ainda em 1975, demonstraram que o US pulsado de baixa intensidade aumenta a síntese protéica e vários grupos de pesquisa tem demonstrado um aumento da fibroplasia e da síntese de colágeno (ENWEMEKA, 1989; PIEDADE et al. 2008; FREITAS et al., 2009).

Durante a fase de remodelamento do reparo tecidual, o tecido cicatricial produzido nos estágios iniciais do reparo é remodelado de forma a adotar características funcionais do tecido que está sendo reparado. Isto é alcançado através de uma séria de processos, mas principalmente pela orientação das fibras de colágeno no desenvolvimento cicatricial e também pela mudança no tipo de colágeno, do tipo predominantemente de colágeno tipo III para uma maior prevalência do colágeno tipo I. O processo de remodelagem é certamente a fase mais longa, podendo durar um ano ou mais. O US pode influenciar o remodelamento do tecido cicatricial melhorando a orientação apropriada de fibras de colágeno neoformadas e também na mudança do perfil do colágeno tipo I, dessa forma aumentando a força de tensão e melhorando a mobilidade cicatricial e a capacidade funcional do tecido (NUSSBAUM, 1998; NG et al., 2003; TSAI et al., 2006). Neste sentido, o US colaborou para a melhor orientação das fibras colagênicas observada nas lesões tratadas com US.

O mecanismo molecular através do qual o US altera a função celular com a conseqüente modificação da síntese protéica (de colágeno, por exemplo) ainda não é conhecido. Os seguintes mecanismos tem sido propostos:.1) a compressão de microtúbulos, ou cavitação, produzindo movimentos oscilatórios de microbolhas e fluxo acústico, que poderia ter um efeito direto sobre a permeabilidade da membrana celular e melhorar a atividade de segundos mensageiros com consequente modificação dos sinais intracelulares para a expressão gênica;. 2) o efeito da pressão mecânica sobre a superfície celular poderia também ativar um tipo de canal de cálcio mecanosensível, e as consequentes mudanças nas concentrações catiônicas intracelulares pode levar à ativação das vias de sinalização regulando finalmente a expressão gênica; 3) a energia mecânica transferida pelo US pode ativar mudanças nas ligações do citoesqueleto à matriz extracelular, afetando o metabolismo celular e a expressão gênica. Nos modelos de "tensigridade", a aplicação de forças mecânicas ao citoesqueleto tem capacidade para afetar o

120

metabolismo celular e a expressão gênica. 4) Finalmente, um aumento na temperatura durante a exposição ao US pode ter um efeito sobre o metabolismo celular.

As alterações estruturais detectadas nas lesões tratadas com US se refletiram nos parâmetros biomecânicos. No tecido normal, as fibras colágeno do perimísio agrupam conjuntos de fibras musculares, dispondo-se em paralelo a estas e conectam ao colágeno do endomísio que envolve cada uma das células musculares. Parece plausível considerar que um aumento na espessura do perimísio interfere na mecânica normal das fibras musculares (BORG; CAULFIELD, 1980).

Os músculos do grupo 4C apresentaram um desempenho significativamente pior para os parâmetros de tensão máxima e rigidez em relação ao grupo 4US. Esse resultado era esperado levando-se em consideração que o estudo estereológico mostrou que a lesão no grupo 4C apresenta praticamente o dobro de volume absoluto da lesão que no grupo 4US. Além disso, no grupo 4 US há uma deposição de colágeno maior que no controle, o que certamente confere maior resistência a estes músculos no teste de tensão. Por sua vez, o melhor desempenho nesses mesmos parâmetros dos músculos tratados com ultrassom aos 24 dias pode estar relacionado não somente ao menor volume da lesão (que também é significativo aos 24 dias), mas também ao alinhamento espacial adequado das fibras colagênicas (mais parecido com a condição do músculo normal) que foi observado nos cortes histológicos de músculos obtidos nesse tempo experimental e examinados pelo método da Picrossírius-polarização.

Como foi postulado por MACKENNA et al. (1997) para o músculo cardíaco, nem sempre uma maior densidade de fibras colagênicas implica uma rigidez tecidual maior, uma vez que seu arranjo e distribuição também são revelantes. Neste sentido, a maior resistência (avaliada pelo valor da tração máxima) e a maior rigidez que foram detectadas aos 24 dias p.o. nos músculos tratados com ultrassom podem ser decorrentes do remodelamento do colágeno fibrilar identificado no presente estudo pelo método da Picrossírius-polarização.

Durante o ensaio de tração, a ruptura não aconteceu de maneira abrupta em nenhum dos espécimes testados; ao contrário, o músculo se adelgaçava paulatinamente e as fibras musculares se rompiam aos grupos em diferentes tempos após o início do ensaio. Como ruptura acontecia aos poucos, o tempo de ruptura não se mostrou um bom parâmetro para ser analisado, uma vez que a contribuição do número e da espessura das fibras musculares para este parâmetro é muito propriamente dita na ruptura muscular.

