THIAGO SAIKALI FARCIC

Efeitos de diferentes tempos de aplicação do ultrassom terapêutico no tratamento de tendão de ratos no processo de reparação tecidual

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação
Área de Concentração: Movimento, Postura e Ação Humana
Orientadora: Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto

São Paulo
2011

THIAGO SAIKALI FARCIC

Efeitos de diferentes tempos de aplicação do ultrassom terapêutico no tratamento de tendão de ratos no processo de reparação tecidual

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação
Área de Concentração: Movimento, Postura e Ação Humana
Orientadora: Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Farcic, Thiago Saikali
Efeito de diferentes tempos de aplicação do ultrassom terapêutico no tratamento de tendão de ratos no processo de reparação tecidual / Thiago Saikai Farcic. -- São Paulo, 2011.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências da Reabilitação. Área de concentração: Movimento, Postura e Ação Humana.
Orientadora: Raquel Aparecida Casarotto.

Descritores: 1.Tendão de calcâneo/lesões 2.Terapia por ultrassom/métodos 3.Cicatrização 4.Ratos

USP/FM/DBD-/36411

Agradecimentos

Agradeço a Deus.

Aos meus pais pelo amor, apoio, paciência e dedicação.

À tia Claudia e tio Luiz, meus irmãos e minha namorada pelos momentos de reflexão, tolerância, diversão e ajuda.

A minha orientadora Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto pela paciência e todos os ensinamentos transmitidos.

Ao meu grande amigo e "pai-profissional" Cristiano S. Baldan vulgo "Picreta", pelos momentos, horas e dias de convivência, pelo seu auxílio na experimentação, coleta e análise dos dados. Agradeço pelo seu apoio, confiança, companheirismo em todas as etapas do mestrado.

Aos meus amigos Igor "anão" Masson, Alessandra "Cabeçones" Schiavinato Baldan, Ivaldo "Cabeção" Esteves Junior, Aline Machado.

Aos professores e amigos Fátima Caromano, Silvia Maria Amado João, Nivaldo Antonio Parizotto, Richard Eloin Liebano.

A Universidade Paulista, Universidade Federal de São Carlos e Universidade de São Paulo pelo fornecimento de sua estrutura e equipamentos.

Ao núcleo docente e estrutural do programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial os membros do departamento de Ciências da Reabilitação.

Aos meus alunos por me motivarem e tornarem o mestrado fundamental para a profissão professor.

Normalização adotada

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

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

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

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

Sumário

Agradecimentos vi
Normalização adotada viii
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas xi
Lista de figuras xii
Resumo xiii
Abstract xiv

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DA LITERATURA 3

2.1 Tendão 4
2.1.1 Colágeno 4
2.1.2 Revestimento do tendão 5
2.2 Tendão do calcâneo 6
2.3 Ruptura do tendão do calcâneo 6
2.4 Reparação tecidual da lesão tendínea 8
2.4.1 Fase inflamatória 9
2.4.2 Fase proliferativa 10
2.4.3 Fase de remodelamento 12
2.5 Recursos terapêuticos para o tratamento das lesões tendíneas 13
2.6 Terapia por Ultrassom 13
2.6.1 Produção de ultrassom 15
2.6.2 Efeitos da terapia por ultrassom 16
2.6.2.1 Efeitos térmicos 17
2.6.2.2 Efeitos não-térmicos do ultrassom 19
2.6.3 Estudos sobre a terapia por ultrassom em lesão tendínea 21
2.6.4 Dosimetria do ultrassom terapêutico 25

3. OBJETIVOS 28

3.1 Objetivo geral 29
3.2 Objetivo especifico 29

4. MÉTODOS 30

4.1 Aspectos Éticos 31
4.2 Animais 31
4.3 Modelo experimental 32

4.4 Técnica operatória 32
4.5 Protocolo de Tratamento 34
4.6 Preparação e analise das lâminas histológicas 35
4.7 Análise estatística 37

5. RESULTADOS 38

6. DISCUSSÃO 41

7. CONCLUSÕES 47

8. REFERÊNCIAS 49

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

CO_2	Dióxido de carbono
cm	Centimetro
EGF	Fator de crescimento epidermal *(Epidermal Growth Factor)*
ERA	área de radiação efetiva
FGF2	Fator de crescimento básico dos fibroblastos 2 *(Fibroblast Growth Factor 2)*
FGFβ	Fator de crescimento básico dos fibroblastos beta *(Fibroblast Growth Factor Beta)*
Hz	Hertz
KHz	Quilohertz (Kilohertz)
MHz	Megahertz
NGF	Fator de crescimento neural (*Neural Growth Factor)*
O_2	Oxigênio
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*)
RO	Retardo óptico
SATA	Média espacial e a média temporal (*Spatial Average Time Average)*
TGF-α	Fator de crescimento transformador alfa (*Transforming Growth Factor Alpha*)
US	Ultrassom
UST	Ultrassom terapêutico
W/cm²	Watts por centímetro quadrado

Lista de figuras

Figura 1 – Incisão longitudinal e exposição do tendão do calcâneo na face posterior do membro traseiro do rato 33

Figura 2 – Sutura da incisão cirúrgica com fio Náilon 4.0.....34

Figura 3 – Contensão e irradiação do tendão do calcâneo na face posterior do membro traseiro do rato.....35

Figura 4 – Imagens referentes à observação qualitativa da análise de birrefringência dos tendões de ratos tenotomizados.. 40

Gráfico 1 – Mediana e erro-padrão dos valores de RO nos grupos experimentais..39

Resumo

Farcic TS. *Efeitos de diferentes tempos de aplicação do ultrassom terapêutico no tratamento de tendão de ratos no processo de reparação tecidual* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes tempos de tratamento do ultrassom terapêutico na cicatrização de lesão tendínea. Quarenta ratos machos Wistar (300 ± 45g), dos quais 32 sofreram tenotomia do tendão do calcâneo, foram divididos em 5 grupos: grupo C, sem tenotomia e tratamento, grupo T, com tenotomia e sem tratamento, US1,US2 e US3 submetidos à tenotomia e tratados com UST nos tempos de 1, 2 e 3 minutos por área de transdutor. Os animais foram mortos no 12º dia pós-operatório e os tendões retirados cirurgicamente para análise da organização das fibras colágenas utilizou-se o método de birrefringência (retardo óptico - OR). As fibras colágenas mostraram melhor agregação e organização no grupo US3 quando comparado ao grupo T ($p<0.05$). Conclui-se que o UST, aplicado no tempo de 3 minutos por área tratada, melhorou a organização das fibras colágenas no reparo tecidual de tendões de ratos.

Descritores: Tendão do Calcâneo/ Lesões; Terapia por Ultrassom/ Métodos; Cicatrização; Ratos.

Abstract

Farcic TS. *Effects of different times of application therapeutic ultrasound in the treatment of tendon rats in the process of tissue repair.* [dissertation]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011.

The aim of this study was to evaluate the effects of different treatment times of therapeutic ultrasound (US) on tendon injury healing. Forty male Wistar rats were selected (300 ± 45g) and 32, who underwent tenotomy of the Achilles tendon, were divided into five groups: Control, without tenotomy nor any treatment; tenotomy group, with tenotomy and without treatment; US groups (US1, US2, and US3), submitted to tenotomy and treated respectively with US for one, two, and three minutes per area of the transducer. The animals were sacrificed on the 12th post-operative day and the tendons were surgically removed for analyses of the collagen fiber organization by means of birefringence analyses, or optical retard. The collagen fibers showed better aggregation and organization in the US3 group, compared to the tenotomy group ($p<0.05$). The findings indicated that the US applied for three minutes per treated area improved the organization of the collagen fibers in the tendon repair of rats.

Descriptors: Achilles Tendon/ Injuries; Ultrasonic Therapy/ Methods; Wound Healing; Rats.

1. INTRODUÇÃO

Quando uma pessoa sofre alguma lesão tendínea, independente da atividade profissional que exerça, uma reabilitação rápida e eficiente é necessária.

Dentre diversas ferramentas terapêuticas que estão à sua disposição para tratar uma lesão tendínea, o Ultrassom Terapêutico (UST) é um recurso muito pesquisado e de grande uso na rotina dos profissionais da Fisioterapia. Há relatos que datam o início de sua utilização em 1950 (Bélanger, 2010). Estudar os efeitos terapêuticos deste recurso na fase de reparo tecidual pode auxiliar decisões clínicas dos fisioterapeutas relacionadas ao uso ou não deste recurso na melhoria do processo de reparação tecidual do tecido tendíneo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tendão

O tendão é um tecido conjuntivo denso e tem como função transmitir a força produzida pelo músculo para o esqueleto, tornando possível o movimento articular (Saini et al., 2002; Vidal, 2003; Junqueira; Carneiro, 2004).

Uma extremidade do tendão está ligada ao músculo, enquanto que a outra extremidade está aderida ao tecido fibroso que se une comumente ao osso (Hollenshead, 1990). A aparência normal do tendão é brilhante, branco e possui uma textura fibroelástica, demonstrando grande resistência a carga mecânica (Jozsa; Kannus, 1997; Khan et al., 1999).

Enwemeka e Reddy (2000), relatam que o tendão é constituído por fibroblastos e matriz extracelular, na qual estão imersas proteínas fibrosas de colágeno, elastina, proteoglicanas, glicoproteínas e mucopolissacarídeos. Sendo o colágeno o maior componente da matriz extracelular, compreendendo cerca de 86% a 95% do peso úmido do tendão. Nos tendões, as fibrilas e fibras são altamente alinhadas, o que confere alta resistência mecânica para forças de tração (Vidal, 2003).

2.1.1 Colágeno

O colágeno é uma proteína que corresponde a 30% do peso corporal do ser humano (Mayne, 1984). Segundo Parizotto (1998) o colágeno compõe a matriz extracelular dos animais, com cerca de 19 tipos distintos de colágeno,

todos com características individuais que determinam as funções específicas dos diversos tecidos.

