PATRÍCIA PEREIRA ALFREDO

**Estudo experimental dos efeitos da sonoforese com
Arnica montana sobre o processo de regeneração
do músculo esquelético em ratos Wistar**

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

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

São Paulo
2008

Aos meus pais Aloísio e Neusa, que sempre se dedicaram à minha formação como pessoa e profissional, meu profundo reconhecimento, amor e eterna gratidão.

A minha avó Elza (*in memoriam*), pelo carinho, simplicidade e sabedoria. Saudade imensa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a graça de realizar meu sonho e por ter me dado força em todos os momentos.

A minha orientadora Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto, exemplar tanto pessoal como profissionalmente. Obrigada pelos ensinamentos, confiança, incentivo, amizade, cuidado e carinho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Anaruma, pela orientação, auxílio, paciência, atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Simões Pião, pela contribuição com a análise estatística.

À Profa. Dra. Silvia Maria Amado João, pela atenção, sugestões e colaboração com a análise histológica.

À Profa. Dra. Amélia Pasqual Marques, pela confiança, carinho e sugestões no exame de qualificação.

À Profa. Dra. Isabel de Camargo Neves Sacco, pela generosidade ao me iniciar no conhecimento de análise estatística.

Aos técnicos de histologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp) *campus* Rio Claro, Beto e China, que ajudaram no preparo das lâminas. Obrigada pela amizade e descontração.

À Unesp *campus* Rio Claro, que disponibilizou os animais, materiais e equipamentos essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

À grande amiga Mariana Yoshida, pelos momentos compartilhados, carinho, apoio e compreensão.

À Tina Amado, pela paciência e contribuição com a revisão desta dissertação.

À Sâmia Amire Maluf, pela generosa contribuição para minha formação profissional.

A Lúcia Son, secretária do Curso de Fisioterapia da Faculdade de Medicina da USP, pela amizade, colaboração e companheirismo.

Aos amigos da USP Adriana de Souza, Ana Assumpção, Ana Paula Ribeiro, Francis Trombini, Giovana Milani, Nataly Andrade, Patrícia Penha e Patrícia Pezzan, pelas palavras amigas, companhia e apoio.

Às amigas Sarah e Danúbia, que me acolheram em suas repúblicas em Rio Claro, pela força nos momentos mais difíceis.

A meus pais, por me oferecerem um amor incondicional, pelo incentivo, confiança, presença constante, por serem meu exemplo.

A todos os amigos que direta ou indiretamente se envolveram na realização deste trabalho.

Ao leitor, pelo interesse.

*Só acredito no profissional que tenha mais do que amor pela sua
profissão – que tenha paixão.
Feliz daquele que gosta do que faz, só assim não precisa trabalhar.*

(Confúcio)

*De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre começando,
a certeza de que é preciso continuar
e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.*

*Fazer da interrupção um novo caminho...
fazer da queda, um passo de dança
do medo, uma escada
do sonho, uma ponte
da procura, um encontro.*

(Fernando Sabino)

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

Normalização das referências adaptada de: International Committee of Medical Journal Editors. *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals* ("Vancouver"). 2005.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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. 2a ed. São Paulo; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of journals indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
Músculo estriado esquelético	5
Morfogênese	5
Características morfológicas e funcionais	7
Regeneração dos tecidos	12
Inflamação	13
Fase proliferativa	16
Fase de remodelamento	17
Ultra-som	17
Geração e propagação das ondas sonoras	18
Características das ondas ultra-sônicas	19
Intensidade e campo acústico	20
Impedância acústica	21
Reflexão e refração	22
Interferências e ondas estacionárias	23
Mecanismos de atenuação	23
Equipamento	24
Mecanismos terapêuticos.....	25
Mecanismo mecânico	25
Mecanismo térmico	27
Efeitos terapêuticos na fase inflamatória da regeneração	28
Sonoforese	33
<i>Arnica montana</i>	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
Animais	39
Grupos experimentais	39
Lesão muscular	40
Equipamento de ultra-som terapêutico	40
Gel de arnica	41
Protocolo de tratamento	41
Coleta do músculo e análise morfológica.....	42
Análise quantitativa	43
Análise estatística	43
5 RESULTADOS	44
Análise quantitativa	44
Análise qualitativa	46
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	61
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrativo da arquitetura do músculo estriado esquelético	8
Figura 2	Esquema ilustrativo da estrutura de um sarcômero de fibra muscular esquelética	10
Figura 3	Ilustração esquemática da distribuição da intensidade do feixe emitido pelo transdutor de ultra-som	21
Figura 4	Reflexão e refração de uma radiação ao atravessar meios diferentes	22
Figura 5	Secção transversal das fibras no terço médio do músculo tibial anterior	40
Figura 6	Equipamento de ultra-som utilizado (modelo Sonacel [®] da Bioset)	41
Figura 7	Cabeçote do aparelho de ultra-som com área de radiação efetiva de 0,5 cm ²	41
Figura 8	Gel de <i>Arnica montana</i> utilizado (Herbarium)	41
Figura 9	Aplicação do ultra-som terapêutico na área de lesão	42
Figura 10	Densidade (média $\pm$ erro padrão) de células mononucleadas no músculo tibial anterior nos grupos controle, ultra-som (US), ultra-som + arnica (US+A) e arnica	44
Figura 11	Densidade (média $\pm$ erro padrão) de células polimorfonucleadas no músculo tibial anterior nos grupos controle, ultra-som (US), ultra-som + arnica (US+A) e arnica	45
Figura 12	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo controle, corado com hematoxilina-eosina – corte transversal: fibra muscular com morfologia comprometida	46
Figura 13	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo controle, corado com hematoxilina-eosina: intenso infiltrado de células inflamatórias	47
Figura 14	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo controle, corado com hematoxilina-eosina: presença de células polimorfonucleares e mononucleares	47
Figura 15	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo controle, corado com hematoxilina-eosina: presença de células fusiformes	48
Figura 16	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som, corado com hematoxilina-eosina: fenda incisional com número abundante de células inflamatórias	49
Figura 17	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som, corado com hematoxilina-eosina: células fusiformes em proliferação	49
Figura 18	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som, corado com hematoxilina-eosina: rede de fibrina mais espessa quando comparada ao controle	50
Figura 19	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som, corado com hematoxilina-eosina: presença de células gigantes multinucleadas	51
Figura 20	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som+ arnica, corado com hematoxilina-eosina: matriz extra-celular do tecido conjuntivo	51
Figura 21	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som+ arnica, corado com hematoxilina-eosina: rede de fibrina espessa com leucócitos picnóticos	52
Figura 22	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato o grupo ultra-som+ arnica, corado com hematoxilina-eosina: presença marcante de células polimorfonucleares	52

LISTA DE FIGURAS (cont.)

Figura 23	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som+ arnica, corado com hematoxilina-eosina: células mononucleares predominantes na matriz do tecido conjuntivo	53
Figura 24	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo arnica, corado com hematoxilina-eosina: fibroblastos presentes, dentre inúmeras células polimorfonucleares e mononucleares	54
Figura 25	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo arnica, corado com hematoxilina-eosina: presença de leitos vasculares na matriz extracelular	54
Figura 26	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato o grupo arnica, corado com hematoxilina-eosina: fragmentos necróticos tomados por numerosas células inflamatórias com predomínio de neutrófilos e macrófagos	55
Figura 27	Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo arnica, corado com hematoxilina-eosina: fibroblastos e células satélites distribuídas de maneira desordenada	55

RESUMO

Alfredo PP. Estudo experimental dos efeitos da sonoforese com *Arnica montana* sobre o processo de regeneração do músculo esquelético em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 70p.