Certamente as células musculares propriamente ditas contribuem para o comportamento biomecânico do músculo reparado (MATHEUS et al., 2008), porém não encontra- se na literatura qualquer citação a respeito do comportamento do músculo reparado, relacionando o valor obtido nos testes mecânicos e o tipo de tecido de reparação (miorregeneração x fibrose). Não sabemos se a recuperação da capacidade de suportar carga pelo músculo lesado está relacionada a um reparo cicatricial fibroso, ou se esta recuperação mecânica relaciona-se a uma melhor recuperação biológica do músculo.

Os nossos resultados dos testes biomecânicos concordam com aqueles de MATHEUS et al. (2008), que demonstrou que a aplicação do US tanto de 1 como de 3 MHz no músculo esquelético lesado acelerou o processo de reparo, aumentando a rigidez e a carga suportada à tração.

A análise da rigidez é um parâmetro essencial para a avaliação das propriedades mecânicas musculares, pois sua redução indica que o músculo está se alongando mais na presença de cargas menores, o que leva a uma maior susceptibilidade às lesões. No presente estudo, observou-se uma melhora significativa da rigidez dos músculos tratados com US, o que sugere uma recuperação funcional do tecido. Esta possibilidade de recuperação tem importância prática, pois aumenta a capacidade para realizar trabalhos mais pesados após a lesão, com menos risco de ruptura.

A íntima relação entre as propriedades tensionais e o tecido conjuntivo do músculo também se torna evidente durante o experimento do músculo intacto, porque o local da ruptura foi mais frequentemente no ventre muscular, onde a quantidade de tecido muscular é maior e de tecido conjuntivo é menor. Este achado está de acordo com outros estudos onde o ventre muscular foi identificado como pondo mais fraco do músculo intacto. Nos tempos iniciais pós-lesão, o local da ruptura é o local da lesão, porém nas mais antigas, o local da ruptura deixa de ser o local da cicatriz. Provavelmente a maior densidade (fração de volume) de fibras colagênicas observada neste presente estudo, seja responsável pela maior resistência do local da cicatriz.

O presente estudo levou à compreensão mais clara da contribuição de alguns elementos teciduais no processo de reparo muscular. Para tanto, construiuse um painel de resultados que associa estudos histopatológicos qualitativos (infiltrado inflamatório, níveis de agregação e disposição do colágeno), estudo morfométrico baseado em métodos estereológicos (avaliação de dimensões relativas e absolutas dos componentes teciduais) e estudos biomecânicos. Certamente este conjunto de dados fidedignos e de fácil reprodução abre o caminho para estudos que busquem quais são os mecanismos de ação do ultrassom na produção dos fenômenos teciduais aqui descritos.

6. CONCLUSÕES:

a) A aplicação do USp não comprometeu a seqüência de eventos que determinam o processo natural de reparo do músculo estriado lacerado.

 b) As lesões musculares tratadas com USp apresentaram uma diminuição mais acentuada no volume da lesão.

c) A resolução do processo inflamatório em laceração muscular é estimulada pela aplicação do USp, resultando em um menor volume ocupado pelo infiltrado inflamatório no local da lesão.

d) A angiogênese é estimulada pela aplicação do USp, resultando em um maior volume de vasos na área lesada bem como em uma maior densidade de vasos por unidade de volume.

e) A deposição de fibras colagênicas é estimulada pela aplicação de USp em lesão muscular por laceração desde as fases iniciais do reparo, resultando em um maior volume ocupado pelo colágeno no local da lesão.

f) A orientação das fibras colagênicas e das células musculares em regeneração segue um padrão de distribuição mais parecido ao tecido normal adulto nas lesões submetidas a aplicações de USp.

g) A aplicação do USp em laceração muscular estimula a restauração das propriedades biomecânicas (tensão e rigidez) do músculo lesado, uma vez que, biomecanicamente, esses são mais parecidas com os músculos íntegros em relação aos músculos que não receberam tratamento algum.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alameddine HS, Dehaupas M, Fardeau M. Regeneration of skeletal muscle fibers from autologous satellite cells multiplied in vitro. An experimental model for testing cultures cel myogenicity. Muscle Nerve 12: 544-555, 1989.
- Allen RE, Rankin LL. Regulation of satellite cells during skeletal muscle growth and development. Proc Soc Exp Biol Med 194: 81-86, 1990.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Benedito-Silva AA, Tufik S. The effect of combined therapy (ultrasound and interferential current) on pain and sleep in fibromyalgia. Pain 104: 665-672, 2003.
- Arora PD, Mc Culloch CA. Dependence of collagen remodeling on alpha smooth muscle actin expression by fibroblasts. J Cell Physiol 159 (1):161-75, 1994.
- Aynaci O, Önder Ç, Piskin A, Özoran Y. The effect of ultrasound on the healing of muscle-pediculated bone graft in spinal fusion. Spine 27 (14): 1531-1535, 2002.
- Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. Phys Ther 81 (7): 1351-1358 2001.
- Ballard K, Charles H. Ultrasound therapy. Nurs Times 97 (24): 58-59, 2001.
- Belanger AY. Evidence based guide to therapeutic physical agents. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
- Bennett M, Ho S, Lavidis N. Competition between segmental nerves at end-plates in rat gastrocnemius muscle during loss of polyneuronal innervation. J Physiol (Lond) 381: 351-376, 1986.
- Bennett MR, Ho S. The formation of topographical maps in developing rat gastrocnemius muscle during synapse elimination. J Physiol (Lond) 396: 471-496, 1988.
- Binder A, Hodge G, Greenwood AM, Hazleman BL, Page Thomas DP. Is therapeutic ultrasound effective in treating soft tissues lesions? Br Med J 290 (16): 512-514, 1985.
- Bischoff R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. Development 109: 943-952, 1990.
- Bishop S, Draper DO, Kngiht KL, Feland B, Eggett D. Human tissue-temperature rise during ultrasound treatments with the Aquaflex Gel Pad. J Athl Training 39 (2): 126-131, 2004.
- Borg TK, Caulfield JB. Morphology of connective tissue in skeletal muscle. Tissue Cell. 12 (1):197-207, 1980.
- Byl NN, McKenzie AL, West JM, Whitney JD, Hunt TK, Scheuenstuhl. Low-dose ultrasound effects on wound healing: a controlled study with yucatan pigs. Arch Phys Med Rehabil 73: 656-664, 1992.
- Cao Y. Angiogenesis: What can it offer for future medicine? Exp Cell Res. 316(8):1304-1308, 2010.
- Chargé SBP, Rudnick MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. Physiol Rev 84: 209-238, 2004.