O colágeno tipo I corresponde a 90% do total de colágeno do corpo dos mamíferos e é encontrado com maior freqüência em estrutura como: tendões, ligamentos, derme (Mimni; Harkness, 1988). Este tipo de colágeno possui alta resistência a força tênsil com elasticidade limitada, demonstrando boa capacidade para transmitir força (Mimni; Harkness, 1988; Jozsa; Kannus, 1997; Culav et al., 1999). O colágeno tipo I é sintetizado principalmente pelos fibroblastos, porem células como mastócitos e macrófagos também podem sintetizá-lo (Chan et al., 1997; Jozsa; Kannus, 1997).

As fibras de colágeno formam feixes orientados em grupos, paralelos ao eixo longitudinal do tendão, no entanto exibe vários graus de inclinação com relação ao eixo principal do colágeno, demonstrando uma distribuição helicoidal desta estrutura (Vidal, 1995).

De acordo com Vidal (1994), as forças que agem sobre o arranjo da molécula de colágeno influenciam a organização padrão das fibras no processo estrutural. O arranjo e a organização estrutural intrínseca contem as características físico-químicas para transmitir sinais (piezoelétrico) para as células.

2.1.2 Revestimento do tendão

No tendão existe um tecido conjuntivo denso que o circunda denominado paratendão, tendo como função possibilitar a movimentação do

tendão em relação às estruturas adjacentes. Abaixo do paratendão uma fina bainha de tecido conjuntivo chamado epitendão circunda o tendão enquanto que o Endotendão circunda os feixes de colágeno mais internos do tendão (Jozsa; Kannus, 1997; Khan et al., 1999).

2.2 Tendão do calcâneo

O tendão do calcâneo consiste de fibras de colágeno orientadas no eixo longitudinal do tendão contendo poucos fibroblastos intercalados entre os feixes (Enwemeka, 1989). Sua origem deriva da continuação e união do músculo gastrocnêmio e sóleo, tendo uma dimensão maior em sua origem e tornando-se mais estreito e irregular distalmente; onde se insere na porção média posterior do osso calcâneo.

Quando aproximadamente 2% do tendão é estirado perde-se a morfologia ondulada encontrada no estado de repouso das fibras de colágeno (Jozsa; Kannus, 1997; Plapler et al., 2001).

2.3 Ruptura do tendão do calcâneo

As rupturas do tendão do calcâneo são descritas há muitos anos. Cetti et al. (1993), descreve que em 1575 Embroise Paré relatou que a ruptura do tendão do calcâneo recebeu muita atenção por vários pesquisadores. Está indagação é baseada no fato de que a ruptura do tendão do calcâneo é uma lesão grave e uma das mais comuns entre as lesões tendíneas (Stehno-Bittel et al., 1998).

As lesões do tendão do calcâneo acometem em maior escala os atletas, principalmente aqueles praticantes de esportes de impacto como saltos e corridas. Estas práticas esportivas geram no tendão um estresse durante a contração muscular do gastrocnêmio e sóleo (Reynolds; Worrell, 1991).

Os atletas mais acometidos com ruptura do tendão de calcâneo são os futebolistas e com menor incidência os tenistas e bailarinos (Salomäo et al., 1993). Soma e Mandelbaum (1995), relatam que 75% dos atletas que sofreram ruptura do tendão do calcâneo estão entre 30 e 40 anos de idade, isto se deve pela degeneração do colágeno, que ocorre com o avanço da idade, provocando mudanças biomecânicas no tendão. Alem da degeneração do colágeno, podemos notar aumento da quantidade de fibras colágenas e diminuição das fibras de elastina e proteoglicanas da matriz extracelular, terminando com a perda da elasticidade do tecido, também é possíveis notar uma diminuição da renovação das fibras de colágeno e hidratação do tecido (Kannus; Jozsa, 1991).

A sobrecarga de trabalho sobre o tecido tendíneo leva-o à fadiga e como conseqüência há uma reação inflamatória com ruptura parcial ou total do tendão (Soma; Mandelbaum, 1995; Stehno-Bittel et al., 1998). A ruptura do tendão também pode ser precedida por alterações degenerativas onde há redução do fluxo sanguíneo para o tendão com resultado da hipóxia local. Alterações nutricionais e metabólicas podem predispor essas alterações (Salomäo et al., 1993; Almekinders; Deol, 1999).

2.4 Reparação tecidual da lesão tendínea

O tecido músculo esquelético é um complexo dinâmico com alta capacidade de adaptação frente a estímulos fisiológicos, como por exemplo, treinamento físico ou lesões severas (Artilheiro et al., 2010).

O processo de cicatrização das lesões tendíneas pode levar meses para se completar, durante esse período de recuperação, geralmente o paciente é imobilizado para evitar inúmeras complicações funcionais que podem retardar o processo de reabilitação (Enwemeka; Reddy, 2000). As lesões nos tendões podem ser rupturas completas ou incompletas, onde essas desordens levam a alterações na locomoção (Saini et al., 2002). A fase inicial do processo de reparo dura de 7 a 10 dias (Soma; Mandelbaum, 1995).

Devido sua baixa vascularização, oxigenação e nutrição, o tecido tendíneo possui baixa capacidade de reparação. No entanto quando o tecido é submetido a tratamento por meio de agentes biofísicos adequados esta cicatrização torna-se ideal (Parizotto, 1998).

A reparação tecidual acontece em 3 fases distintas, porém sobrepostas: Fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento (Enwemeka, 1989; Jozsa; Kannus, 1997). Para o tendão é essencial a fase proliferativa e de remodelamento, isso se deve pela intensa proliferação celular (fibroblastos); síntese de fibrilas de colágeno e alinhamento das fibras no eixo longitudinal do tendão (Enwemeka, 1989).

2.4.1 Fase inflamatória

A fase inflamatória é um pré-requisito para que o processo de reparo aconteça. Por isso é a resposta inicial e natural que acontece imediatamente após a lesão. O estágio inicial da inflamação é caracterizado por alterações vasoativas que promovem exsudação de fagócitos do sangue para a margem da lesão (Pereira, 1994; Jozsa; Kannus, 1997). Também imediatamente após a lesão são secretados fatores quimiotáticos como a norepinefrina e serotonina, promovendo vasoconstrição dentro dos primeiros 5 a 10 minutos (Gogia, 1995).

Simultaneamente, as plaquetas agregam-se ao redor do epitélio dos vasos lesados e ao colágeno exposto, excretando fosfolipídeos que estimulam o mecanismo de coagulação. Fibrinas e fibronectinas formam ligações transversas com o colágeno, o que resulta em uma estrutura para estancar o sangramento local e resistir às forças de tensão durante o período inicial de reparo (Jozsa; Kannus, 1997).

Aproximadamente no 3° dia pós-lesão os fibroblastos iniciam a produção de fibrilas que se agregam ao acaso no espaço extracelular, este acontecimento de certa forma colabora para proteger o tecido tendíneo contra as forças aplicadas no início da cicatrização (Enwemeka et al., 1988).

Na maior parte da fase de reparo os macrófagos estão presentes. Além de fagocitarem o sangue extravasado e os produtos da destruição tecidual que não foram solubilizados pelos neutrófilos, eles fagocitam os neutrófilos mortos restantes na área da lesão. Estas células também são responsáveis pela liberação de fatores de crescimento e fibronectina, os quais promovem

quimiotaxia dos fibroblastos, fixação e migração destas células no local da lesão, estimulando a sua proliferação. Os macrófagos e fibroblastos interagem um com o outro regulando a fase inflamatória e o processo de remodelamento da matriz extracelular (Kakar et al., 1998).

As células inflamatórias atuam principalmente na remoção de tecido necrótico e microorganismos localizados na área lesada. Quando o objetivo é alcançado por volta do 5° ao 7° dia pós-lesão, inicia-se a fase proliferativa (Jozsa; Kannus, 1997).

2.4.2 Fase proliferativa

Pereira (1994) e Józsa e Kannus (1997) relatam que a fase proliferativa inicia-se com a chegada de fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais na área lesada. A migração e a proliferação destas células são estimuladas por fatores de crescimento liberados pelas plaquetas e macrófagos teciduais. A estimulação dos fibroblastos acontece por substâncias liberadas por meio das plaquetas e dos macrófagos, que promovem seu crescimento, acompanham a retração vascular no processo de reparo tecidual e são responsáveis pela síntese de colágeno, e sua deposição (Maxwell, 1992).

A neoangiogênese inicia-se por anastomose de capilares sanguíneos próximos à área lesada, esses por sua vez se projetam para o interior da lesão formando inúmeras ramificações e desenvolvendo uma rica rede vascular. A neovascularização é essencial para que o processo de reparação ocorra, pois garante um abundante suporte de oxigênio (O_2) e

nutrientes para área lesada, removendo dióxido de carbono (CO_2) e outros metabólicos (Enwemeka, 1989).

Os fatores que promovem angiogênese na fase proliferativa são: prostaglandina, fatores de crescimento macrofágico, leucócitos, linfócitos T, fator de crescimento básico dos fibroblastos (FGFβ) e o fator de crescimento epidermal (EGF) (Enwemeka; Spielholz, 1992; Chang et al., 1998). Gilberman et al. (1985) relatam o aparecimento de novos vasos sanguíneos em tendões lesados aproximadamente no 7° dia após lesão.

O fator de crescimento fibroblástico (FGFβ e FGF2) está envolvido na cicatrização por regular a proliferação dos fibroblastos e a síntese de colágeno, induzir ativadores plasmogênicos e colagenases no remodelamento do tendão e facilitar a migração e proliferação de células endoteliais na angiogênese (Chan et al., 1997). Parizotto (1998) relata diversos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas que possuem função essencial na proliferação de celulas e matriz extracelular. Alguns já são conhecidos como fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF-α), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento neural (NGF).

O deposito de colágeno aumenta progressivamente com o tempo, atingindo seu pico por volta do 14° dia após lesão. Neste período o colágeno tipo I começa a predominar sobre o tipo III (Enwemeka; Spielholz, 1992). O alinhamento das fibras de colágeno no eixo longitudinal do tendão ocorre após um período de 21 dias de reparo tecidual.

A carga mecânica imposta ao tecido acelera o alinhamento das fibras de colágeno (Enwemeka et al., 1988).