A proposta deste estudo foi verificar o efeito da sonoforese com *Arnica montana* sobre a fase inflamatória aguda de uma lesão muscular. Para isso, 40 ratos Wistar machos (300 ± 50 g), lesados cirurgicamente, foram divididos em 4 grupos: grupo controle (C), 10 ratos lesados, não submetidos a tratamento algum; grupo ultra-som (US), 10 ratos lesados, tratados com US; grupo ultra-som+arnica (US+A), 10 ratos lesados, tratados com sonoforese com gel de arnica; e grupo arnica (A), 10 ratos lesados, tratados com massagem de gel de arnica. O ultra-som com frequência de 1 MHz e $0,5 \text{ W/cm}^2$ de intensidade foi aplicado 24 h após a lesão uma vez ao dia durante 3 minutos, por 3 dias; o grupo US+A recebeu aplicação de ultra-som idêntica, mas com gel de arnica; o grupo A recebeu massagem de gel de arnica nos mesmos tempo e período. O terço médio do músculo tibial anterior lesado foi removido, montando-se séries de lâminas para análise quantitativa (contagem de células mononucleares e polimorfonucleares) e qualitativa (morfologia das fibras musculares). Os resultados foram tratados estatisticamente, com nível de significância $p < 0,05$. Foi encontrada maior densidade de células mononucleares nos grupos US, US+A e A, sem diferença entre estes, mas com diferença significativa ($p < 0,0001$) destes para o grupo controle, onde a densidade de células polimorfonucleares também foi significativamente diferente ($p = 0,0134$) dos demais. Ainda quanto a essa densidade, não houve diferença entre os grupos US e US+A, mas houve entre o grupo A ($p = 0,0134$) e os demais. A análise qualitativa revelou estágio mais avançado de regeneração nos tecidos dos grupos US e US+A igualmente. A similaridade de resultados entre os grupos US e US+A leva a concluir que a sonoforese com arnica não foi mais eficaz que o ultra-som na recuperação da lesão muscular. Sugere-se que o US pode ter anulado ou minimizado o efeito regenerativo da *Arnica montana* por sonoforese na fase inflamatória aguda da lesão muscular.

Descritores: Arnica; Fonoforese; Inflamação; Músculo esquelético/lesões; Ratos Wistar; Terapia por ultra-som

ABSTRACT

Alfredo PP. Experimental study on the effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto regeneration process in Wistar rats lesioned skeletal muscles. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 70p.

This study aimed at verifying the effects of ultrasound associated to *Arnica montana* (phonophoresis) onto the acute phase of an inflammatory muscle lesion. Forty Wistar male rats (300 ± 50 g), of which the Tibialis Anterior muscle was surgically lesioned, were divided into 4 groups (n=10 each): control group received no treatment; the ultrasound group (US) was treated with 1-MHz, $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ -intensity US during 3 minutes, once a day, for 3 days; the US+A group was treated with arnica phonophoresis (the same US parameters plus arnica gel); and the arnica group (A) was submitted to massage with arnica gel, also during 3 minutes, once a day, for 3 days. Treatment started 24 h after the surgical lesion. On the 4th day after lesion animals were sacrificed and sections of the lesioned, inflamed muscle were removed for quantitative (mononuclear and polymorphonuclear cell count) and qualitative analysis (muscle fiber morphology). Collected data from the 4 groups were statistically analysed and the significance level set at $p<0.05$. Results show higher mononuclear cell density in all three treated groups with no significant difference between them, but values were significantly different ($p<.0001$) when compared to control group's. As to polymorphonuclear cell density, significant differences were found between control group ($p=0.0134$) and the other three groups; the arnica group presented lesser density of polymorphonuclear cells when compared ($p=0.0134$) to the other groups, and no significant differences were found between US and US+A groups. Qualitative analysis showed a more advanced regeneration stage in tissues from both US and US+A groups. The similarity of results between US and US+A groups points to ineffectiveness of *Arnica montana* phonophoresis, US having seemingly checked or minimized its anti-inflammatory effect.

Key words: Arnica; Inflammation; Muscle, skeletal/injuries; Phonophoresis; Rats, Wistar; Ultrasonic therapy

1 INTRODUÇÃO

O corpo humano apresenta em sua composição cerca de 40% de músculo esquelético e talvez outros 10% de músculo liso e cardíaco (Guyton & Hall, 1997). O músculo esquelético responde a estímulos diversos, sendo portanto mutável. É dotado da capacidade de se regenerar após diversos tipos de agressão, a chamada plasticidade muscular (Carlson & Faulkner, 1983).

Em função da constante solicitação para as atividades de vida diária e para as atividades esportivas, o músculo esquelético é muito propenso a lesões. Nesse caso, o estímulo lesivo obriga o músculo a se adaptar às condições impostas pelo meio.

A inflamação é um processo importante para a regeneração de um tecido lesado, mas invariavelmente causa edema, que pode induzir a uma lesão por hipóxia secundária e promover morte celular. A continuidade da resposta inflamatória é sempre considerada indesejável para o processo de regeneração muscular (Worrell, 1994). Assim, é importante que a fase aguda da inflamação dure o mínimo possível – o que por sua vez abrevia o tempo de recuperação –, pois o tempo de imobilização e inatividade pode causar prejuízos morfofuncionais ao tecido muscular. Daí a necessidade de estudar em profundidade o processo de regeneração dos tecidos sob a ação de vários agentes, de modo a tornar viáveis ou confiáveis novas alternativas de tratamento.

O ultra-som terapêutico (US) é um recurso usado no tratamento de uma variedade de situações, incluindo aí a bioestimulação do reparo tecidual (Dyson *et al.*, 1968; Dyson & Suckling, 1978; Cunha *et al.*, 2001; Koeke *et al.*, 2005). De acordo com Ueda *et al.* (1996), Fang *et al.* (1999) e Miller (2000), o US pode facilitar a penetração de agentes antiinflamatórios

aplicados sobre a pele, em uma técnica chamada sonoforese. Esse novo conceito de aplicação do US combinado com drogas tópicas tem promovido investigações em muitos campos da medicina.

A rota transdérmica de aplicação de agentes antiinflamatórios apresenta vantagens em relação à administração oral, pois, na aplicação tópica, a droga age diretamente sobre a área inflamada, evitando os riscos dos efeitos colaterais causados pelo metabolismo hepático e/ou sistêmico. No entanto, o transporte transdérmico de moléculas é limitado devido à baixa permeabilidade do extrato córneo da pele (Mitragotri, 2000)..A sonoforese, ao favorecer o transporte transdérmico, apresentaria vantagens em relação à simples aplicação tópica (Muller *et al.*, 1997).

A *Arnica montana* é uma planta da família Asteraceae utilizada como medicamento homeopático, conhecido desde o século XVI. É utilizada topicamente no tratamento de hematomas, contusões, flebites, distensões musculares, alívio da dor e edema, cicatrizações, afecções bucais, entre outros (Knussel *et al.*, 2002). Seus principais princípios ativos são lactonas sesquiterpênicas (arnicolide, helenalina e dihidro-helenalina), flavonóides (incluindo quercitina e seus derivados como quercitina-3-mono-glucosídeo e quercitina-3-glicogalacturônico), álcoois (arnidiol, arnilenediol, isoarnilenediol), carotenóides, óleo essencial, ácido fenilcarboxílico (assim como ácido clorogênico e seus derivados) e outros constituintes (Bucay, 1995).

As lactonas sesquiterpênicas, especialmente os ésteres helenalina e dihidro-helenalina, são os mais importantes princípios ativos da *Arnica montana*, responsáveis por sua atividade antiinflamatória, o que foi verificado por vários estudos *in vitro* e *in vivo* (Klaas *et al.*, 2002; Knussel *et al.*, 2002; Bergonzi *et al.*, 2005). Ao estudar a penetração transdérmica de preparações da planta e de suas lactonas sesquiterpênicas, Wagner *et al.* (2004) concluíram que uma quantidade suficiente destas últimas pode penetrar a

barreira da pele, gerando efeitos antiinflamatórios, mas que o uso tópico de preparações da planta, como as flores de arnica, pode apresentar vantagens.

É de se supor, assim, que o efeito antiinflamatório da arnica poderia ser acentuado por sua aplicação com ultra-som. Entretanto, não foram encontrados estudos sobre sonoforese com *Arnica montana*.

2 OBJETIVOS

Como a arnica vem sendo utilizada topicamente de forma significativa em afecções do sistema musculoesquelético e não foram encontrados estudos verificando seus efeitos pela sonoforese em lesões musculares, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a eficácia da sonoforese com *Arnica montana* na recuperação de lesão muscular.