- De Deyne PG, Kirsch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. Phys Ther 75 (7): 929-634, 1995.
- Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. J oral maxillofac surg 57:409 419, 1999.
- Drastichova V, Samohyl J, Slavetinska A. Strengthening of sutured skin wound with ultrasound in experiments on animals. Acta Chir Plast 15 (2): 114-119, 1973.
- Dyson M, Pond JB, Joseph J, Warwick R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. Clin Sci 35: 273-285, 1968.
- Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. Physiotherapy 73 (3),: 116-120, 1987.
- Dyson M. Non-Thermal cellular effects of ultrasound. Br J Cancer 45, Suppl V: 165-171, 1982.
- Ebenbichler GR, Erdogmus CB, Resch KL, Funovics MA, Kainberger F, Barisani G, Aringer M, Nicolakis P, Wiesinger GF, Baghestanian M, Preisinger E, Fialka-Moser V. Ultrasound therapy for calcific tendinitis of the shoulder. N Eng J Med 340 (20): 1533-1538, 1999.
- El Hag M, Coghlan K. The anti-inflammatory effect of dexamethazone and therapeutic ultrasound in oral surgery. Br J Oral & Maxillofacial Surgery 23: 17-23, 1985.
- Enwemeka CS. The effects of therapeutic ultrasound on tendom healing a biomedical study. Am J Phys Med Rehabil 68 (6): 283-287, 1989.
- Esenyel M, Caglar N, Aldemir T. Treatment of myofascial pain. Am J Phys Med Rehabil 79 (1): 48-52, 2000.
- Fisher BD, Baracos VE, Shnitka TK, Mendryk SW, Reid DC. Ultrastructural events following acute muscle trauma. Med Sci Sports Exerc 22 (2): 185-193, 1990.
- Freitas LS, Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Pinho RA, Streck EL. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. Cell Biology International 31: 482-488, 2007.
- Freitas TP, Gomes M, Fraga DB, Freitas LS, Rezin GT, Santos PM, Silveira PC, Paula MM, Pinho RA, Streck EL. Effect of Therapeutic Pulsed Ultrasound on Lipoperoxidation and Fibrogenesis in an Animal Model of Wound Healing. Journal of Surgical Research. 161 (1):168-171, 2010.
- Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu FH, Huard J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. Am J Sports Med 29 (4): 394-402, 2001.
- Fyfe MC, Chahl LA. Mast cell degranulation and increased vascular permeability induced by 'therapeutic' ultrasound in the rat ankle joint. Br J Exp Pathol 65: 671-676, 1984.
- Gan BS, Huys S, Sherebrin MH, Scilley CG. The effects of ultrasound treatment on flexor tendom healing in the chicken limb. J Hand Surg 20B (6): 809-814, 1995.
- Garrett WE Jr., Seaber AV, Boswick J, Urbaniak JR, Goldner JL. Recovery of skeletal muscle after laceration and repair. J Hand Surg 9A (5): 683-692, 1984.
- Garrett WE Jr. Muscle strain injuries clinical and basic aspects. Med Sci Sports Exerc 22 (4): 436-443, 1990.