2.4.3 Fase de remodelamento

O processo de remodelamento inicia-se por volta da 2° semana de cicatrização e se estende por um período de um ano ou mais. Acredita-se que o tendão lesado leva cerca de 4 a 12 meses para alcançar uma boa força tensiva, porém este tecido jamais conseguirá atingir a morfologia e função biomecânica de um tendão normal (Jozsa; Kannus, 1997).

Nesta fase os fibroblastos possuem formas alongadas permanecendo entre os feixes de colágeno que por sua vez encontram organizados no eixo longitudinal do tendão (Enwemeka, 1989).

O aumento da resistência do tecido lesado ocorre pelo remodelamento do colágeno, principalmente pelo aumento do colágeno tipo I e pelo aumento das ligações cruzadas entre as moléculas (Pereira, 1994; Jozsa; Kannus, 1997). A maturação do colágeno e o realinhamento linear são normalmente vistos por volta do 5° ao 6° mês após a lesão (Jozsa; Kannus, 1997).

Por volta de 60 dias as fibras de colágeno são compactas e espessas. Quando a cicatriz encontra-se completamente madura cerca de 3% de seus elementos são celulas (fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos) e o restante é composto por colágeno (Enwemeka; Spielholz, 1992).

Enwemeka e Spielholz (1992) demonstraram em seu experimento que tendões tenotomizados submetidos à carga funcional no 5° dia pós-lesão,

tiveram uma maior área de secção transversa em relação aos tendões controles que não foram submetidos à carga, isso se deve pela maior quantidade de fibras de colágeno organizadas no eixo longitudinal do tendão.

2.5 Recursos terapêuticos para o tratamento das lesões tendíneas

Devido à alta incidência destas lesões, torna-se necessária a elaboração de estudos com o objetivo de melhorar o reparo tendíneo, reduzindo o tempo de recuperação e o retorno às atividades rotineiras (Saini et al., 2002; Arruda et al., 2007). Pesquisadores têm estudado modalidades terapêuticas não farmacológicas, com o objetivo de acelerar o processo de reparação tecidual, tais como: ultrassom terapêutico e laserterapia de baixa intensidade (Enwemeka; Reddy, 2000; Saini et al., 2002; Carvalho et al., 2006; Wood et al., 2010; Neves et al., 2011).

2.6 Terapia por Ultrassom

O ultrassom (US) é um som e todas as formas de som consistem de ondas que transmitem energia por compressão e rarefação. A audição humana consegue captar freqüências sonoras entre 16 Hz e 20 Hz, com isso, é denominado US o som com freqüências superiores à 20 KHz (Bisschop et al., 2001; Starkey, 2001).

Em sua maioria, os equipamentos de UST apresentam freqüências entre 0,7 e 3,3 MHz para maximizar a absorção de energia em profundidades de 2

a 5 cm de tecido mole. No Brasil, a maioria dos equipamentos possuem freqüências de 1 e 3 MHz (Ziskin et al., 1999).

O UST foi desenvolvido na década de 1950, e tem sido utilizado no tratamento de lesões musculoesqueléticas por diferentes profissionais com ótimos resultados, enfatizando os tecidos que possuem uma alta taxa de fibras colágenas (Johns, 2002; Saini et al., 2002; Kitchen, 2003; Blume et al., 2005; Larsen et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Monte-Raso et al., 2006; Wong et al., 2007; Piedade et al., 2008; Artilheiro et al., 2010; Romano et al., 2010).

O UST é uma das modalidades eletrofísicas mais usadas nos atendimentos de fisioterapia (Robertson, 2002; Olsson et al., 2008; Schabrun et al., 2008).

Segundo levantamentos de Dyson (1987), na Austrália, mais de 90% dos fisioterapeutas tem acesso a uma unidade de US e 80% dos fisioterapeutas o utilizam diariamente. Em 1987 no Canadá mais de 4 milhões de tratamentos foram feitos com UST.

As ondas mecânicas do US viajam através dos materiais e gradualmente a sua intensidade vai diminuindo como resultado da atenuação. Existem diversos efeitos físicos contidos na terapia por USe estes podem ser classificados como térmicos e não-térmicos ou mecânicos. O aumento da temperatura dos tecidos é o efeito térmico. Correntes acústicas, micromassagem e cavitação, que podem alterar a permeabilidade das membranas e movimentação de fluidos correspondem aos efeitos não-térmicos.

Ultrassom é uma onda sonora de alta freqüência que pode ser descrita pela intensidade, modo de emissão, freqüência, ciclo de trabalho, freqüência de repetição, área de radiação efetiva e razão de não-uniformidade do feixe. Ele penetra o tecido biológico e é atenuado em decorrência da absorção, reflexão e refração que ocorrem de forma diferente nos diversos tecidos, ocorrendo com magnitude nos tecidos com grandes quantidades de colágeno. Quanto maior a freqüência de emissão das ondas ultrassonoras, maior será a atenuação (Nyborg; Ziskin, 1985).

O ultrassom em modo de emissão contínuo é geralmente usado para produzir efeitos térmicos, enquanto que em modo de emissão pulsado buscam-se os efeitos não-térmicos. Ambos os efeitos podem ser utilizados para se chegar mais rapidamente aos objetivos terapêuticos, desde que o US seja aplicado em patologias adequadas e no momento apropriado.

2.6.1 Produção de ultrassom

O US é gerado pela aplicação de corrente elétrica alternada de alta frequência a um cristal ou cerâmica de PZT (Chumbo, Zirconato e Titânio) presente no transdutor do equipamento de emissor de ultrassom. Este cristal é confeccionado por material que apresente propriedades piezoelétricas, ou seja, ele responderá expandindo-se e contraindo-se na mesma freqüência da corrente alterna. Quando o cristal expande, comprime o material em frente a ele e quando contrai, há a rarefação no material em questão. Esta alternância da compressão-rarefação é a onda ultrassônica (Guirro; Guirro, 1995).

Para que haja propagação dessas ondas ultrassônicas é necessário que o meio tenha propriedades elásticas. O movimento de um corpo vibrando é transmitido às moléculas adjacentes, as quais, antes de retornarem à posição de equilíbrio, transmitem esse movimento para as moléculas que estão ao seu redor (Martines et al., 2000; Olsson et al., 2008).

2.6.2 Efeitos da terapia por ultrassom

O US promove uma variedade de efeitos biofísicos. Ele pode aumentar a temperatura de tecidos superficiais e profundos e apresenta alguns efeitos não térmicos. Estes efeitos têm sido considerados separadamente, embora em algumas situações eles aconteçam simultaneamente (Bélanger, 2010).

As alterações fisiológicas do UST em tecidos biológicos são tradicionalmente agrupadas em duas classes: efeitos térmicos e efeitos mecânicos (não-térmicos). Ambos ocorrem no organismo, mas a proporção e a magnitude de cada um deles dependem do ciclo de fornecimento e da intensidade de saída (Draper et al., 1993; Starkey, 2001). Embora o US com emissão pulsada seja aplicado normalmente em ciclos de trabalho de 10%, 20% ou 50% e, com baixa intensidade, considerando a média espacial e a média temporal (SATA), o mesmo é capaz de produzir alterações irrelevantes de temperatura nos tecidos. Gallo et al. (2004) demonstraram que o US contínuo com uma intensidade de 0,5 W/cm² promoveu o mesmo aumento de temperatura no músculo gastrocnêmio de seres humanos (a 2 cm de profundidade) que o US pulsado com ciclo de trabalho de 50% e intensidade de 1 W/cm², ambos aplicados por 10 minutos e freqüência de 3

MHz. Neste estudo a intensidade SATA foi à mesma para as aplicações contínua e pulsada.

O US pulsado é caracterizado por pausas ou intervalos entre os ciclos de transmissão, minimizando os efeitos térmicos e maximizando o efeito mecânico da irradiação, do que resulta do aumento da síntese de colágeno, sendo 10% maior em relação ao US continuo com a mesma intensidade (Robinson; Snyder, 2001).

2.6.2.1 Efeitos térmicos

Harvey (1930) demonstrou que a irradiação com UST poderia promover aumento da temperatura tecidual. Pelo aquecimento tecidual, o US pode acelerar a taxa metabólica, reduzir ou controlar a dor e o espasmo muscular, alterar a velocidade de condução nervosa, aumentar o fluxo sanguíneo e aumentar a extensibilidade dos tecidos moles (Lehmann et al., 1967a; Lehmann et al., 1967b). Aquece preferencialmente tendões, ligamentos, cápsulas articulares e fáscia muscular, tendo em vista a grande quantidade de colágeno presente nestes tecidos.

Além do tipo de tecido e da freqüência de emissão do US, a intensidade e a duração do tratamento também influenciam no aquecimento tecidual (Cameron, 2009). A velocidade com que o transdutor é movido sobre a superfície corporal não gera tal influência, conforme foi demonstrado por (Weaver et al., 2006), que mantiveram os mesmos parâmetros de emissão do US (freqüência de 1 MHz, modo contínuo, intensidade de 1,5 W/cm^2,

durante 10 minutos), mas modificaram a velocidade de movimentação do transdutor entre os grupos avaliados.

O UST possibilita usar diferentes frequências, usualmente variando entre 1 e 3MHz. É importante notar que as freqüências mais altas (3MHz) são absorvidas mais intensamente, tornando-as mais específicas para o tratamento de tecidos superficiais, enquanto que as mais baixas (1MHz) penetram mais, devendo ser utilizadas para os tecidos mais profundos (Docker, 1987; Baker et al., 2001; Johns, 2002; Blume et al., 2005; Olsson et al., 2008). No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a profundidade de penetração das diferentes frequências, uma vez que alguns estudos mostram resultados diferentes.

Em média, acredita-se que a temperatura de tecidos moles *in vivo* aumente cerca de 0,2ºC por minuto, sob a irradiação com oferta de 1 W/cm² de intensidade de US, à 1 MHz. Este aquecimento não é uniforme, tendo em vista que há variações na emissão da intensidade do ultrassom, diferentes tipos de tecidos com diferentes coeficientes de atenuação, diferentes áreas clínicas a serem tratadas e reflexões entre as superfícies de tecidos vizinhos. As maiores temperaturas são geradas nas interfaces teciduais, onde a reflexão é maior. Mover o transdutor durante o tratamento auxilia na equalização da distribuição do calor e minimiza o surgimento de áreas excessivamente quentes ou frias (Cameron, 2009).