Os objetivos específicos foram:

- ♦ verificar o efeito antiinflamatório ou pró-inflamatório da sonoforese com *Arnica montana* após lesão muscular em fase aguda de inflamação;
- ♦ para tanto, identificar e comparar a densidade de leucócitos (mononucleares e polimorfonucleares), entre diferentes grupos de uma amostra: controle (sem tratamento), tratado apenas por ultrassom, tratado apenas com aplicação tópica de arnica, e tratado por sonoforese com arnica;
- ♦ comparar e interpretar as diferenças morfológicas apresentadas pelo tecido muscular lesado após o tratamento a que foi submetido cada grupo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Para desenvolver este estudo, foi necessário proceder à revisão da literatura disponível a respeito dos seguintes tópicos: o músculo esquelético estriado; o processo de regeneração do tecido muscular, especialmente a inflamação; o ultra-som, suas características e uso terapêutico, examinando os efeitos terapêuticos do ultra-som na fase inflamatória da regeneração; a sonoforese; e a *Arnica montana*.

Músculo estriado esquelético

Foram pesquisadas a morfogênese do tecido muscular e as características morfológicas, citológicas e funcionais do músculo esquelético.

Morfogênese

No organismo, as células teciduais são diferenciadas e originadas a partir de células indiferenciadas localizadas no mesoderma (Moore, 1979). As células primordiais caracterizam-se por uma alta taxa de proliferação associada à capacidade de se diferenciar de forma específica em células pós-mitóticas. Portanto, originar, renovar e reparar as células teciduais é a função dessas células primordiais.

Para Bischoff (1994), a citodiferenciação ocorre a partir das células precursoras mesenquimais que, para atingir a fase adulta, apresentam dois estágios celulares: o pré-mioblasto e o mioblasto. As células pré-mioblásticas têm um formato fusiforme, são mononucleadas e indiferenciadas. Além de induzir a formação e crescimento tecidual, está demonstrada sua influência no processo de regeneração muscular (Mauro, 1961). No entanto, é provável que os mioblastos, mesmo sendo mononucleados e fusiformes, não consigam se proliferar porque seu

núcleo está em fase pós-mitótica. A suspensão da resposta do DNA, somada à capacidade de união dos mioblastos e transcrição de genes específicos do músculo representam o principal fator no processo de morfogênese muscular. Os mioblastos, por sua vez, apresentam modificações funcionais e estruturais, assim como a maioria das organelas citoplasmáticas (Carlson *et al.*, 1979).

Como a associação dos mioblastos persiste até o músculo se tornar completamente maduro, os núcleos dos miotúbulos aumentam progressivamente. Estes, em fase avançada de desenvolvimento, mostram a maior parte do citoplasma ocupado por miofibrilas, obrigando os núcleos a se deslocarem para a periferia. Por fim, a citodiferenciação dos miotúbulos em miofibras prematuras envolve a obtenção definitiva da posição sub-sarcolêmica dos núcleos, passando a se chamar mionúcleo.

Chega ao fim o processo de diferenciação celular representado pelas miofibras, mesmo sem completo desenvolvimento funcional e estrutural. Essa diferenciação funcional se completará com os estímulos de um motoneurônio específico (Fischman, 1972). Sabe-se que só depois de algumas semanas de desenvolvimento pós-natal é que a maturidade funcional estará completa, pois a inervação das fibras musculares ainda é indiferenciada (Brown *et al.*, 1981).

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

Características morfológicas e funcionais do músculo

O músculo estriado esquelético é responsável pela maior parte da massa muscular voluntária do corpo, sendo formado por feixes de células cilíndricas muito longas e multinucleadas, que apresentam estriações transversais. Tem contração rápida e vigorosa, sujeita ao controle voluntário (Junqueira & Carneiro, 1995).

Termos próprios são freqüentemente utilizados na descrição dos componentes das células musculares. Assim, a membrana celular é chamada sarcolema; o citoplasma, sarcoplasma; o retículo endoplasmático liso, retículo sarcoplasmático; e, ocasionalmente as mitocôndrias, sarcossomas. Em razão de seu comprimento ser maior que sua largura, as células musculares são freqüentemente chamadas de fibras musculares (Gartner & Hiatt, 1999).

Na constituição de um músculo, as fibras estão distribuídas em feixes ou fascículos de tamanhos variados. O espaço entre as fibras musculares é preenchido pelo tecido conjuntivo delicado chamado endomísio. Cada fascículo ou feixe de fibras é envolvido por uma bainha de tecido conjuntivo mais resistente, o perimísio e, circundando e unindo todos os fascículos, fica o epimísio (Figura 1).

A função desse tecido conjuntivo é manter as fibras musculares unidas, permitindo que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro (importante significado funcional) pois, na maioria das vezes, as fibras não se estendem de uma extremidade até a outra do músculo.

Figura 1 Esquema ilustrativo da arquitetura do músculo estriado esquelético. À direita, o contorno de um músculo do qual teria sido retirado o segmento (pontilhado) representado à esquerda (Junqueira & Carneiro, 1999, p.160)

Essas fibras são dispostas paralelamente umas às outras. Têm vários núcleos, situados na periferia da célula, sob a membrana celular (sarcolema).

O músculo esquelético é fartamente irrigado com sangue e, geralmente, cada fibra tem em suas proximidades vários capilares (Ross & Romrell, 1993). Os vasos sangüíneos penetram no músculo através dos septos do tecido conjuntivo e formam uma rica rede de capilares que correm entre as fibras musculares (Junqueira & Carneiro, 1999).

Os elementos contráteis (miofibrilas), que mantêm uma relação muito ordenada e específica entre si, ocupam a maior parte do sarcoplasma da célula, organização essa responsável pelas estriações transversais, vistas nos cortes longitudinais das fibras musculares esqueléticas, e que deram

origem à denominação de músculo estriado. Essas miofibrilas são cilíndricas e dispostas longitudinalmente à fibra muscular; aparecem com estriações transversais, pela alternância de faixas claras e escuras. A faixa escura (anisotrópica) recebeu o nome de banda A, enquanto a faixa clara (isotrópica) banda I. No centro de cada banda I aparece uma linha transversal escura, a linha Z. Vale salientar que o sarcoplasma dessas células é escasso.

A estriação da miofibrila é devida à repetição de unidades iguais, chamadas sarcômeros. Cada sarcômero é formado pela parte da miofibrila que fica entre as duas linhas Z sucessivas, e contém uma banda A separando duas semi-bandas I. A banda A apresenta uma zona mais clara no seu centro, a banda H (Figura 2). A disposição dos sarcômeros coincide nas várias miofibrilas da fibra muscular, e as bandas formam um sistema de estriações transversais, paralelas, que é típico das fibras musculares estriadas (Junqueira & Carneiro, 1999).

As miofibrilas possuem quatro tipos primordiais de proteínas: actina, miosina, troponina e tropomiosina, que são envolvidas no processo contrátil.

Dubowitz *et al.* (1985) indicam que, do ponto de vista energético, morfológico, fisiológico e histoquímico, há três tipos de fibras musculares esqueléticas: as fibras vermelhas (tipo I) possuem elevado teor de citocromo e mioglobina, grande quantidade de mitocôndrias, sendo resistentes à fadiga; as fibras brancas (tipo II) têm baixo teor de mioglobina, mitocôndrias e glicogênio dissolvido no citoplasma, sendo sensíveis à fadiga; e, por último, as fibras mistas apresentam características morfológicas intermediárias, fazendo tanto glicólise como oxidação (Gartner & Hiatt, 1999; Junqueira & Carneiro, 1999).

Figura 2 Esquema ilustrativo da estrutura de um sarcômero de fibra muscular esquelética (Junqueira & Carneiro, 1999, p.163)

A contração normal das fibras musculares esqueléticas é comandada por nervos motores que se ramificam no tecido conjuntivo do perimísio, onde cada nervo origina numerosas terminações. No local de inervação, o nervo perde sua bainha de mielina e forma uma dilatação que se coloca dentro de uma depressão da superfície da fibra muscular. Essa estrutura chama-se placa motora.