- Giombini A, Casciello G, Di Cesare MC, Di Cesare A, Dragoni S, Sorrenti D. A controlled study on the effects of hyperthermia at 434 MHz and conventional ultrasound upon muscle injuries in sport. J Sports Med Phys Fitness 41 (4): 521-527, 2001.
- Giri SN, Hyde DM, Braun RK, Gaarde W, Harper JR, Pierschbacher MD. Antifibrotic effect of decorin in a bleomycin hamster model of lung fibrosis. Biochem Pharmacol 54: 1205-1216, 1997.
- Guillodo Y, Saraux A. Treatment of muscle trauma in sportspeople (from injury on the field to resumption of the sport). Ann Phys Rehabil Med 52 (3):246-55, 2009.
- Gum SL, Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendom biomechanics. Am J Phys Med Rehabil 76 (4): 288-296, 1997.
- Gundersen HJ and Osterby R. Optimizing sampling efficiency of stereological sudies in biology: or 'do more less well'. J Microsc. 121(Pt 1): 65-73, 1981.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen, Vesterby A, West MJ. Some new simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 96: 379-394, 1988.
- Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, Rubin C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. Clin Orthop 355: S216-S229, 1998.
- Hall MP, Band PA, Meislin RJ, Jazrawi LM, Cardone DA. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. J Am Acad Orthop Surg 17 (10):602-8, 2009.
- Harvey W, Dyson M, Pond JB, Grahame R. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. Rheumatol Rehabil 14: 237, 1975.
- Hashish I, Harvey W. Anti-inflammatory effects of ultrasound: evidence for a major placebo effect. Br J Rheumatology 25(1): 77-81, 1986
- Hashishl, Hai HK. Reduction of postoperative pain and swelling by ultrasound treatment: a placebo effect. Pain 33 (3): 303-311, 1988.
- Hebel R, Stromberg MW. Myology. In: Hebel R, Stromberg MW, editors. Anatomy and embryology of the laboratory rat. Worthsee: BioMed Verlag 1986: 25-44.
- Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. J Bone Joint Surg 76A: 26-34, 1994 (American Volume).
- Huang MH, Ding HJ, Chai CY, Huang YF, Yang RC. Effects of sonication on articular cartilage in experimental osteoarthritis. J Rheumatol 24 (10): 1978-1984, 1997.
- Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. Med Sci Sports Exerc 23 (7): 801-810, 1991.
- Hurme T and Kalimo H. Adhesion in skeletal muscle during regeneration. Muscle Nerve 15:482-9, 1992.
- Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. Nat Med 2 (4): 418-423, 1996.
- Jackson BA, Schwane JÁ, Starcher BC. Effect of ultrasound therapy on the repair of achilles tendom injuries in rats. Med Sci Sports Exerc 23 (2): 171-175, 1991.

- Järvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle: 4. effect of a early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. Acta Chir Scand 142: 47-56, 1976.
- Järvinen TA, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries biology and treatment. Am J Sports Med 33 (5): 745-764, 2005.
- Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Aarimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: optimizing recovery. Best Practice & Research Clinical Rheumatology 21 (2): 317-331, 2007.
- Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani RR. Differential staining of collagens type I,II and III by sirius red and polarization microscopy. Arch Histol Jpn 41: 267-74, 1978.
- Kääriäinen M, Kääriäinen J, Järvinen TLN, Sievänen H, Kalimo H, Järvinen M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration after laceration injury of skeletal muscle. J Orthop Res 16: 197-206, 1998.
- Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. Scand J Med Sci Sports 10: 332-337, 2000 (a).
- Kääriäinen M, Kääriäinen J, Järvinen TLN, Nissinen L, Heino J, Järvinen M, Kalimo H. Integrin and dystrophin associated adhesion protein complexes during regeneration of shearing-type muscle injury. Neuromuscul Disord 10: 121-132, 2000 (b).
- Kapanci Y, Ribaux C, Chaponnier C, Gabbiani G. Cytoskeletal features of alveolar myofibroblasts and pericytes in normal human and rat lung. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 40 (12): 1955-1963, 1992.
- Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. Arch Phys Med Rehabil 83: 1-4, 2002.
- Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SC, Huard J. Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. Cell Transplant 7 (6): 585-598, 1998.
- Kibler WB. Clinical aspects of muscle injury. Med Sci Sports Exerc 22(4): 450-2, 1990.
- LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult boné marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. Cell 111: 589-601, 2002.
- Lehmann JF. Technique. Em Hoogland R, ed. Ultrasound therapy. Delft: DIMEQ Delft Instruments, 1994.
- Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. J Bone Joint Surg 67-B (5): 820-828, 1985.
- Levine D, Millis DL, Mynatt T. Effects of 3.3-MHz ultrasound on caudal thigh muscle temperature in dogs. Veterinary surgery 30: 170 174, 2001.
- Liu S, Damhieu P, Devanze P, Said G, Heard JM, Tadie M. Efficient reinnervation of hindlimb muscles by thoracic motor neurons after nerve cross-anastomosis in rats. J Neurosurg 99: 879-885, 2003.
- Mackenna D, vaplon S, McCulloch A. Microstructural model of perimysial collagen fibers for resting myocardial mechanics during ventricular filling. Am. J. Physiol 273: H1576-1586, 1997.
- Malone TR, Garrett WE Jr, Zachazewski JE. Muscle: deformation, injury, repair. Em: Zachazewski JE, Magee DJ, Quillen WS, ed. Athletic injuries and rehabilitation. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996.

- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. An Acad Bras Cienc. 75 (4): 469-486, 2003.
- Market CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal Ultrasound and Exercise in Skeletal Muscle Regeneration. Arch Phys Med Rehabil 86:1304-1310, 2005.
- Matheus JPC, Oliveira FB, Gomide LB, Milani JGPO, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. Rev. bras. fisioter.12 (3) 2008.
- Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. Placenta. 25 (2-3):127-139, 2004.
- McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ, Devor ST, Merrick MA. Therapeutic Ultrasound Decreases Mechano-Growth Factor Messenger Ribonucleic Acid Expression After Muscle Contusion Injury. Arch Phys Med Rehabil 88:936-40, 2007.
- McDiarmid T, Ziskin M, Michlovitz SL. Therapeutic ultrasound. Em: Michlovitz SL, ed. Thermal agents in rehabilitation. Philadelphia: F. A. Davis, 3rd ed.,1996.
- Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. Am J Sports Med 27 (2): 222-229, 1999.
- Montes GS, Zugaib M, Joazeiro PP, Varayoud J, Ramos JG, Munoz-de-Toro M, Luque EH. Phenotypic modulation of fibroblastic cells in the mucous layer of the human uterine cervix at term. Reproduction 124: 783-790, 2002.
- Ng CO, Ng GY, See EK, Leung MC. Therapeutic ultrasound improves strength of achilles tendon repair in rats. Ultrasound Med Biol 29 (10):1501-6, 2003.
- Nordin M, Frankel VH. Basic biomechanics of the musculoskeletal system. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins 2001.

Nussbaum E. The influence of ultrasound on healing tissues. J Hand Ther. 11 (2):140 - 147, 1998.

- Nussbaum EL. "Ultrasound: to heat or not to heat that is the question" Physical Therapy Reviews 2: 59-72, 1997
- Okita M., Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Yoshimura T. Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle. Ultrasound in Med. & Biol 35 (2): 237–244, 2009.
- Oron U. Photoengineering of tissue repair in skeletal and cardiac muscles. Photomed Laser Surg 24 (2):111-20, 2006.
- Paliwal S, Mitragotri S. Therapeutic opportunities in biological responses of ultrasound. Ultrasonics 48: 271-278, 2008.
- Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, Toledo OMS. Effect of Ultrasound Therapy on the Repair of Gastrocnemius Muscle Injury in Rats. Ultrasonics 48: 403-411, 2008.
- Pospisilova J. Effect of ultrasound on collagen synthesys and deposition in experimental granuloma tissue. possibilities of clinical uses of ultrasound in healing disorders. Acta Chir Plast 18 (4): 176-183, 1976.
- Purslow PP. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. Compar. Biochem. Physiol. A 133: 947-966, 2002.

- Rafiuddin AM, Jayakumar R. Peripheral nerve regeneration in RGD peptide incorporated collagen tubes. Brain Res 993: 208-216, 2003.
- Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation *in vitro*. Med Sci Sports Exerc 10: 326-332, 1997.
- Ramli R, Reher P, Harris M., Meghji S. The effect of ultrasound on Angiogenesis: an in vivo study using the chick chorioallantoic membrane. Int J Oral Maxillo fac Implants. 24 (4): 591 596, 2009.
- Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal msucle: evidence for two different populations of satellite cells. Lab Invest 72: 341-347, 1995.
- Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. Am J Sports Med 27 (1): 54-59, 1999.
- Rawool NM, Goldberg BB, Forsberg F, Winder AA, Hume E. Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. J Ultrasound Med. 22 (2): 145-153, 2003.
- Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. Cytokine 11 (6): 416 423, 1999.
- Rossi P, Marzani B, Giardina S, Negro M, Marzatico F. Human skeletal muscle aging and the oxidative system: cellular events. Curr Aging Sci. 1 (3):182 191, 2008.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. Mikroskopie 26 (1):57-60, 1970.
- Silveira PC, Victor EG, Schefer D, Silva LA, Streck EL, Paula MM, Pinho RA.Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. Ultrasound Med Biol. 2010 Jan;36(1):44-50.
- Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The Inflammatory Response to Skeletal Muscle Injury Illuminating Complexities. Sports Med 38 (11): 947-969, 2008.
- Song J, Qi M, Kaul S, Price RJ. Stimulation of arteriogenesis in skeletal muscle by microbubble destruction with ultrasound. Circulation. 106 (12):1550-1555, 2002.
- Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. Rheumatology 40: 1331-1336, 2001.
- Stone MH. Muscle Conditioning and muscle injuries. Med Sci Sports Exerc 22 (4): 457-462, 1990.
- Stratton SA, Heckmann R, Francis RS. Therapeutic ultrasound: its effect on the integrity of a nonpenetrating wound. J Orthop Sports Phys Ther 5 (5): 278-281, 1984.
- Ter Haar G, Daniels S. Evidence for ultrasonically induced cavitation *in vivo*. Phys Med Biol 26 (6): 1145-1149, 1981.
- Ter Haar G. Basic physics of therapeutic ultrasound. Physiotherapy 73 (3): 110-116, 1987.
- Ter Haar G. Therapeutic ultrasound. Eur J Ultrasound 9 (1):3-9, 1999.
- Terada N, Takayama S, Yamada H, Seki T. Muscle repair after a transsection injury with development of a gap: an experimental study in rats. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 35: 233-238, 2001.
- Thomas CK, Sesodia S, Erb DE, Grumbles RM. Properties of medial gastrocnemius motor units and muscle fibers reinnervated by embryonic ventral spinal cord cells. Exp Neurol 180: 25-31, 2003.

- Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. Am J Sports Med 26 (2): 172-176, 1998.
- Tomasek JJ, Giulio G, Boris H, Chaponnier C, Brown RA. Myofifroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Molecular Cell Biology 3: 349-363, 2002.
- Tsai WC, Pang JH, Hsu CC, Chu NK, Lin MS, Hu CF. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor beta. J Orthop Res. 24 (6):1310-1316, 2006.
- Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H. Transected myofibers may remain permanently divided in two parts. Neuromuscul Disord 12: 584-797, 2002.
- Valero-Cabre A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X, Neiss WF. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. J Neurotrauma 21: 95-108, 2004.
- Varejao AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. Neurol Res 26: 186-194, 2004.
- Watson T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. Ultrasonics 48: 321-329, 2008.
- Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB. The role of ultrasound-induced cavitation in the 'in vitro' stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. Ultrasonics 33-37, 1980.
- Weibel ER. Fleischner Lecture. Looking into the lung: what can it tell us? AJR Am J Roentgenol 133 (6):1021-31, 1979.
- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev 83: 835-870, 2003.
- Wessling KC, DeVane DA, Hylton CR. Effects of static stretch versus static stretch and ultrasound combined on triceps surae muscle extensibility in healthy women. Phys Ther 67 (5): 674-679, 1987.
- Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. Int J Sports Med 25: 73-77, 2004.
- Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilised muscle. J. Anat. 138 (21): 343-350, 1984.
- Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. Am Surg 65: 22-26, 1999.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol 214: 199–210, 2008.
- Young SR, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. Ultrasound Med Biol 16 (3): 261-269, 1990.
- Young B, Heath JW. Wheater's Functional histology (a text and colour atlas). New York: Churchill Livingstone 4th ed., 2000.
- Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J, Bachem MG. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. J Biol Chem 279 (52): 54463-54469, 2004.

ANEXOS

1. Volume total da lesão

Tabela 1 – Volume médio das lesões e desvio padrão, em mm³ e resultados da análise estatística em diferentes momentos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar as lesões tratadas com ultrassom ao longo dos diferentes tempos pós-lesão; para as lesões controles não se observou homogeneidade de variância pelo teste de Levene e, assim sendo, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as lesões controle entre si ao longo do tempo. O teste t-Student independente foi usado para comparar lesões controles X lesões tratadas com ultrassom em cada tempo estudado. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

	4C						
	44,47 ± 16,09						
7C	(0.021)	7C					
18,27± 3,27	(0,021)	18,27± 3,27					
14C	(0.018)	nc	14C				
13,49 ± 4,95	(0,018)	ns	13,49 ± 4,95				
24C	(0,006)	(0,045)	nc	24C	-		
$9,69 \pm 3,23$	(0,000)		115	9,69 ± 3,23			
4US	(0.02)				4US		
21,05 ± 4,47	(0,02)				21,05 ± 7,47		
7US		(0.017)			(0,000)	7US	
$9,87 \pm 4,49$		(0,017)			(0,009)	9,87 ± 4,49	
14US			(0.016)		(0.001)	ne	14US
6,01 ± 1,82			(0,010)		(0,001)	115	6,01 ± 1,82
24US				(0.047)	(0.001)	ns	ns
5,41 ± 1,57				(0,047)	(0,001)	113	113

- 2. Fração de volume da zona central e da zona de regeneração
- Tabela 2 Média e desvio padrão da Fração de Volume correspondente à Zona Central, em porcentagem e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento (controle ou US); o teste t-Student independente foi usado para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

	40	-					
	40						
	32,15 ± 7,71		_				
7C	(0.026)	7C					
16,73 ± 9,02	(0,020)	16,73 ± 9,02		_			
14C	(0,002)	20	14C				
9,52 ± 5,82	(0,002)	115	9,52 ± 5,82		_		
24C	(0.001)	20	20	24C			
8,76 ± 3,27	(0,001)	ns	115	8,76 ± 3,27			
4US	20				4US		
24,39 ± 7,59	115				24,39 ± 7,59		_
7US		20			(0.021)	7US	
11,66 ± 6,56		ns			(0,031)	11,66 ± 6,56	
14US					(0,00,4)		14US
7,21 ± 4,91			ns		(0,004)	ns	7,21 ± 4,91
24US				20	(0,002)	20	20
4,79 ± 6,26				115	(0,002)	115	115

Tabela 3 – Média e desvio padrão da Fração de Volume correspondente à Zona de Regeneração, em porcentagem e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento (controle ou US); o teste t-Student independente foi usado para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

	40	•					
	67 85 + 7 71						
70	07,00 ± 7,71	70	-				
83.27 ± 9.02	(0,026)	83.27 ± 9.02					
14C	(0.000)		14C	-			
90,48 ± 5,82	(0,002)	ns	90,48 ± 5,82				
24C	(0.001)	20	20	24C	-		
91,24 ± 3,27	(0,001)	ns	ns	91,24 ± 3,27			
4US	20				4US		
75,61 ± 7,59	ns				75,61 ± 7,59		
7US		20			(0.021)	7US	
88,34 ± 6,56		ns			(0,031)	88,34 ± 6,56	
14US			20		(0.004)	20	14US
92,79 ± 4,91			115		(0,004)	115	92,79 ± 4,91
24US					(0,000)	20	
95,21 ± 6,26				ns	(0,002)	ns	ns