Se a intensidade utilizada for muito alta, o paciente poderá se queixar de dor profunda, proveniente do superaquecimento do periósteo. Por isso,

nestas situações, orienta-se que seja diminuída a intensidade aplicada para reduzir os riscos de queimaduras.

2.6.2.2 Efeitos não-térmicos do ultrassom

O US apresenta uma série de efeitos sobre os processos biológicos que não estão relacionados ao aquecimento tecidual. Estes efeitos são resultantes de efeitos mecânicos do ultrassom, incluindo cavitação, micromassagem e correntes acústicas. Quando o US é oferecido no modo pulsado (com ciclo de trabalho igual ou inferior a 20%), o aquecimento gerado durante a emissão das ondas é dissipado no momento de não emissão, resultando em alterações quase imperceptíveis da temperatura (Harle et al., 2001).

Tem-se demonstrado que o UST com baixa intensidade promove o aumento dos níveis de cálcio intracelulares (Mortimer; Dyson, 1988) e o aumento da permeabilidade da membrana celular (Dinno et al., 1989). Há estudos (Fyfe; Chahl, 1984) que mostram o aumento da degranulação dos mastócitos, com liberação de histamina e fatores quimiotáticos.

O uso do US tem sido associado também ao aumento da atividade macrofágica (Young; Dyson, 1990), aumento da síntese protéica por fibroblastos (Harvey et al., 1975) e células residentes em tendões (Tsai et al., 2006). O US de baixa intensidade tem demonstrado agir sobre o aumento da síntese de óxido nítrico em células endoteliais (Altland et al., 2004; Hsu; Huang, 2004), o aumento do fluxo sanguíneo em fraturas de cachorros (Rawool et al., 2003) e em músculo isquêmico de ratos. Além

disso, tem-se demonstrado o efeito deste recurso sobre o aumento da síntese de proteoglicanos pelos condrócitos (Miyamoto et al., 2005; Choi et al., 2006; Kopakkala-Tani et al., 2006; Min et al., 2006). Grande parte destas atividades justificam-se por aceleração do metabolismo celular (Starkey, 2001; Olsson et al., 2006; Artilheiro et al., 2010).

Todos estes efeitos têm sido encontrados com o uso de US pulsado, cujo aumento de temperatura não é encontrado, portanto, considerados frutos dos efeitos mecânicos do US (cavitação, micromassagem e microcorrentezas acústicas) (Kopakkala-Tani et al., 2006). As maiores mudanças nos níveis de cálcio intracelular estão relacionados ao US pulsado à 20% de ciclo de trabalho e intensidades entre 0,5 e 0,75 W/cm² (Mortimer; Dyson, 1988).

As respostas dos níveis de atividade celular e do sistema vascular ao US são importantes para o processo de reparação tecidual. O aumento dos níveis de cálcio intracelular pode alterar a atividade enzimática das células e estimular a síntese de proteínas, incluindo proteoglicanos, pois os íons cálcio agem como sinalizadores químicos (segundo mensageiro) para as células. A vasodilatação devido à liberação de óxido nítrico e o consequente aumento do fluxo sanguíneo podem acelerar o processo de reparação pela oferta de nutrientes essenciais para a região (Cameron, 2009). A ação do US sobre a resposta macrofágica pode explicar sua utilidade no processo inflamatório, já que estas são as células dominantes nesta fase do processo de reparação tecidual, assim como pelo aumento da permeabilidade das membranas celulares.

2.6.3 Estudos sobre a terapia por ultrassom em lesão tendínea

Ng et al. (2003) realizou um experimento com o objetivo de analisar a melhora das propriedades estruturais e a performance dos tendões do calcâneo de ratos após hemisecção durante o processo de reparação tecidual. Utilizou 30 ratos submetidos à cirurgia de hemisecção do tendão do calcâneo, divididos em 3 grupos. 10 ratos foram tratados diariamente com UST na freqüência de 1 MHz, intensidade de 1,0 W/cm² com emissão contínua por 4 minutos, 11 ratos foram tratados com intensidade de 2,0 W/cm² durante 4 minutos e 9 ratos utilizados como grupo controle, ou seja, sem tratamento. Após 30 dias de tratamento os animais foram mortos e os tendões submetidos a teste de carga-relaxamento, estiramento e força de tensão. Os resultados demonstraram que ambas as doses melhoraram o reparo tecidual do tendão do calcâneo.

da Cunha et al. (2001) teve como objetivo em sua pesquisa analisar a reparação tecidual dos ratos submetidos a tenotomia do tendão do calcâneo e tratados com UST na freqüência de 1 MHz, intensidade de 0,5 W/cm² tratados por 5 minutos durante 14 dias consecutivos no modo contínuo e pulsado (20 %). No décimo quinto dia após a cirurgia os animais foram mortos e os tendões retirados para análise no microscópio de luz polarizada, com o objetivo de mensurar a organização das fibras de colágeno por meio da análise de birrefringência. Os resultados sugerem que o UST com emissão pulsada é benéfico na melhora do processo de reparação tecidual

do tendão de rato, entretanto, o grupo tratado com emissão contínua demonstra retardo no processo de reparação tecidual.

Ng e Fung (2007), estudaram os efeitos de diferentes intensidades do UST na morfologia ultra-estrutural do tendão do calcâneo de ratos no processo de reparação tecidual, para isso os animais foram divididos em 4 grupos, tratados com 0, 0,5 W/cm², 1,2 W/cm² e 2,0 W/cm² no modo de emissão contínua com freqüência de 1 MHz. Os resultados demonstraram que o UST aumenta a maturação das fibras de colágeno no processo de reparação tecidual e que isso não depende da intensidade aplicada.

Koeke et al. (2005), estudou a eficácia da aplicação tópica de hidrocortisona 10 % introduzida por meio de fonoforese comparada ao UST na reparação tecidual de tendão de rato submetido a tenotomia total. Os animais foram tratados durante 10 dias com freqüência do equipamento de 1 MHz, emissão pulsada (20 %), intensidade de 0,5 W/cm². Pelo método de analise de birrefringência conclui-se que a emissão pulsada de 20 % demonstra ser um método eficiente para promover organização estrutural das fibras de colágeno e o processo de reparação tecidual foi acelerado por um provável biomodulação da inflamação, promovendo uma maior síntese de colágeno por estimulação da proliferação dos fibroblastos. O UST promove penetração da concentração de hidrocortisona 10 % pois o grupo tratado com fonoforese obteve o melhor resultado na analise de birrefringência.

Ng et al. (2003), comparou a utilização do UST e exercício na reparação do tendão do calcâneo após transecção cirúrgica. Os animais

foram divididos em 5 grupos: Grupo controle, grupo tratado com UST na intensidade de 1 W/cm² durante 4 minutos, grupo tratado com UST na intensidade de 2 W/cm² durante 4 minutos, grupo tratado com corrida e grupo tratado com natação. Após os 30 dias de tratamento os animais foram mortos e os tendões submetidos ao teste biomecânico. Os resultados demonstram que o grupo tratado com UST com intensidade de 2,0 W/cm² e exercício de corrida promove aumento da força do tendão reparado.

Carvalho et al. (2006), avaliou o efeito do UST na reparação tendínea em ratos desnutridos. Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo controle, grupo de animais desnutridos tratado com UST com freqüência de 3 MHz e intensidade de 0,5 W/cm² e emissão pulsada a 20 % e grupo de animais com nutrição normal tratados com UST com freqüência de 3 MHz e intensidade de 0,5 W/cm² e emissão pulsada a 20 %. Os animais foram submetidos a procedimento operatório para esmagamento do tendão do calcâneo. O UST mostrou-se eficaz no reparo tendíneo, mesmo nos animais desnutridos e com processo de cicatrização retardado.

Frasson et al. (2009), verificou a microestrutura do tendão calcâneo sob o efeito do UST com modo de emissão pulsado em duas intensidades diferentes. Os animais do grupo controle não receberam tratamento; o grupo 1 foi submetido ao UST com freqüência de 1 MHz e pulsado (20%), com área de radiação efetiva de 1,0 cm² e intensidade média instantânea de 0,3 W/cm²; o grupo 2 recebeu UST nos mesmos parâmetros, mas com intensidade de 1,5 W/cm²; no grupo 3, placebo, foi aplicado tratamento simulado (ultrassom desligado). Nos três grupos, o tratamento consistiu em

uma sessão diária de 5 minutos, por um período de 10 dias. No 11° dia pós-operatório os tendões foram removidos para análise qualitativa e quantitativa, por meio de microscopia de luz polarizada, de luz e força atômica. As análises qualitativas foram coincidentes, mostrando melhor organização, agregação e orientação das fibras de colágeno no grupo 1 quando comparado ao grupo controle, 2 e 3. A análise quantitativa apresentou contagens médias de 400,7 fibroblastos e 2,22 capilares sangüíneos por campo de análise, não encontrou diferença significativa entre os grupos. Conclui-se que o processo de regeneração tendínea em ratos pode ser beneficiado pelo tratamento com UST pulsado em baixa intensidade, mais especificamente na intensidade de 0,3 W/cm².

Romano et al. (2010), investigou as propriedades mecânicas de tendões flexores profundos de coelhos submetidos à tenotomia seguida de tenorrafia e tratados com UST com diferentes intensidades, em comparação com tendões submetidos somente ao procedimento cirúrgico. Amostra constituiu de quarenta e quatro coelhos divididos em quatro grupos experimentais. O grupo A recebeu tratamento ultra-sônico com uma intensidade de 1,4 W/cm², o grupo B com 0,6 W/cm², ambos no modo contínuo, o grupo C com 0,6 W/cm², no modo pulsado a 50% e o grupo D não recebeu tratamento ultra-sônico. A frequência ultra-sônica empregada foi de 1 MHz. Após a morte dos animais os tendões foram dissecados e submetidos ao ensaio mecânico de tração e análise histológica qualitativa. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais, com isso, concluiu que o UST não melhorou as propriedades mecânicas dos

tendões flexores após reparo, porem o autor relata que pode existir alterações na reparação tendínea devido a imobilização inadequada.