A despolarização iniciada na placa motora propaga-se ao longo da membrana da fibra muscular e penetra na profundidade da fibra através do sistema de túbulos transversais. Em cada tríade (estrutura tripla vista no corte transversal, onde as duas cisternas terminais ladeiam um túbulo transversal nas junções A-I), o sinal despolarizador passa para o retículo sarcoplasmático e resulta na liberação de cálcio, que inicia o ciclo da contração. Quando a despolarização termina, o cálcio é transportado ativamente de volta para as cisternas do retículo sarcoplasmático e o músculo relaxa (Ross & Romrell, 1993; Junqueira & Carneiro, 1999).

Uma fibra nervosa pode inervar uma única fibra muscular ou então se ramificar e inervar até 160 ou mais fibras musculares. A fibra nervosa e as fibras musculares por ela inervadas formam uma unidade motora. Na ausência de inervação, as fibras musculares vão gradualmente reduzindo seu diâmetro até chegarem à degeneração, sendo substituídas pelo tecido conjuntivo que vai se tornando fibroso, podendo sofrer retração.

Outra estrutura que faz parte do músculo é o tendão, constituído de fascículos de fibras colágenas, altamente resistentes a distensões e relativamente flexíveis, que geralmente são orientadas paralelamente ao longo do eixo do músculo. Existem nos tendões receptores aferentes especializados, que levam a informação do grau de distensibilidade muscular para o sistema nervoso central.

Segundo Carlson e Faulkner (1983), a fibra muscular é dotada da capacidade de adaptação quando submetida a estímulos extrínsecos, alterando sua estrutura e função para manter a homeostasia. Atrofia, hipertrofia e hiperplasia são as principais adaptações que podem ocorrer. Se a adaptação não ocorrer, a lesão tecidual fica evidente e assume duas proporções, uma de caráter reversível e outra irreversível, associada a um estresse intenso ou persistente, levando a célula à morte.

Todas essas modificações e outras influências nocivas como miotoxinas exercem efeitos primeiramente no nível celular. Entretanto, o período de tempo necessário para produzir as alterações morfológicas de adaptações, lesão e morte celular é controverso e varia com a capacidade discriminatória dos métodos utilizados para detectar e tratar essas alterações.

Embora os núcleos das fibras musculares não se dividam, o músculo tem uma pequena capacidade de reconstituição. Admite-se que as células satélites sejam responsáveis pela regeneração do músculo esquelético. A célula satélite é uma célula mononucleada situada entre a membrana plasmática e a lâmina basal das fibras musculares (Maltin *et al.*, 1983). As células satélites são fusiformes, dispostas paralelamente às fibras musculares, dentro da lâmina basal que envolve as fibras, e só podem ser identificadas ao microscópio eletrônico (Junqueira & Carneiro, 1999).

Essas células apresentam núcleos que parecem pertencer à célula muscular, mas que na realidade pertencem a estas pequenas células. Após uma lesão ou outro estímulo, as células satélites tornam-se ativas, proliferam por divisão mitótica e se fundem umas as outras para formarem novas fibras musculares esqueléticas. As células satélites também entram em mitose quando o músculo é submetido a exercício intenso. Neste caso elas se fundem com as fibras musculares preexistentes, contribuindo para hipertrofia do músculo (Junqueira & Carneiro, 1999; Ross & Romrell, 1993).

Regeneração dos tecidos

A regeneração é um processo complexo, porém essencial, sem o qual o corpo não seria capaz de sobreviver. É um mecanismo homeostático que visa restaurar a integridade do tecido o mais rápido possível, após uma lesão. Pode ser iniciada como resultado da perda de comunicação

entre as células adjacentes, entre células e seu suporte, ou por morte celular.

Pode ser descrita em termos de quimiocinesia, multiplicação e diferenciação celular, onde ocorrem uma série de eventos envolvendo a migração das células originárias do tecido vascular e conjuntivo para o local da lesão. Esse processo é governado por substâncias quimiotáticas liberadas no local.

O grau com que a regeneração ocorre no músculo parece depender do grau com que as lâminas basais foram retidas e do suprimento vascular e nervoso para a área (Carlson & Faulkner, 1983). O reparo muscular envolve a remoção de componentes celulares lesados, a proliferação de células satélites para formar materiais para construção de novas fibras musculares e a fusão de células satélites para formar novos miotúbulos e fibras musculares.

O processo de regeneração é dividido em três fases que se sobrepõem: inflamação, proliferação e remodelamento (Kitchen, 2003).

Inflamação

A inflamação em seu sentido mais amplo é uma resposta tecidual a uma lesão que causa tanto morte celular como comprometimento dos vasos sanguíneos. Os sinais clássicos da inflamação são eritema, calor, edema e dor. Essa fase inicial do processo de regeneração dos tecidos dura entre 24 e 72 horas e é seguida por uma fase subaguda, ou tardia, que dura entre 10 e 14 dias. A fase subaguda pode se estender caso haja uma fonte contínua de trauma ou se alguma forma de irritação, como corpo estranho ou infecção, estiverem presentes.

O propósito primário da fase inflamatória da regeneração é livrar a área de resíduos e tecidos mortos e destruir, antes do reparo, qualquer infecção invasora (Robbins *et al.*, 2000).

Segundo Michlovitz (1996), a inflamação é formada por alguns eventos, como:

- ♦ Resposta vascular: como a lesão tecidual causa tanto morte celular como compromete os vasos sangüíneos, após a lesão há uma vasoconstrição transitória, devido à liberação de noradrenalina, durando poucos minutos. Durante esse tempo ocorre a marginação de leucócitos nas paredes dos capilares e vênulas pós-capilares. Tanto os vasos sanguíneos quanto os vasos linfáticos se fecham para limitar a perda de fluído. Alguns mediadores químicos liberados no local da lesão (como histamina, que é liberada por mastócitos e plaquetas sangüíneas; bradicinina; prostaglandinas, entre outros), causam vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, levando ao aparecimento de edema (movimento do fluído para o interstício). O edema inicialmente formado é chamado de transudato (consiste principalmente de água, eletrólitos e poucas células); quando a permeabilidade aumenta, é chamado de exudato (consiste de células, proteínas plasmáticas e leucócitos).
- ♦ Resposta homeostática: para limitar a perda de sangue quando os vasos sangüíneos são lesados, há um recolhimento e fechamento dos pequenos vasos. A agregação plaquetária e o depósito de fibrina feito por estas leva à formação de coágulos sangüíneos na parede dos vasos e na matriz extra-celular intersticial, ajudando na oclusão dos vasos linfáticos, evitando que mais fluído chegue na área lesada.
- ♦ Resposta celular: é caracterizada pela chegada dos leucócitos, que têm um papel chave no processo inflamatório, removendo os microorganismos do local da lesão através da fagocitose, preparando-o para o reparo. Há vários tipos de leucócitos, como neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos (convertem-se em macrófagos). São atraídos por agentes quimiotáxicos liberados na área da lesão.

- ♦ Resposta imune: ocorre pelo aumento da permeabilidade vascular, aumentando a atração quimiotática para os leucócitos e aumentando a fagocitose realizada por estes.

Os leucócitos são distribuídos em dois grupos: granulócitos (polimorfonucleares) e agranulócitos (mononucleares), conforme tenham, ou não, granulações específicas no citoplasma. O grupo dos granulócitos é formado pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos, enquanto o grupo dos agranulócitos é formado pelos linfócitos, mastócitos e monócitos que originam os macrófagos (Brasileiro Filho, 2000).

Os neutrófilos formam a primeira e a maior população de polimorfonucleares que chegam e afetam a resposta inflamatória nos tecidos, predominantes nas primeiras 24 horas após o início do processo. Atuam contra agentes infecciosos ou corpos estranhos que penetram as barreiras físicas do organismo (Pizza, 2002). Alguns são capazes de causar dano adicional ao tecido pela liberação de radicais livres, lesando ainda mais as membranas celulares (Peake, 2002; Armstrong, 1990). Dessa forma, a função do neutrófilo é necessária para o reparo tecidual, mas seu acúmulo prolongado pode resultar em um comprometimento da regeneração, possibilitando a destruição tecidual.