- 3. Volumes totais da zona central e da zona de regeneração
- Tabela 4 Média e desvio padrão do Volume correspondente à Zona Central, em mm³ e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os volumes da Zona Central entre os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento, uma vez que o teste de Levene não demonstrou homogeneidade de variância. O teste t-Student independente foi usado para comparar os grupos controles x USp em cada tempo. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

	40	-					
	40						
	13,77 ± 3,91		_				
7C	(0.021)	7C	-				
2,85 ± 1,13	(0,021)	2,85 ± 1,13					
14C	(0.040)		14C				
1,43 ± 1,10	(0,018)	ns	1,43 ± 1,10				
24C	(0,000)	20	20	24C	-		
$0,82 \pm 0,36$	(0,009)	ns	115	$0,82 \pm 0,36$			
4US	(0.004)				4US		
5,10 ± 2,15	(0,004)				5,10 ± 2,15		
7US		(0.014)			(0,000)	7US	
$0,98 \pm 0,44$		(0,011)			(0,009)	0,98 ± 0,44	
14US					(0,00,4)	(0.047)	14US
$0,43 \pm 0,28$			ns		(0,004)	(0,047)	$0,43 \pm 0,28$
24US				20	(0.004)	20	20
$0,30 \pm 0,15$				ns	(0,004)	ns	IIS

Tabela 5 – Média e desvio padrão do Volume correspondente à Zona de Regeneração, em mm³ e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os grupos US, ao longo dos diferentes tempos entre si e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os grupos controles entre si, uma vez que o teste de Levene não demonstrou homogeneidade de variância. O teste t-Student independente foi usado para comparar os controles x US em cada tempo estudado. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

	4C 30.70 ± 13.25						
7C 15,42 ± 4,17	(0,043)	7C 15,42 ± 4,17		_			
14C 12,06 ± 4,02	(0,022)	ns	14C 12,06 ± 4,02		_		
24C 8,87 ± 3,03	(0,010)	ns	ns	24C 8,87 ± 3,03		_	
4US 15,94 ± 6,16	ns				4US 15,94 ± 6,16		
7US 8,89 ± 4,45		ns			ns	7US 8,89 ± 4,45	
14US 5,58 ± 1,70			(0,013)		(0,005)	ns	14US 5,58 ± 1,70
24US 5,11 ± 1,31				ns	(0,006)	ns	ns

- 4. Fração de volume de vasos sanguíneos na lesão
- Tabela 6 Média e desvio padrão da Fração de Volume correspondente aos vasos sanguíneos nas lesões, em porcentagem e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento, tanto para os controles como para os tratados com US. O teste t-Student independente para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

	4C						
	1,70 ± 0,62		_				
7C	20	7C	-				
$0,88 \pm 0,38$	115	$0,88 \pm 0,38$					
14C	20	20	14C				
0,86 ± 0,34	ns	ns	$0,86 \pm 0,34$				
24C	20	20	20	24C	-		
0,81 ± 0,34	115	ns	115	0,81 ± 0,34		_	
4US	(0,045)				4US		
6,00 ± 2,81	(0,045)				6,00 ± 2,81		
7US		(0.024)			(0.046)	7US	
2,50 ± 1,24		(0,024)			(0,046)	2,50 ± 1,24	
14US			20		(0,027)	20	14US
1,96 ± 1,08			115		(0,027)	ns	1,96 ± 1,08
24US				20	(0.010)	20	20
$0,93 \pm 0,32$				115	(0,010)	115	TIS IIS

- 5. Volume total de vasos sanguíneos na lesão
- Tabela 7 Média e desvio padrão do Volume de vasos sanguíneos nas lesões, em mm³ e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os grupos controles entre si e, para a comparação entre os grupos tratados com US entre si foi feito o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que o teste de Levene não indicou homogeneidade de variância. O teste t-Student independente comparou os grupos controle x US em cada tempo, com exceção aos 14 dias; para esse tempo foi usado o teste de Mann-Whitney, uma vez o grupo 14US não demonstrou normalidade de distribuição de dados pelo teste de Shapiro-Wilk. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

	4C						
	0,47 ± 0,10		_				
7C	(< 0.000)	7C					
0,15 ± 0,08	(< 0,000)	$0,15 \pm 0,08$					
14C	(- 0.000)	20	14C				
$0,09 \pm 0,03$	(< 0,000)	ns	$0,09 \pm 0,03$				
24C	(< 0.000)	20	24C		-		
$0,06 \pm 0,04$	(< 0,000)	ns	115	$0,06 \pm 0,04$			
4US	(0, 0.45))	4US	-			
1,13 ± 0,38	(0,045)				1,13 ± 0,38		
7US		20			(0.005)	7US	
0,27 ± 0,23		ns			(0,025)	0,27 ± 0,23	
14US			20		(0.004)	20	14US
0,10 ± 0,05			ns		(0,024)	ns	0,10 ± 0,05
24US			20	0.012)	(0.042)	20	
$0,04 \pm 0,02$				115	0,013)	(0,043)	115