Saini et al. (2002), realizou procedimento cirúrgico de tenorrafia no tendão do calcâneo de 5 cães normais em seguida foram imobilizados. O grupo I composto por 2 animais foi submetidos a cirurgia, porem os animais não foram tratados, já o grupo II foi submetido ao procedimento cirúrgico e tratado com UST aplicado após o trigésimo dia de pós operatório sendo tratados por 10 dias consecutivos na intensidade de 0,5 W/cm² durante 10 minutos. Os autores concluíram que a utilização da imobilização e tratamento com UST promove melhora na reparação tecidual de tendão do calcâneo de cães. Os resultados obtidos foram por meio de ultrassonográfia e analise histológica.

Silva et al. (2010), estudou a ação do UST em tendinite experimental por análises histomorfométrica e histopatológica. A amostra constituiu de vinte e cinco ratos Wistar divididos em três grupos experimentais (7 e 14 dias): A7 e A14, tendinite induzida sem tratamento; B7 e B14, tendinite induzida, tratada com US em emissão pulsado (10%), freqüência de 1 MHz com intensidade de 0, 5 W/cm², e o grupo C sem indução de tendinite. A histologia e a histomorfometria demonstraram qualitativa e quantitativamente, um aumento do número de fibroblastos, em sete dias, e das fibras de colágeno, em 14 dias, para o grupo tratado com UST em relação ao grupo não tratado.

2.6.4 Dosimetria do ultrassom terapêutico

Os estudos sobre a eficiência do UST mostram que não há definição sobre a dosimetria correta para sua utilização, principalmente relacionada à dose-resposta do tratamento realizado (Robertson, 2002; Warden; McMeeken, 2002; Vidal, 2003; Artilheiro et al., 2010). A maioria dos profissionais justifica a dosimetria utilizada com base na sua experiência clínica (Robertson, 2002; Blume et al., 2005; Franco et al., 2005; Olsson et al., 2008).

A relação dose-resposta na aplicação terapêutica do US é influenciada por inúmeras variáveis como frequência, intensidade, tempo de irradiação, modo de aplicação, tipo e técnica de acoplamento, início da aplicação pós-lesão entre outros (Draper et al., 1995; Casarotto et al., 2004; Fu et al., 2008). van der Windt et al. (1999) em revisão sistemática sobre a efetividade do US em lesões musculoesqueléticas não encontrou evidências sobre a efetitivade deste recurso. Warden and McMeeken (2002) concluiram em sua pesquisa que o UST é frequentemente utilizado pelos fisioterapeutas na reabilitação esportiva, porém não existem evidências que suportem a dosimetria utilizada por eles. Robertson (2002) analisou a relação dose-resposta em tratamentos clínicos randomizados em US e não encontrou uma janela terapêutica de dose para a utilização clínica do ultrassom. Embora alguns estudos apontem para uma janela terapêutica na faixa de 0.16 a 0.5 W/cm², quando observamos outras variáveis, como frequência, tempo de tratamento, tipo e profundidade da lesão, área de radiação efetiva (ERA) e tamanho da área tratada, verifica-se que a comparação entre estes parâmetros não é possivel pelo pequeno número de pesquisa que utilizam

as mesmas variáveis. Estas considerações são corroboradas no trabalho de Speed (2001), que aponta para um abandono do uso deste recurso devido à falta de evidências.

O tempo de aplicação do UST tem uma influência na quantidade de energia aplicada ao tecido que é calculada pela formula: Energia (Joule) = Potencia (Watts) X Tempo (segundos) (Alexander et al., 2010). O tempo de tratamento é uma variavel pouco estudada na terapia com US. A relação entre o tempo de aplicação e a área de tratamento é descrita por Oakley (1978). Ele propõe que cada área de $1^1/_2$ tamanho do transdutor deve ser tratada de 1 a 2 minutos e para cada área adjacente do transdutor deve somar de 1 a $1^1/_2$ minuto, porém está relação não está embasada ou justificada em sua publicação. Por outro lado, Olsson et al. (2008) concluem, em sua revisão, que não existe uma definição sobre o tempo de tratamento na aplicação do UST.

A maioria dos autores conclui que a literatura ainda não traz uma definição sobre a dosimetria correta da utilização do UST, e principalmente a relação entre a dose e a resposta ao tratamento, necessitando mais pesquisas nesta área, para determinar parâmetros mais específicos (Robertson, 2002; Vidal, 2003; Blume et al., 2005; Franco et al., 2005; Monte-Raso et al., 2006; Olsson et al., 2006; Artilheiro et al., 2010). A maioria dos profissionais justifica a dosimetria utilizada na experiência clínica (Robertson, 2002; Blume et al., 2005; Franco et al., 2005; Olsson et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes tempos de tratamento do UST na cicatrização de lesão tendínea de ratos.

3.2 Objetivo especifico

Avaliar a reparação tecidual por meio do método de birrefringência de tendão de ratos após tenotomia total tratados com diferentes tempos de aplicação.

4. MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, número do protocolo 065/11. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa Experimental do Instituto de Ciência da Saúde da Universidade Paulista (UNIP), Campus Indianópolis – São Paulo e obedeceram as Normas Éticas para Experimentação Animal do Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL-COBEA) e a legislação nacional atual sobre Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Federal 11.794, de 9 de outubro de 2008).

4.2 Animais

Quarenta ratos machos da linhagem Wistar – EPM 1 foram utilizados neste estudo (peso: 300 ± 45g; idade: 90 dias). Os animais foram mantidos em ambiente controlado, com temperatura de 25°C e ciclo claro/escuro de 12 horas, com alimentação balanceada para roedores e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de 8 ratos. O número de animais necessários para alcançar significância estatística foi baseado nas pesquisas de Eckelman et al. (2007) e Damy et al. (2010).

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo controle (C) – Animais não submetidos a procedimento cirúrgico e nem tratados com UST.

Grupo tenotomizado (T) – Animais submetidos à tenotomia do tendão do calcâneo e não tratado com UST.

Grupo US1 – Animais tenotomizados tratados com UST com 1 minuto por área do transdutor, totalizando 2 minutos de tratamento.

Grupo US2 – Animais tenotomizados tratados com UST com 2 minutos por área do transdutor, totalizando 4 minutos de tratamento.

Grupo US3 – Animais tenotomizados tratados com UST com 3 minutos por área do transdutor, totalizando 6 minutos de tratamento.

4.3 Modelo experimental

O modelo de tenotomia total da porção média do tendão do calcâneo (incisão transversal do tendão dissecado) utilizado neste estudo foi baseado nos experimentos de Carrinho et al. (2006), da Cunha et al. (2001), Enwemeka e Reddy (2000), Koeke et al. (2005) e Reddy et al. (2001).

4.4 Técnica operatória

Os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de Tiletamina e cloridrato de Zolazepam (Zoletil 50 da marca VIRBAC®), de uso veterinário, na dose de 25 mg/kg de peso corpóreo através de injeção intraperitoneal (Baldan et al., 2010). A face posterior da tíbia direita, local

correspondente ao tendão calcâneo dos animais foi epilada. Posteriormente, procedeu-se a assepsia do local com álcool 70% e em seguida a pele e o panículo carnoso foram submetidos à incisão longitudinal sobre o local correspondente ao terço médio do tendão calcâneo, expondo o mesmo para efetuar um corte transversal em seu terço médio, por meio de um bisturi lâmina 22 (Figura 1). Após a secção do tendão, a incisão foi totalmente fechada com sutura da derme através de um único ponto na região central, utilizando fio de Náilon 4.0 (Figura 2). No pós-operatório os animais receberam dose única intramuscular de Ceftriaxona no membro trazeiro contralateral, com objetivo de profilaxia antibiótica e em seguida foram colocados em gaiolas limpas, sem imobilização (da Cunha et al., 2001; Reddy et al., 2001; Koeke et al., 2005; Carrinho et al., 2006; Arruda et al., 2007). O tendão calcâneo direito foi submetido ao tratamento com UST nos grupos US1, US2 e US3.

Figura 1 – Incisão longitudinal e exposição do tendão do calcâneo na face posterior do membro traseiro do rato

Figura 2 – Sutura da incisão cirúrgica com fio Náilon 4.0

4.5 Protocolo de Tratamento

Para o experimento, utilizou-se um emissor de UST da marca BIOSET® modelo Sonacel. O desenho de seu transdutor, com área de 0,5 cm^2, foi modificado para adequá-lo à porção posterior do membro traseiro do rato e ao tamanho da lesão. O equipamento foi calibrado por meio de uma balança acústico modelo GT210 da marca Glutymax® e um osciloscópio da marca Intermetro®.

Os animais foram submetidos à primeira aplicação do UST após 24 horas do procedimento cirúrgico. A irradiação ultrassônica apresentou os seguintes parâmetros: 1 MHz de frequência, modo pulsado de emissão com ciclo de trabalho de 20% (2 ms de emissão / 8 ms de intervalo), frequência de repetição de 100 Hz, intensidade de 0,5 W/cm² (*spatial average time average* - SATA), ERA de 0,5 cm², uma vez ao dia. A área tratada possuia o tamanho de 1 cm². Os animais foram mortos após a 10ª sessão de tratamento, no 12º dia pós-operatório. As irradiações ocorreram de forma

consecutiva, com um intervalo de um dia após o quinto dia de tratamento (Robertson, 2002; Saini et al., 2002; Koeke et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Bélanger, 2010).

Para o tratamento, o transdutor foi posicionado perpendicularmente a área tratada e utilizando a técnica de movimentação. Utilizou gel hidrossolúvel como agente acoplante, com objetivo de conduzir melhor suas ondas e auxiliar o deslizamento do transdutor sobre a pele do animal (Casarotto et al., 2004; Draper et al., 2010). Durante a aplicação os animais foram estabilizados por um contensor padronizado (Figura 3) (da Cunha et al., 2001; Koeke et al., 2005).