Os macrófagos são os principais leucócitos mononucleares, e começam a sair dos vasos 18 a 24 horas depois de iniciada a exsudação. A partir daí acumulam-se rapidamente, passando a ser as células dominantes depois de 48 horas. Participam juntamente do processo de reparo tecidual, atuando no local de lesão. Suas funções de regeneração podem ser inibidas na ausência de neutrófilos, como a redução da fagocitose dos tecidos lesados, resultando em uma lenta ou ausente regeneração e reparo (Grounds, 1987; Hawke & Garry, 2001).

Fase proliferativa

É caracterizada pela formação do tecido de granulação, que precede o desenvolvimento do tecido cicatricial maduro. Ocorre nos dias 3 a 20 após a lesão (Kitchen, 2003). Essa fase é caracterizada por alguns fenômenos como fibroplasia, angiogênese e contração da ferida.

A fibroplasia é caracterizada pelo desenvolvimento de fibroblastos a partir de células mesenquimais indiferenciadas, e migração destes para dentro da área inflamada, iniciando a síntese do tecido cicatricial. Este é composto primariamente por colágeno e mucopolissacarídeo e forma a matriz extra-celular. O colágeno adquire força após ser envolvido dentro das fibrilas e ser organizado em bandas, formando uma trama.

Junto a esse evento ocorrem a angiogênese, pelo brotamento de capilares para suprir as necessidades dessa fase, e a contração da ferida, fenômeno este em que os miofibroblastos (actina ligada a fibroblastos) movem as extremidades da ferida em direção ao centro, ancorando-a ao colágeno, diminuindo o tamanho da área a ser coberta (Michlovitz, 1996).

Segue-se a proliferação das células satélites do músculo esquelético (ou supostos mioblastos), que fornecem uma fonte de mionúcleos para as células musculares em regeneração. A regeneração segue depois o padrão normal de desenvolvimento muscular, com as células satélites se alinhando ao longo da lâmina basal e fundindo-se em miotubos. A presença da lâmina basal parece influenciar esse processo, fornecendo um substrato onde pode ocorrer o alinhamento e expressando diversos componentes matriciais extracelulares. À medida que os miotúbulos amadurecem e se diferenciam, eles sintetizam proteínas miofibrilares e as depositam na região subsarcolemal mais externa. Durante esse processo, os núcleos musculares são normalmente empurrados para a periferia, embora alguns poucos permaneçam centralmente, como testemunho do

processo de reparo (Kitchen, 2003).

Fase de remodelamento

Essa fase ocorre a partir do nono dia após a lesão – e pode durar anos. É um período de amadurecimento da cicatriz, marcado pelo desaparecimento dos fibroblastos. As fibras de colágeno se tornam mais organizadas e se ajustam mais às bandas das fibras paralelas.

O tecido amadurecido é 70% mais forte que um tecido intacto, tornando-se avascular e com isso adquirindo uma aparência rosada a branca (Michlovitz, 1996).

Ultra-som

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

A primeira aplicação prática de ultra-som ocorreu em 1917, com a criação de sonares para detecção de submarinos, utilizando o método pulso-eco. Após alguns anos, foi descoberto que o ultra-som produzia aumento da temperatura em tecidos biológicos e, entre 1930 a 1940, ele foi introduzido na prática médica como um recurso terapêutico, usado particularmente para produzir calor em tecidos profundos.

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

Geração e propagação das ondas ultra-sônicas

Qualquer material vibrante pode servir como fonte de ultra-som, como os materiais ou cristais piezoelétricos. Nestes, pode ocorrer o fenômeno da piezoeletricidade quando sobre eles é aplicada pressão mecânica, desenvolvendo carga elétrica em suas superfícies. Os cristais piezoelétricos (ou cerâmicas) produzem cargas elétricas positivas ou negativas, quando se contraem ou expandem. Tal efeito é reversível, isto é, quando é aplicada uma corrente elétrica alternada sobre esses materiais, eles são capazes de vibrar, emitindo ondas ultra-sônicas. O ultra-som terapêutico é produzido pelo efeito piezoelétrico inverso. A vibração nesses materiais resulta na produção de ondas mecânicas de alta frequência (Hoogland, 1986; Starkey, 1999).

Modernamente utiliza-se o cristal de PZT cerâmico (composto por chumbo, zircônio e titânio) que possui elevada atividade piezoelétrica e mantém suas características em temperaturas relativamente elevadas (Crepon, 1996).

As ondas do ultra-som propagam-se longitudinalmente (a direção da vibração é a mesma da propagação) e transversalmente (a direção do movimento das moléculas do meio é perpendicular à direção da propagação). Ondas longitudinais têm como característica causar pontos de compressão, onde ocorre aumento na concentração das partículas, e de expansão, onde se observa aumento da distância entre as partículas, chamada rarefação (Ziskin *et al.*, 1999). Ondas transversais são amortecidas rapidamente em líquidos e tecidos moles.

Existem dois modos de propagação das ondas ultra-sônicas, contínuo e pulsado. A diferença entre ambos é a interrupção da propagação de energia. No modo contínuo não ocorre essa interrupção,

havendo um depósito ininterrupto de energia sobre os tecidos irradiados. No modo pulsado, há interrupções freqüentes na propagação da energia.

Características das ondas ultra-sônicas

As ondas ultra-sônicas apresentam as mesmas características dos demais tipos de ondas, como comprimento, amplitude, período e freqüência (Ter Haar, 1987).

O comprimento de onda (λ) corresponde à distância entre regiões adjacentes de compressão ou de rarefação máxima, cujas partículas se encontram em um mesmo estado de movimento, em um dado instante de tempo.

Amplitude (A) corresponde ao deslocamento máximo que uma partícula experimenta a partir de sua posição de equilíbrio. Descreve a magnitude do distúrbio causado pela onda.

Período (T) é o intervalo de tempo necessário para que uma partícula realize um ciclo completo de movimento.

Potência (P) é a energia (E) total do feixe em um intervalo de tempo (t), expressa em Watts.

A freqüência (f) corresponde ao número de vezes que uma partícula realiza um ciclo oscilatório por unidade de tempo.

A velocidade de propagação de uma onda (c) é definida como a distância percorrida pela onda por unidade de tempo, dependendo do tipo de onda considerada e das constantes elásticas do meio em que se propaga. Nos tecidos moles do corpo humano a velocidade de propagação da onda ultra-sônica está ao redor de 1.500 m/s. A velocidade de propagação das ondas sonoras decresce dos meios sólidos para os meios líquidos e destes para os gasosos (Young, 1990).

Intensidade e campo acústico

Quando uma onda atravessa um meio, as partículas deste começam a vibrar e adquirem energia cinética. A energia associada à onda ultra-sônica é chamada de intensidade acústica (I) e pode ser definida como a energia (E) que atravessa uma área (S) em um intervalo de tempo (t) (Ter Haar, 1987). É a energia fornecida pelas ondas ultra-sônicas ao atravessar um meio, consistindo na razão média do fluxo de energia que atravessa uma unidade de área de radiação efetiva (ERA) pela unidade de tempo (Watts/cm^2) (Wells, 1977).

A intensidade apresenta características diferentes no campo acústico, caracterizado em duas regiões distintas: o campo próximo, ou zona de Fresnel, e o campo distante, ou zona de Fraunhofer. No campo próximo o tamanho do feixe permanece relativamente constante entretanto, há variações da intensidade dentro dessa zona. No campo distante, o feixe diverge e torna-se mais uniforme. A Figura 3 ilustra o campo próximo com a transição para o campo distante.

A área de irradiação efetiva (ERA) é relativamente menor que a área do transdutor que está em contato com a pele (Hoogland, 1986).

Os circuitos de equipamentos de ultra-som permitem o controle da amplitude da corrente elétrica fornecida ao transdutor. Modificações na amplitude da corrente repercutirão na magnitude das vibrações mecânicas do cristal e, conseqüentemente, na intensidade das ondas sonoras.