- 6. Fração de superfície de vasos sanguíneos na lesão
- Tabela 8 Média e desvio padrão da Fração de Superfície de vasos sanguíneos nas lesões, em mm²/mm³ e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os grupos controles entre si e os tratados com US entre si ao longo do tempo. O teste t-Student independente comparou os grupos controle x US em cada tempo estudado. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

		_					
	4C						
	4,02 ± 1,40		_				
7C	20	7C	-				
$2,30 \pm 0,46$	115	$2,30 \pm 0,46$		_			
14C	20	20	14C	-			
$2,67 \pm 0,45$	ns	ns	$2,67 \pm 0,45$		_		
24C	20	20	20	24C	-		
2,00 ± 1,63	ns	ns	ns	2,00 ± 1,63		_	
4US	(0.020)				4US	-	
8,93 ± 3,87	(0,029)				8,93 ± 3,87		
7US		(0,020)			20	7US	
5,63 ± 2,51		(0,020)			ns	5,63 ± 2,51	
14US			20		20	20	14US
4,56 ± 2,98			ns		ns	ns	$4,56 \pm 2,98$
24US				20	(0.022)	20	20
$2,65 \pm 2,07$				115	(0,033)	115	115

- 7. Superfície total de vasos sanguíneos na lesão
- Tabela 9 Média e desvio padrão da Superfície total de vasos sanguíneos nas lesões, em mm² e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os grupos controles entre si, ao longo dos diferentes tempos e para a comparação entre os grupos tratados com US, foi feito o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que o teste de Levene não indicou homogeneidade de variância. O teste t-Student independente comparou os grupos controles x US em cada tempo estudado. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

		_					
	4C 109,92 ± 48,18	-					
7C 39,53 ± 16,45	(0,007)	7C 39,53 ± 16,45		_			
14C 32,23 ± 18,70	(0,003)	ns	14C 32,23 ± 18,70		_		
24C 16,21 ± 8,53	(0,001)	ns	ns	24C 16,21 ± 8,53			
4US 172,77 ± 76,19	ns				4US 172,77 ± 76,19		
7US 60,86 ± 47,73		ns			(0,025)	7US 60,86 ± 47,73	
14US 23,54 ± 14,60			ns		(0,038)	ns	14US 23,54 ± 14,60
24US 10,48 ± 8,46				ns	(0,018)	ns	ns

- 8. Fração de volume de fibras colagênicas na lesão
- Tabela 10 Média e desvio padrão da Fração de Volume correspondente às fibras colagênicas na lesão, em porcentagem e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os diferentes tempos póslesão dentro de um mesmo tratamento, tanto para os controles como para os tratados com US. O teste t-Student independente para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

	4C						
	6,70 ± 2,90						
7C	(0.026)	7C					
13,16 ± 1,29	(0,030)	13,16 ± 1,29					
14C	(< 0.000)	20	14C				
19,85 ± 4,06	(< 0,000)	115	$19,85 \pm 4,06$				
24C	(0,000)	20	20	24C			
$14,10 \pm 2,46$	(0,006)	ns	ns	14,10 ± 2,46			
4US	(0,002)				4US		
14,27 ± 2,67	(0,003)				14,27 ± 2,67		
7US		(0.016)			(0,005)	7US	
31,84 ± 9,80		(0,016)			(0,005)	31,84 ± 9,80	
14US							14US
22,25 ± 7,18			ns		ns	ns	22,25 ± 7,18
24US				20	20	(0.014)	20
15,38 ± 5,41				115	115	(0,014)	115

- 9. Volume total de fibras colagênicas na lesão
- Tabela 11 Média e desvio padrão do Volume correspondente às fibras colagênicas na lesão, em mm³ e resultados da análise estatística para os diferentes tempos após laceração muscular em ratos controles e tratados com ultrassom. O teste de ANOVA one factor foi usado para comparar os diferentes tempos pós-lesão dentro de um mesmo tratamento. O teste t-Student independente para comparar os grupos controle x US em cada tempo estudado. O valor de p encontra-se na intersecção entre as colunas. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05.

	40						
	40						
	2,32 ± 1,01		_				
7C	20	7C					
1,91 ± 0,69	115	1,91 ± 0,69					
14C	20	20	14C				
2,21 ± 1,20	ns	ns	2,21 ± 1,20				
24C	20	20	20	24C			
1,39 ± 0,58	ns	ns	115	1,39 ± 0,58			
4US	(0,006)				4US	-	
7,58 ± 2,68	(0,008)				7,58 ± 2,68		
7US		(0.011)				7US	
5,65 ± 1,26		(0,011)			ns	5,65 ± 1,26	
14US					(0,000)	(0,000)	14US
1,22 ± 0,61			ns		(0,002)	(0,020)	1,22 ± 0,61
24US				20	(0.001)	(0,000)	20
0,86 ± 0,42				115	(0,001)	(0,009)	115