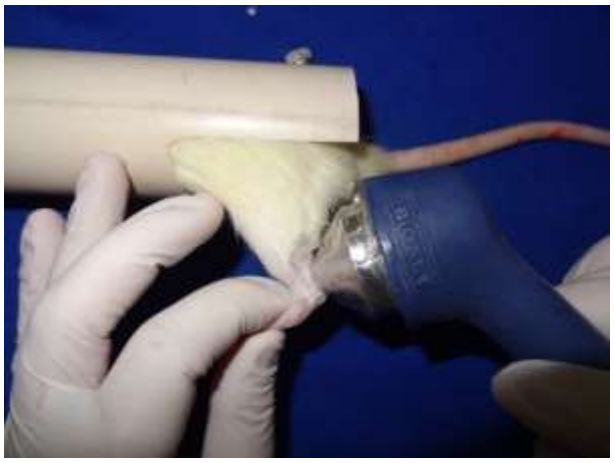


Figura 3 – Contensão e irradiação do tendão do calcâneo na face posterior do membro traseiro do rato.

4.6 Preparação e análise das lâminas histológicas

Os animais foram mortos pela permanência em câmara de CO_2; a seguir as áreas referentes à lesão nos tendões foram retiradas cirurgicamente. Para a avaliação quantitativa do reparo tendíneo, os tendões removidos

foram submetidos à fixação em formol 10% por 24 horas e, posteriormente, para desidratação passaram por quatro banhos em álcool de uma hora cada iniciando pela diluição de 50%, passando para 70%, 80% e 100%. Posteriormente as amostras foram banhadas em Xilol por uma hora e incluídas em parafina a 58 °C. Os blocos montados foram cortados longitudinalmente em cortes seriados através de um micrótomo da marca Laica®, com espessura padronizada de 7 µm. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro sem coloração, identificadas por um avaliador cego.

A propagação desigual da luz através de um objeto é a medida de birrefringência. Esta medida avalia a densidade e organização do material analisado e é utilizada para avaliar a organização e estrutura dos feixes de colágeno. A finalidade deste procedimento foi analisar a organização, estado de agregação e alinhamento das fibras de colágeno nos tendões por meio da medição da birrefringência (da Cunha et al., 2001; Vidal, 2003; Carrinho et al., 2006). As lâminas de cada grupo foram imersas em água destilada cujo índice de refração é de η = 1,333, por 30 minutos, para análise de birrefringência. O retardo óptico (RO) foi medido utilizando um microscópio de luz polarizada da marca LEICA® com uma objetiva pol.10X/0,22, condensador 0.9, compensador de Sénarmont $\lambda/4$, luz monocromática λ= 546 nm, obtida por meio de um filtro de interferência LEICA®, do LAMAV (Laboratório de Materiais Vítreos do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar). Esse tipo de análise tem sido utilizado para mensurar o grau de organização das fibras colágenas de forma quantitativa em diversos estudos. As medidas resultantes em graus foram transformadas em

nanometro (nm) multiplicando-se os graus por 3.03. O total de birrefringência das fibras de colágeno foi medido após embebição em água destilada. Para realizar as medições ao longo do eixo do tendão, o eixo longitudinal das fibras de colágeno foi orientado a 45° da direção de propagação da luz de transmissão. Nesta posição, as fibras de colágeno apresentam o maior RO. As medidas foram feitas em cinco diferentes pontos da área central dos tendões que correspondem à área da lesão (da Cunha et al., 2001; Vidal, 2003; Koeke et al., 2005; Carrinho et al., 2006; Arruda et al., 2007). Os dados de birrefringência foram colhidos por dois avaliadores previamente treinados, independentes e cegos.

4.7 Análise estatística

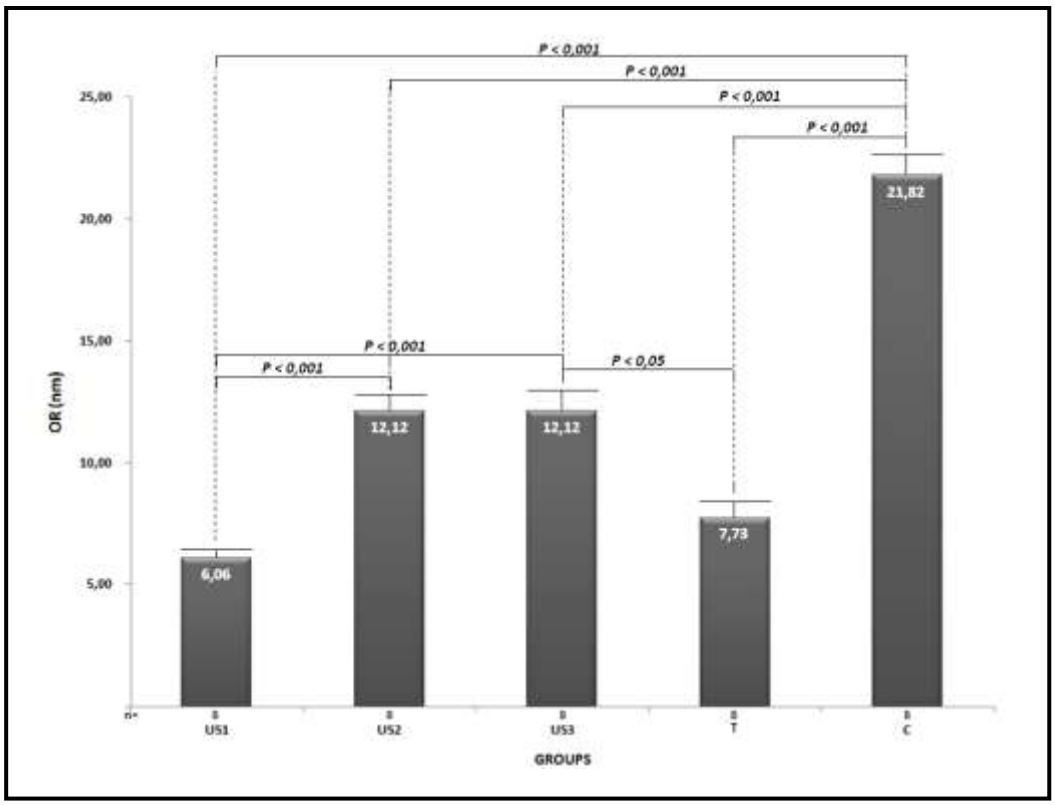
A distribuição normal dos dados foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). Como os dados não apresentaram distribuição gaussiana, os mesmos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e em seguida, ao teste de comparações múltiplas de Dunn.

5. RESULTADOS

A seguir, são apresentados os dados referentes aos ROs de 5 áreas diferentes de cada região da lesão.

O teste de Kruskal-Wallis evidenciou a existência de diferença estatisticamente significante entre os grupos (*P*< 0,0001). A comparação entre os grupos foi realizada pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn, que revelou diferenças estatisticamente significativas ao se compararem os dados de ROs entre os grupos US1xUS2, US1xUS3, US1xC, US2xC, US3xT e CxT (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Mediana e erro-padrão dos valores de RO nos grupos experimentais



Ao realizar a análise histológica qualitativa por meio da microscopia de luz polarizada é possível definir o padrão de normalidade com relação à

organização de fibras colágenas (Figura 4). Comparando-se as imagens da Figura 4, é possível observar que os animais do US3 apresentaram maior organização das fibras colágenas, quando comparadas aos demais grupos tratados (US1 e US2). É possível notar também que há desorganização das fibras colágenas nos animais dos grupos US1 e T.

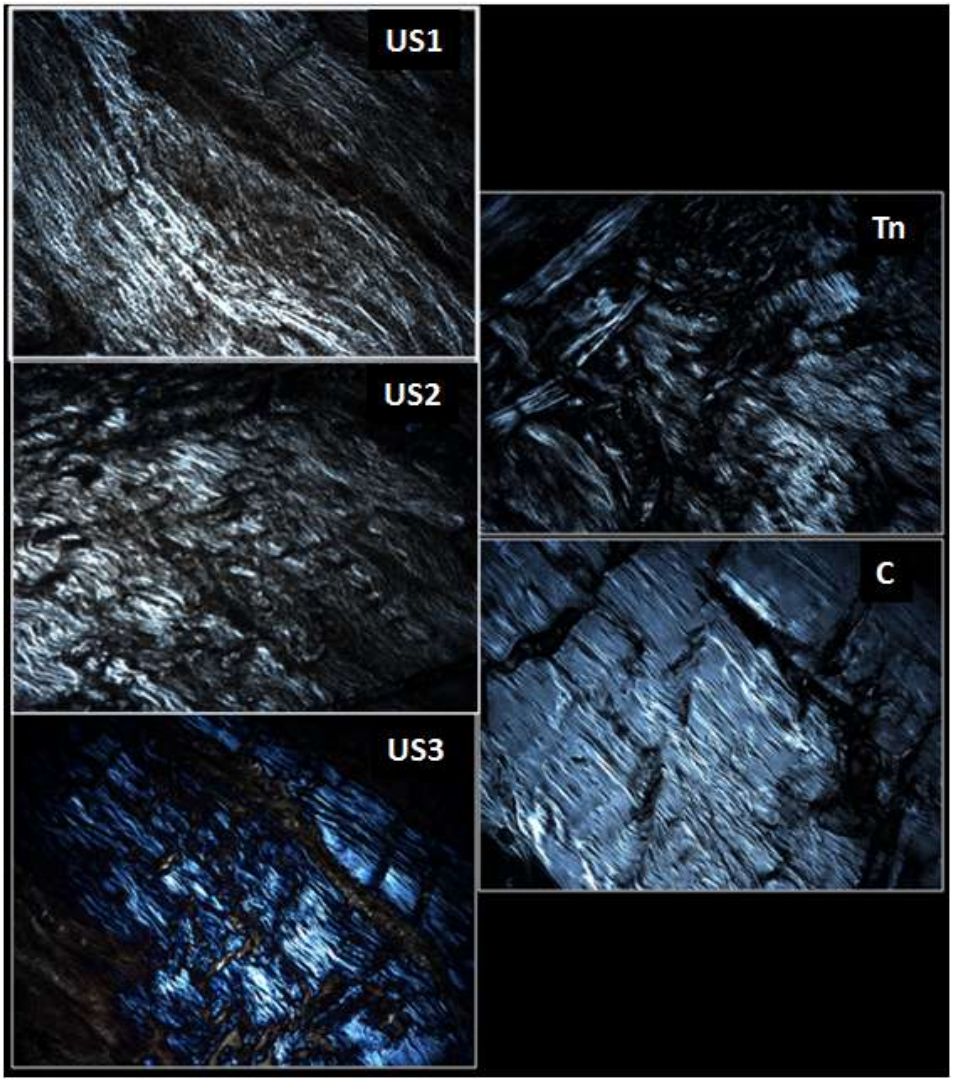


Figura 4 – Imagens referentes à observação qualitativa da análise de birrefringência dos tendões de ratos tenotomizados. Espécimes foram posicionadas com o eixo longitudinal dos tendões em 45º com a normal. Nas imagens US1, US2 e T é possível notar deficiência na organização das fibras colágenas. Na imagem US3 observa-se melhor organização do colágeno, em condições semelhantes as do grupo C.