Figura 3 Ilustração esquemática da distribuição da intensidade do feixe emitido pelo transdutor de ultra-som (Wells, 1977, p.439)

Impedância acústica

A impedância acústica (Z) é a propriedade de um meio se opor à vibração de suas partículas frente à passagem de ondas ultra-sônicas. Indica a propriedade que as ondas têm de se deslocarem mais facilmente em alguns meios que em outros.

A impedância acústica pode ser expressa de diferentes formas. No entanto, usa-se comumente a impedância acústica característica do meio ou condutância acústica, que é obtida pelo produto da intensidade do meio pela velocidade do som no mesmo ($Z = p.c$).

A Tabela 1 mostra a impedância acústica característica de diversos meios, assim como suas densidades e as velocidades da onda ultra-sônica nesses meios.

Tabela 1 Propriedades acústicas típicas de vários meios

Meio	Densidade (g/ml)	Velocidade do som (m/s)	Impedância ($10^6 \text{ kg}^{-2} \text{ ms}^{-1}$)
Ar	1,293	331,5	429
Água (20°)	1,0	1480	1,52
Plasma sanguíneo	1,06	1570	1,62
Gordura	0,92	1460-1470	1,35
Fígado	1,06	1540-1585	1,63-1,68
Músculo	1,07	1545-1630	1,65-1,74
Osso	1,38-1,81	2710-4080	3,75-7,38

Fonte: Bassoli, 2001, p.27.

Reflexão e refração

Quando uma onda sonora encontra uma interface entre dois meios diferentes, parte da energia é refletida e parte é refratada (Figura 4). A onda refletida retorna em direção negativa através do meio incidente com a mesma velocidade de propagação e a onda refratada continua em direção positiva, mas com sua velocidade alterada em função das características do meio (Wells, 1977).

Figura 4 Reflexão e refração de uma radiação ao atravessar meios diferentes (Low & Reed, 2001)

Interferências e ondas estacionárias

As ondas ultra-sônicas podem apresentar um fenômeno exclusivo dos movimentos ondulatórios denominado interferência. Esta corresponde à combinação de duas ou mais ondas em um ponto do meio onde se propagam, podendo ser construtiva ou autodestrutiva.

A interferência construtiva ocorre com a superposição de ondas que se somam, adquirindo assim maior amplitude. A interferência autodestrutiva ocorre com a superposição de ondas com sinais invertidos, tendendo portanto a se anularem.

Essas interferências ocorrem, por exemplo, quando há reflexão de ondas com a formação de ondas estacionárias. Estas são formadas quando há interação entre a onda incidente e a onda refletida, podendo se anular ou se somar, gerando áreas de alta densidade em um ponto específico do tecido em que as ondas incidem (Wells, 1977).

Deve-se evitar a formação das ondas estacionárias, pois a formação de ondas construtivas pode elevar muito a intensidade, danificando os tecidos.

Mecanismos de atenuação

A atenuação é a diminuição da intensidade em função da distância da fonte sonora, e ocorre devido a fatores geométricos (dimensão da fonte sonora, comprimento de onda, presença de superfícies refletoras, etc.), por mecanismos de absorção (viscosidade) e modo de propagação da onda. Estes mecanismos possuem características diferentes de acordo com o meio. Nos tecidos biológicos a atenuação deve-se principalmente aos mecanismos de absorção, mecanismos pelos quais a energia mecânica das ondas ultra-sônicas é convertida em calor (Ter Haar, 1978). Segundo este mesmo autor, o coeficiente de absorção (α) é diretamente

proporcional à frequência, quanto maior a frequência, mais rápida é a absorção (Ter Haar, 1987).

A Tabela 2 mostra o coeficiente de atenuação para a frequência de 1 MHz em diferentes meios:

Tabela 2 Atenuação da onda ultra-sônica a 1 MHz por diversos tecidos

Tecido	Atenuação (%/cm)
Sangue	3
Gordura	13
Músculo	24
Vaso sanguíneo	32
Pele	39
Tendão	59
Cartilagem	68
Osso	96

Fonte: Wells, 1977.

Equipamento

O equipamento de ultra-som terapêutico é constituído por duas partes: um circuito elétrico e um transdutor. O circuito elétrico converte a tensão da rede em corrente alternada. O transdutor recebe essa voltagem em corrente alternada que tem a mesma frequência de ressonância do cristal. Desse modo, a energia elétrica é convertida em energia mecânica.

O transdutor é um dispositivo montado em cerâmicas ou cristais piezoelétricos que geram ondas sônicas na frequência determinada pelo material, as quais se propagam através dos tecidos do corpo humano e produzem efeitos terapêuticos por vibração no tecido, principalmente em nível molecular (Allen & Battye, 1978; Hoogland, 1986; Ziskin *et al.*, 1999).

A frequência com que o transdutor irá vibrar é a mesma da oscilação das cargas elétricas da corrente. Os equipamentos no Brasil operam na frequência de 1 MHz e 3 MHz. Já está bem estabelecido na literatura que

quanto maior a frequência da onda ultra-sônica, menor será sua penetração nos tecidos e maior a absorção na superfície destes (Maxwell, 1992; Starkey, 1999; Ziskin *et al.*, 1999). A área de radiação efetiva (ERA) é relativamente menor que a área do transdutor que estará em contato com a pele (Hoogland, 1986).

Mecanismos terapêuticos

Os efeitos biológicos da ação do ultra-som dependem de muitos fatores físicos e biológicos, tais como intensidade, tempo de exposição, estrutura espacial e temporal do campo ultra-sônico; e estado fisiológico do tecido que vai ser submetido ao ultra-som. Esse grande número de variações complica a compreensão exata do mecanismo de ação do ultra-som na interação com os tecidos biológicos (Sarvazyan, 1983).

Independente do tipo de mecanismo de interação que está agindo no tecido biológico estudado, o objetivo principal tem sido estabelecer limiares para a intensidade ultra-sônica, abaixo dos quais não ocorram efeitos lesivos (Ferrari, 1987).

Os mecanismos físicos envolvidos na terapêutica do ultra-som que induzem respostas clinicamente significantes sobre as células, tecidos, órgãos e organismos são geralmente classificados em mecanismos térmicos e mecânicos (Dyson, 1987). Esses mecanismos e seus efeitos estão diretamente relacionados com os parâmetros físicos do ultra-som, como o tempo e a técnica de aplicação.

Mecanismo mecânico

É de natureza mecânica o primeiro efeito provocado da interação do US com o tecido biológico. Os efeitos não-térmicos incluem a cavitação, microvibrações e correntes acústicas (Dyson, 1982).

Cavitação é o termo usado em geral para descrever as atividades de microbolhas em um meio contendo líquido (sangue ou fluídos dos tecidos), quando estimulado acusticamente. A cavitação compreende formação, crescimento, colapso e efeitos (físicos, químicos e biológicos) associados às bolhas (Frizzel & Dunn, 1984).

Essas bolhas de gás formadas no tecido biológico com a passagem de ondas ultra-sônicas podem permanecer intactas por muitos ciclos (cavitação estável) ou entrar em colapso liberando grande quantidade de energia (cavitação transiente) (Wells, 1977). Na cavitação estável, as bolhas crescem pouco ou moderadamente durante cada ciclo acústico, podendo, ao atingir determinado tamanho relacionado com a frequência sonora empregada, entrar em ressonância, resultando em microvibrações estáveis, permanecendo intactas. Na cavitação transiente, núcleos de gases crescem subitamente no meio, sob influência das altas intensidades que causam uma grande variação da pressão acústica, e acabam por colapsar violentamente resultando em lesões teciduais (Ferrari, 1987; Ter Haar, 1987; Starkey, 1999).

Não existem evidências que ocorram efeitos danosos de cavitação *in vivo* em tecidos tratados com ultra-som de baixa intensidade (Dyson, 1990). Lehmann (1965), utilizando ultra-som contínuo de 1 MHz, observou que, a partir da intensidade de 1 W/cm^2 , ocorre a cavitação transiente. No entanto, isso também pode ser gerado nos fluídos se as condições de irradiação permitirem a formação de ondas estacionárias, como resultado das ondas incidentes e refletidas. Segundo Ter Haar (1987), a movimentação contínua do cabeçote do US durante a irradiação do tecido biológico evitaria a formação das ondas estacionárias.