6. DISCUSSÃO

O modelo experimental é essencial para adquirir resultados reprodutíveis. Portanto foi utilizado no presente estudo um modelo experimental induzido em tendão de calcâneo de ratos.

O rato é muito utilizado na avaliação da birrefringência nas fibras de colágeno do tendão (da Cunha et al., 2001; Koeke et al., 2005). A facilidade de obtenção em laboratório permite a eliminação de fatores individuais, como imunodeficiência de um animal, emprego de uma amostragem maior por grupos experimentais, obtenção de resultados em tempos mais curtos, devido seu metabolismo acelerado em relação aos outros animais. A seleção de animais machos se deve as alterações hormonais presentes nas ratas fêmeas.

O tendão do calcâneo foi utilizado neste experimento, devido à facilidade de acesso, pois é um tecido superficial e com uma forma anatômica mais ampla, o que reduz o trauma cirúrgico e permite facilidade na técnica experimental.

Os dados da literatura ainda não trazem uma definição sobre o tempo de tratamento do UST. A dose é a variável mais estudada pelos pesquisadores (Ng et al., 2003; Alexander et al., 2010) e há indicações que doses menores são mais efetivas para o reparo tecidual (Ng; Fung, 2007).

Os padrões dosimétricos utilizados nesta pesquisa são os mais utilizados nos estudos sobre o UST, exceto o tempo de tratamento que é a variável estudada. A intensidade de 0,5 W/cm² baseia-se na pesquisa de Cunha et al. (2001), Demir et al. (2004), Koeke et al. (2005), Carvalho et al. (2006), Silva et al. (2010), a forma de emissão ultrassônica pulsada deriva

das pesquisas de da Cunha et al. (2001), Blume et al. (2005), Koeke et al. (2005), Carvalho et al. (2006), Frasson et al. (2009), Bélanger (2010). A frequência do equipamento justifica-se através dos experimentos de da Cunha et al. (2001), Koeke et al. (2005), Carvalho et al. (2006), Piedade et al. (2008).

A duração do tratamento depende da área da lesão. Os tempos preconizados por Oakley (1978) em função da área tratada devem ser de um ou dois minutos para cada área e meia do transdutor. Segundo este autor, os tempos de tratamento subsequentes podem ser aumentados de 1 a 1 minuto e meio. Esse tempo de tratamento é baseado em estudos empíricos ou observações clínicas. Não há indicação de trabalhos experimentais ou clínicos que embasem estes achados, mostrando que este é um tema que precisa ser melhor estudado com relação à dosimetria de ultrassom. Nosso estudo não corrobora com as indicações de Oakley (1978) no que diz respeito ao tempo de aplicação necessário para promover um melhor alinhamento das fibras colágenas dos tendões de ratos.

O tempo de aplicação é uma variável importante na dosimetria do UST. Ele determina a quantidade de energia depositada ao tecido tratado. Alexander et al. (2010), em revisão sistemática sobre o uso de US em diversas patologias de ombro, aponta que os estudos que encontraram energias médias de 4.2 J por sessão de tratamento foram efetivos para as condições clínicas estudadas, enquanto que aqueles que aplicaram médias de 2,019 J não obtiveram sucesso. O fator tempo pode ter influenciado estes dados.

Os componentes da matriz extracelular (principalmente as fibras colágenas) do tecido conjuntivo presentes no tendão têm uma característica viscoelástica que dependem da quantidade de tempo ao qual o tecido é submetido à deformação ou tensão para manter suas características morfofuncionais (Culav et al., 1999). Deste modo, podemos sugerir que o tempo de aplicação do UST de 3 minutos pode ter um efeito biomecânico (compressão / tensão) suficiente para promover o mecanismo de sinalização celular e da matriz extracelular no realinhamento das fibras colágenas (Chiquet, 1999).

Neste estudo, observou-se que o retardo óptico no tecido cicatricial de tendões de ratos apresentou diferença estatisticamente significante quando foram aplicados 18 J de energia (grupo US3) sobre a área acometida. No entanto, quando se depositaram magnitudes de energia na ordem de 6 J (grupo US1) ou 12 J (grupo US2) sobre a área tratada, não houve diferença no retardo óptico entre os grupos tratados e o controle (Tn).

O tempo de aplicação mais comumente utilizado é o de 5 minutos, geralmente aplicados em uma área referente a 2 vezes o tamanho do transdutor, o que geraria uma aplicação de 2.5 minutos por área tratada (Koeke et al., 2005; Wood et al., 2010). O tamanho da área tratada é uma variável que não é descrita nos estudos sobre tendão e ultrassom. Koeke et al. (2005), da Cunha et al. (2001) e Wood et al. (2010) aplicaram o UST em uma área de 1 cm^2. Estes dados não estavam descritos nos artigos e foram fornecidos pelos pesquisadores. Nosso estudo mostrou que é necessário um

tempo maior de aplicação para promover um melhor alinhamento do colágeno.

Uma hipótese para explicar a discrepância entre nossos dados e o de outros pesquisadores é de que o controle da área pode não ter sido tão preciso o que impossibilita a comparação entre os estudos. Esta variável precisa ser considerada no desenho experimental para que se possa estabelecer uma correlação entre os estudos.

A relevância de estudar e desenvolver técnicas de tratamento para as lesões tendíneas se deve ao alto tempo de recuperação e a incapacidade funcional que geram nos paciente ou animais, podendo levar semanas ou até meses para a recuperação total (Soma; Mandelbaum, 1995; Enwemeka; Reddy, 2000; Saini et al., 2002).

A força tênsil do tendão é promovida pelo alinhamento as fibras colágenas, pelo tipo e quantidade de fibras que o compõem. Com isso, nesta pesquisa, utilizou-se um modelo experimental definido na literatura, descrito por Enwemeka e Reddy (2000) e reproduzido por outros autores (da Cunha et al., 2001; Reddy et al., 2001; Koeke et al., 2005; Carrinho et al., 2006; Arruda et al., 2007), demonstrando fácil reprodução, baixo custo e alta confiabilidade.

O nível de organização das fibras de colágeno no local da lesão é quantificado de acordo com o RO no microscópio de luz polarizada, obtendo um dado quantitativo. A intensidade do brilho na imagem de birrefringência revela o nível de agregação das fibras de colágeno (da Cunha et al., 2001). Durante o processo de reparação tecidual existe uma tendência de diminuir

o valor do RO (Carrinho et al., 2006), corroborando os dados deste experimento, onde o grupo US1 demonstra o menor valor de RO, seguido pelos grupos Tn, US2, US3 e C.

7. CONCLUSÕES

Os resultados presentes neste estudo sugerem que o tempo de aplicação de 3 minutos por área do transdutor do UST teve um efeito positivo na organização das fibras de colágeno nos tendões de ratos durante o processo de reparação tecidual, mostrando alterações significativas no RO do colágeno depositado no local da lesão dos ratos Tempos inferiores não produziram resultados significantes com relação ao retardo óptico quando comparados aos dados do grupo T.

8. REFERÊNCIAS

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

Almekinders LC, Deol G. The effects of aging, antiinflammatory drugs, and ultrasound on the in vitro response of tendon tissue. *Am J Sports Med*. 1999 Jul-Aug;27(4):417-21.

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

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

Artilheiro PP, Oliveira EN, Viscardi CS, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. Efeitos do ultra-som terapêutico contínuo sobre a proliferação e viabilidade de células musculares C2C12. *Fisioter Pesqui*. 2010;17(2):167-72.

Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther*. 2001 Jul;81(7):1351-8.

Baldan C, Pasqual AM, Schiavinato AM, Casarotto RA. Dose-dependência do laser de baixa intensidade (670 nm) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos. *J Health Sci Inst*. 2010;28(4):359-62.

Bélanger A. *Therapeutic eletrophysical agents: evidence behind practice*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.

Bisschop G, Bisschop E, Commandre F, Silva D. *Eletrofisioterapia*. São Paulo: Santos; 2001.

Blume K, Matsuo E, Lopes MS, Lopes LG. Dosimetria proposta para o tratamento por ultra-som: uma revisão de literatura. *Fisioter Mov*. 2005;18(3):55-64.

Cameron M. Ultrasound. In: Cameron M, editor. *Physical agents in rehabilitation:* from research to practice. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2009. p. 177-206.

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

Carvalho PT, Silva IS, Reis FA, Belchior AC, Aydos RD, Facco GG, Dourado DM. Histological study of tendon healing in malnourished Wistar rats treated with ultrasound therapy. *Acta Cir Bras*. 2006;21 Suppl 4:13-7.

Casarotto RA, Adamowski JC, Fallopa F, Bacanelli F. Coupling agents in therapeutic ultrasound: acoustic and thermal behavior. *Arch Phys Med Rehabil*. 2004 Jan;85(1):162-5.

Cetti R, Christensen SE, Ejsted R, Jensen NM, Jorgensen U. Operative versus nonoperative treatment of Achilles tendon rupture. A prospective randomized study and review of the literature. *Am J Sports Med*. 1993 Nov-Dec;21(6):791-9.

Chan BP, Chan KM, Maffulli N, Webb S, Lee KK. Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1997 Sep(342):239-47.