As correntes acústicas são o resultado da cavitação estável e produzem uma constante circulação de fluídos, localizados ao redor das bolhas e, conseqüentemente, adjacentes às membranas celulares e suas

organelas. Esse fluxo líquido tem valor terapêutico, uma vez que causa mudanças na permeabilidade da membrana e assim facilita a passagem de cálcio, potássio e outros metabólitos para dentro ou para fora das células (Kitchen & Partridge, 1990).

Segundo Starkey (1999), dependendo do tipo de célula, a alteração iônica produzida pode desenvolver alterações na síntese e secreção celular, como por exemplo a síntese de colágeno, com secreção de fatores quimiotáticos e aumento da atividade fibroblástica durante o processo de cicatrização tecidual.

Mecanismo térmico

A micromassagem dos tecidos, devido ao efeito mecânico (vibrações sônicas) que o US provoca, gera calor por fricção (Hoogland, 1986). Segundo Lehmann e De Lateur (1994), para se atingir um efeito terapêutico útil por aquecimento, a temperatura tecidual precisa ser mantida entre 40°C e 45°C por pelo menos 5 minutos.

O aquecimento local produzido pelo ultra-som depende do tipo de tecido (os tecidos altamente protéicos absorvem energia mais prontamente do que aqueles com alto teor de gordura), do fluxo sangüíneo que irriga o local (uma vez que o calor produzido pode ser dissipado por corrente sangüínea), da intensidade do ultra-som, do tempo de aplicação, das dimensões do corpo aquecido, da técnica de aplicação (estacionária ou móvel) e da freqüência ultra-sônica aplicada (as altas freqüências têm maior absorção) (Dyson, 1987).

O aumento da temperatura provoca um aumento temporário na extensibilidade das estruturas altamente colagenosas, como os tendões, ligamentos e cápsulas articulares, e uma redução na dor e espasmos musculares, além de produzir uma reação inflamatória branda.

Com os parâmetros do feixe ultra-sônico otimizados para o uso terapêutico em tecidos superficiais (média e baixa intensidades e altas frequências), o aumento local da temperatura é da ordem de centésimos de grau até pouco mais de 1° C (Dyson & Suckling, 1978).

Efeitos terapêuticos na fase inflamatória da regeneração

Há evidências de que o ultra-som pode interagir com células inflamatórias (como plaquetas, mastócitos, macrófagos e neutrófilos), influenciando sua atividade e levando à aceleração do reparo. Vem sendo mostrado que forças de correntes acústicas produzem alterações na permeabilidade da membrana das plaquetas, levando à liberação de serotonina (Williams, 1974). Além da serotonina, as plaquetas contêm fatores de crescimento essenciais para o reparo bem-sucedido e, se a formação de correntes pode estimular a liberação de serotonina, pode também influir na liberação desses outros fatores.

Uma das principais substâncias químicas que modifica o ambiente da ferida no momento após a lesão é a histamina. Os mastócitos são a principal fonte desse fator, que é normalmente liberado num processo conhecido como degranulação de mastócitos. Nesse processo, a membrana da célula, em resposta aos níveis aumentados de cálcio intracelular (Yurt, 1981), rompe-se e libera histamina e outros produtos no local da ferida. Tem sido mostrado que um único tratamento de ultra-som terapêutico, quando aplicado logo após a lesão (ou seja, durante o início da fase inflamatória), pode estimular os mastócitos a se degranularem, liberando assim histamina nos tecidos ao redor.

Existem claras evidências de que o ultra-som terapêutico pode alterar a permeabilidade da membrana a vários íons. A habilidade de afetar o transporte de cálcio através das membranas celulares é de significância clínica considerável, pois o cálcio, em seu papel de segundo mensageiro,

pode ter um efeito profundo na atividade celular, por exemplo aumentando a síntese e secreção de fatores pelas células envolvidas no processo de regeneração.

Pesquisas mostram que o ultra-som encoraja a ocorrência mais rápida da formação de edema, acelerando o processo inflamatório como um todo e conduzindo a ferida mais cedo para a fase proliferativa de reparo, sendo possível que muitos relatos de alívio de dor sejam devidos a isso (Kitchen, 2003). Hart (1993) também encontrou que, após a exposição *in vitro* dos macrófagos ao ultra-som, um fator era liberado no meio e ao redor da ferida, que era mitogênico para fibroblastos.

A confirmação dessa explicação foi mostrada experimentalmente por Young e Dyson (1990) em feridas cirúrgicas agudas, onde o ultra-som terapêutico (1 W/cm², 0,75 MHz ou 3 MHz), era aplicado diariamente sobre a ferida durante sete dias (5 minutos por dia). Cerca de cinco dias após a lesão, os grupos tratados com ultra-som tinham significativamente menos células inflamatórias no leito da ferida e tecido de granulação mais extenso do que os controles que receberam irradiação simulada. Também o alinhamento dos fibroblastos paralelos à superfície da ferida nos grupos tratados era indicativo de um estágio mais avançado de organização do tecido do que o alinhamento aleatório de fibroblastos visto nas feridas controle, irradiadas de forma placebo. Portanto, parece que a terapia com o ultra-som pode acelerar o processo sem risco de interferir nos mecanismos de controle que limitam o desenvolvimento de granulação.

Não há informações científicas ou clínicas quantitativas que indiquem a necessidade de se usarem níveis altos de ultra-som (acima de 1 W/cm²) para causar um efeito biológico significativo nos tecidos lesados. Pelo contrário, os resultados de Kitchen (2003) apóiam o uso de intensidades de 0,5 W/cm² e menores, para obter taxas máximas de regeneração em

tecidos como pele, tendões e ossos. Observou também que intensidades acima de $1,5 \text{ W/cm}^2$ levaram a um efeito adverso nos tecidos de regeneração, concluindo assim que os efeitos térmicos significativos são obtidos usando intensidades entre $0,5$ e 1 W/cm^2 , e que o tratamento abaixo de $0,5 \text{ W/cm}^2$ deve ser usado para provocar mecanismos primariamente não-térmicos.

Lehmann (1953) estudou os efeitos térmicos do ultra-som por sua ação nos tecidos biológicos, em resposta à irradiação de intensidades de $1,5$ a $3,1 \text{ W/cm}^2$ e observou reações como hiperemia combinada com edema e necrose. Todas essas reações foram dependentes da temperatura, pois quando o tecido era resfriado, nenhuma reação era observada.

Após lesão muscular do reto femoral em coelhos, Dionísio (1998) observou os efeitos do ultra-som na vascularização, utilizando ultra-som no modo pulsado 1:2, com frequência de 1 MHz , intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$, durante 5 minutos, iniciando 24 horas após a lesão, por 10 dias consecutivos. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas na rede vascular, sugerindo que o ultra-som não provoca mudanças no padrão vascular.

Com a finalidade de investigar os efeitos do ultra-som sobre a reparação tecidual, Dyson (1970) utilizou o ultra-som pulsado com frequência de $3,5 \text{ MHz}$ e intensidade entre $0,1$ e $0,8 \text{ W/cm}^2$ por 5 minutos, 14 dias após a produção de lesões cutâneas em orelhas de coelhos. Observou o aumento da síntese de DNA e a presença de fibroblastos produzindo colágeno.

Nascimento *et al.* (2002), estudaram o efeito do ultra-som na fase inflamatória da regeneração; utilizaram o modo pulsado, com frequência de 1 MHz , intensidades de $0,2$ e $0,4 \text{ W/cm}^2$, com tempo de aplicação de 60 segundos, durante 1, 3, 7 e 14 dias, sobre músculo lesado de ratos e

concluíram que o tratamento com o US contribuiu para que o infiltrado de células polimorfonucleares (PMN) ocorresse de forma mais intensa, o que é benéfico, pois acelera o processo de regeneração do tecido lesado pela antecipação da inflamação, proliferação e remodelamento. Observaram que o US com intensidade de $0,2 \text{ W/cm}^2$ favorecia o aparecimento de novos vasos durante a inflamação aguda, e que a intensidade de $0,4 \text{ W/cm}^2$ favorecia o aparecimento de um infiltrado de PMN, linfócitos e macrófagos no foco inflamatório agudo; e, ainda, que havia melhora na consistência da rede de fibrina, favorecendo a proliferação dos fibroblastos no sítio da lesão.