Chang J, Most D, Thunder R, Mehrara B, Longaker MT, Lineaweaver WC. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. *J Hand Surg Am*. 1998 Nov;23(6):1052-8.

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

Choi BH, Woo JI, Min BH, Park SR. Low-intensity ultrasound stimulates the viability and matrix gene expression of human articular chondrocytes in alginate bead culture. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Dec 15;79(4):858-64.

Culaw EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther*. 1999 Mar;79(3):308-19.

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

Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFPd. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2010;56(1):103-11.

Demir H, Yaray S, Kirnap M, Yaray K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev*. 2004 Sep;41(5):721-8.

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

Docker MF. A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. 1987;73(4):154-55.

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

Draper DO, Edvalson CG, Knight KL, Eggett D, Shurtz J. Temperature increases in the human achilles tendon during ultrasound treatments with commercial ultrasound gel and full-thickness and half-thickness gel pads. *J Athl Train*. 2010 Jul-Aug;45(4):333-7.

Draper DO, Sunderland S, Kirkendall DT, Ricard M. A comparison of temperature rise in human calf muscles following applications of underwater and topical gel ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1993 May;17(5):247-51.

Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. 1987;73(3):116-20.

Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF. Justifying the number of animals for each experiment. *Nucl Med Biol*. 2007 Apr;34(3):229-32.

Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. *Phys Ther*. 1989 Oct;69(10):816-25.

Enwemeka CS, Reddy K. The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. *J Laser Ther*. 2000;12:22-30.

Enwemeka CS, Spielholz NI. Modulation of tendon grouth and regeneration by electrical fields and currents. In: Currier DP, Nelson RM. *Dynamics of human biologic tissue*. Philadelphia: F.A. Davis Company; 1992. p. 231-54.

Enwemeka CS, Spielholz NI, Nelson AJ. The effect of early functional activities on experimentally tenotomized Achilles tendons in rats. *Am J Phys Med Rehabil*. 1988 Dec;67(6):264-9.

Franco AD, Pereira LE, Groschitz M, Aimbiré F, Martins RA, Carvalho RA. Análise do efeito do ultra-som no edema inflamatório agudo: estudo experimental. *Fisioter Mov*. 2005;18(2):19-24.

Frasson NF, Taciro C, Parizotto NA. Análise nanoestrutural da ação do ultra-som terapêutico sobre o processo de regeneração do tendão de ratos. *Fisioter Pesqui*. 2009;16(3):198-204.

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

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

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

Gelberman RH, Vandeberg JS, Manske PR, Akeson WH. The early stages of flexor tendon healing: a morphologic study of the first fourteen days. *J Hand Surg Am*. 1985 Nov;10(6 Pt 1):776-84.

Gogia PP. Phisiology of wound healing. In: Gogia PP, editor. *Clinical wound management*. Thorofare (NJ): Slack Incorporated; 1995. p. 1-12.

Guirro R, Guirro E. Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial: estudo experimental em ratos. *Rev Cien Tecnol*. 1995;8(4):37-47.

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

Harvey EN. Biological aspects of ultrasonic waves, a general survey. *Biol Bull*. 1930;59(3):306-25.

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

Hollenshead WH. *Livro texto de anatomia humana*. 3a ed. São Paulo: Harbra – Harper & Row do Brasil; 1990.

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

Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train*. 2002 Jul;37(3):293-9.

Jozsa L, Kannus P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports*. 1997 Apr;7(2):113-8.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Kakar S, Khan U, McGrouther DA. Differential cellular response within the rabbit tendon unit following tendon injury. *J Hand Surg Br*. 1998 Oct;23(5):627-32.

Kannus P, Jozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am*. 1991 Dec;73(10):1507-25.

Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med*. 1999 Jun;27(6):393-408.

Kitchen S. *Eletroterapia prática baseada em evidências*. 11a ed. São Paulo: Manole; 2003.

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

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

Larsen A, Kristensen G, Thorlacius-Ussing O, Oxlund H. The influence of ultrasound on the mechanical properties of healing tendons in rabbits. *Acta Orthop*. 2005 Apr;76(2):225-30.

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

Lehmann JF, DeLateur BJ, Warren CG, Stonebridge JS. Heating produced by ultrasound in bone and soft tissue. *Arch Phys Med Rehabil*. 1967b Aug;48(8):397-401.

Martines MAU, Davolos MR, Jafelicci Júnior M. O efeito do ultra-som em reações químicas. *Quim Nova*. 2000;23(2):251-6.

Maxwell L. Therapeutic ultrasound: its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. *Physiotherapy*. 1992;78(6):421-6.

Mayne R. The differents types of collagen and collagenous peptides. In: Trelstad RL, editor. *The role of extracellular matrix in development*. New York: Alan R. Liss; 1984. p. 33-42.

Mimni ME, Harkness RD. Molecular structure and functions of collagen. In: Minni ME, editor. *Collagen*. Boca Raton (FL): CRC Press, Inc.; 1988. p. 1-77.

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

Miyamoto K, An HS, Sah RL, Akeda K, Okuma M, Otten L, Thonar EJ, Masuda K. Exposure to pulsed low intensity ultrasound stimulates extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Nov 1;30(21):2398-405.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapeutico nas lesões por esmagamento do nervo ciatico de ratos: analise funcional da marcha. *Rev Bras Fisioter*. 2006;10(1):113-9.

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

Neves MA, Pinfildi CE, Wood VT, Gobbato RC, da Silva FM, Parizotto NA, Hochman B, Ferreira LM. Different Power Settings of LLLT on the Repair of the Calcaneal Tendon. *Photomed Laser Surg*. 2011 Oct;29(10):663-8.

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

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

Nyborg WN, Ziskin MC. Biological effects of ultrasound. *Clin Diagn Ultrasound*. 1985;16:24.

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

Olsson DC, Martins VMV, Martins E, Mazzanti A. Estimulação ultra-sônica pulsada e contínua no processo cicatricial de ratos submetidos à celiotomia. *Ciênc Rural*. 2006;36(3):865-72.

Olsson DC, Martins VMV, Pippi NL, Mazzanti A, Tognoli GK. Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. *Ciênc Rural*. 2008;38(4):1199-207.

Parizotto NA. *Ação do laser de Hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual:* um estudo do colágeno por microscopia eletonica de varredura, microscopia de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infra vermelho [Tese]. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação; 1998.

Pereira FEL. Degenerações: morte celular: alterações do intersticio. In: Brasileiro Filho G, editor. *Bogliolo:* patologia geral. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. p. 47-81.

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

Plapler PG, Camanho GL, Saldiva PH. Avaliaçäo numérica das ondulaçöes das fibras colágenas em ligamento patelar humano (tendäo patelar). *Rev Bras Ortop*. 2001;36(8):317-21.

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

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen*. 2001 May-Jun;9(3):248-55.

Reynolds NL, Worrell TW. Chronic achilles peritendinitis: etiology, pathophysiology, and treatment. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1991;13(4):171-6.

Robertson VJ. Dosage and treatment response in randomized clinical trials of therapeutic ultrasound. . *Phys Ther Sport*. 2002;3(3):124-33.

Robinson AJ, Snyder L. *Eletrofisiologia clínica*. Porto Alegre: Artmed; 2001.

Romano CV, Barbieri CH, Mazzer N, Volpon JB, Shimano AC, Roncaglia FB. O ultra-som terapêutico não aumentou as propriedades mecânicas de tendões flexores após reparo. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(1):10-4.

Saini NS, Roy KS, Bansal PS, Singh B, Simran PS. A preliminary study on the effect of ultrasound therapy on the healing of surgically severed achilles tendons in five dogs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2002 Aug;49(6):321-8.

Salomäo O, Carvalho Júnior AE, Fernandes TD, Traldi Filho IH, Carvalho Neto J. Lesöes tendíneas no pé e no tornozelo do esportista. *Rev Bras Ortop*. 1993;28(10):731-6.

Schabrun SM, Walker HL, Chipchase LS. The accuracy of therapeutic ultrasound equipment: a systematic review. *Phys Ther Rev*. 2008;13(6):443-9.

Silva JMN, Carvalho JP, Moura Júnior MJ, Arisawa EA, Martin AA, Sá HP, Silva JF. Estudo da ação do ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos Wistar. *Conscientiae Saúde (Impr)*. 2010;9(4):625-32.

Soma CA, Mandelbaum BR. Repair of acute Achilles tendon ruptures. *Orthop Clin North Am*. 1995 Apr;26(2):239-47.

Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Dec;40(12):1331-6.

Starkey C. *Recursos fisioterapêuticos em fisioterapia*. 2a ed. São Paulo: Manole; 2001.

Stehno-Bittel L, Reddy GK, Gum S, Enwemeka CS. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part I. Effects of rigid plaster casts and functional casts. *Med Sci Sports Exerc*. 1998 Jun;30(6):788-93.

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

van der Windt DA, van der Heijden GJ, van den Berg SG, ter Riet G, de Winter AF, Bouter LM. Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: a systematic review. *Pain*. 1999 Jun;81(3):257-71.

Vidal BC. Cell and extracellular matrix interaction: a feed back theory based on molecular order recognition: adhesion events. *Rev Fac Cienc Med/UNICAMP*. 1994;4:1-11.

Vidal BC. From collagen type I solution to fibers with a helical pattern: a self-assembly phenomenon. *C R Acad Sci III*. 1995 Aug;318(8):831-6.

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

Warden SJ, McMeeken JM. Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound Med Biol*. 2002 Aug;28(8):1075-80.

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

Wong RA, Schumann B, Townsend R, Phelps CA. A survey of therapeutic ultrasound use by physical therapists who are orthopaedic certified specialists. *Phys Ther*. 2007 Aug;87(8):986-94.

Wood VT, Pinfildi CE, Neves MA, Parizoto NA, Hochman B, Ferreira LM. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Lasers Surg Med*. 2010 Aug;42(6):559-65.

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

Ziskin CM, NcDiarmid T, Michlovitz SL. Therapeutic ultrasound. In: Michlovitz SL, editor. *Thermal agents in rehabilitation*. 3rd ed. Philadelphia: F. A. Davis Company; 1999. p. 169-207.