Harvey *et al.* (1975) analisaram a estimulação acentuada na secreção de colágeno dependendo da intensidade e viram que, quando os fibroblastos eram expostos ao ultra-som contínuo ($0,5 \text{ W/cm}^2$), registrava-se um aumento de 20% na secreção de colágeno; e, quando o ultra-som estava no modo pulsado ($0,5 \text{ w/cm}^2$), registrava-se um aumento de 30%. Pospíšilova (1976) investigou a ação do ultra-som na síntese do colágeno e na deposição de granulomas em lesões em ratos e obteve resultados semelhantes. Os animais foram expostos ao ultra-som com uma frequência de 0,8 MHz e intensidade de 1 W/cm^2 , no modo contínuo, por 5 minutos, nas fases aguda (2 a 21 dias) e crônica (16 a 35 dias) da reparação tecidual. O autor observou aumento no conteúdo protéico e na síntese de colágeno, na zona em reparação.

Dyson e Suckling (1978) empregaram o ultra-som pulsado para o tratamento de úlceras varicosas, na frequência de 3 MHz e intensidade de 1 W/cm^2 , por 4 semanas, com duração de 5 a 10 minutos cada aplicação. Sendo as úlceras bilaterais, um dos lados era tratado e o outro não. Demonstraram que houve redução significativa nas áreas das úlceras do lado tratado, em comparação com o lado de controle, concluindo assim

que o ultra-som pode estimular o processo de reparação.

Barros Jr. (2001) avaliou, pela análise histológica, os efeitos precoce e tardio do ultra-som sobre o processo de cicatrização de tendão flexores em coelhos. Foi utilizado o US no modo pulsado (20%), com frequência de 3 MHz, intensidade de 0,8 W/cm², em sessões de 6 minutos, durante 7 dias consecutivos, iniciando 24 horas após o procedimento cirúrgico. Os resultados mostraram uma diminuição da reação inflamatória, menor grau de necrose, aumento na proliferação de fibroblastos e aumento na deposição de fibras de colágeno na fase tardia da cicatrização do tendão, sinalizando uma ação favorável do ultra-som no reparo de tendões, no período tardio da cicatrização.

O tecido muscular parece ter resposta semelhante, como constatou Menezes (1997), que tratou lesões musculares no reto femoral de coelhos com US pulsado, nos 10 primeiros dias após a produção da lesão (fase aguda). O resultado da análise das propriedades mecânicas mostrou que os músculos tratados suportaram maiores cargas e deformação máxima, e maiores cargas e deformação no limite de proporcionalidade, sugerindo que o US beneficiou o processo de reparação.

Dyson *et al.* (1976) verificaram que a terapia com ultra-som (3 MHz, pulsado, 0,2 W/cm²) acelerava significativamente a redução na área de úlceras varicosas. Callam *et al.* (1987) estudaram o efeito da terapia semanal com ultra-som (1 MHz, pulsado, 0,5 W/cm²) na regeneração de úlceras crônicas na perna e encontraram que ocorria um aumento de 20% na velocidade de regeneração das úlceras tratadas com US.

O estudo de Dyson e Smalley (1983) mostrou que o ultra-som pulsado (3 MHz, 0,5 W/cm²) podia estimular a contração de feridas, levando ao aparecimento de uma cicatriz significativamente menor. Eles também encontraram que o mesmo grau de contração induzida usando

uma intensidade de 0,5 W/cm² podia ser obtido usando uma intensidade muito mais baixa, de 0,1 W/cm². Esse achado foi considerado significativo, pois implica que os profissionais podem reduzir as intensidades de tratamento de ultra-som em um grau significativo e ainda obter os resultados desejados por meio dos efeitos não-térmicos. Isso é vital ao tratar tecidos com o sistema sangüíneo comprometido, que não têm mecanismo efetivo para dispersar o excesso de calor.

Sonoforese

Como mencionado, há mais de 60 anos o ultra-som vem sendo utilizado como agente terapêutico. É usado em fisioterapia no tratamento de uma variedade de situações, incluindo lesões de tecidos moles e inflamação, distúrbios circulatórios e estimulação de reparação de tecidos. Medicamentos antiinflamatórios não-hormonais também são freqüentemente receitados nessas condições e tradicionalmente têm sido administrados oralmente, na forma de comprimidos ou cápsulas. Porém, devido à natureza irritante desses medicamentos ao sistema gastrointestinal, pesquisadores estudam outras maneiras de sua aplicação. O uso tópico de antiinflamatórios não-hormonais na forma de pomada, creme ou gel tem sido indicado no alívio de inflamações dos tecidos.

Para que as ondas ultra-sônicas sejam transmitidas para os tecidos é necessário um meio acoplador, que tem a função de excluir o ar da região entre o transdutor e o tecido (Docker, 1987; Williams, 1987). Os materiais mais utilizados para o acoplamento são a água, géis e alguns óleos (Williams, 1987; Kahn, 1991, Casarotto *et al.*, 2004).

De acordo com Ueda *et al.* (1996), Fang *et al.* (1999) e Miller (2000), o US pode facilitar a penetração de agentes antiinflamatórios aplicados topicamente sobre a pele, técnica esta chamada de sonoforese. Esse

novo conceito de aplicação do US combinado com drogas tópicas tem promovido investigações em muitos campos da medicina: a sonoforese poderia acentuar o efeito da aplicação tópica de anti-inflamatórios.

O primeiro relato da literatura sobre a utilização da técnica de aplicar um antiinflamatório com ultra-som terapêutico, pela técnica da sonoforese, foi descrito por Fellingner e Schmid (1954), sendo o agente de acoplamento a hidrocortisona, em tratamento de poliartrite dos dedos da mão. Pelo fato de a sonoforese ser certamente o método de aplicação terapêutica que vem ganhando maior credibilidade desde então (Cagnie *et al.*, 2003), uma série de estudos e pesquisas foram desenvolvidos tentando esclarecer as melhores formas de uso dessa técnica.

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar o aumento da penetração das drogas pela sonoforese (Fang *et al.*, 1999), entre eles aumento da temperatura, cavitação, bem como pressão de radiação (Tyle & Agrawala, 1989). Acredita-se que o principal mecanismo que envolve a deposição da droga é o fenômeno da cavitação, resultando na formação de microbolhas gasosas na camada externa da pele (estrato córneo) que podem romper-se violentamente e presumivelmente permitir a passagem da droga (Fang *et al.*, 1999; Miller, 2000; Ueda *et al.*, 1996). Considerando isso, é possível que uma desorganização da região lipídica da camada córnea venha a ocorrer (Fang *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 1996; Mitragotri *et al.*, 1995), aumentando sua permeabilidade.

Estudos constataram o efeito da sonoforese aumentando a penetração de pequenas moléculas através da pele (Mitragotri & Kost, 2004). Esses estudos foram executados aplicando o US com frequências terapêuticas (1 a 3 MHz). Porém, o aumento dos níveis do transporte de drogas através da pele foi observado somente com drogas específicas. Foi observado o aumento no transporte de hidrocortisona e indometacina, mas não o de

lidocaína e salicilato (Mitragotri *et al.*, 1997). Devido à grande variação entre as drogas, ainda existem controvérsias sobre a eficácia da sonoforese em aumentar sua penetração através da pele. Os mesmos autores (Mitragotri *et al.*, 1997) sugerem que diferenças de propriedades físico-químicas das drogas, como lipofilicidade e peso molecular, poderiam explicar tal variação. Por exemplo, na sonoforese de drogas lipofílicas, de moléculas pequenas, com alta permeabilidade passiva, não houve aumento de seu transporte após a aplicação com US.

Griffin *et al.* (1967) relataram que os pacientes tratados com sonoforese de hidrocortisona apresentaram uma redução da dor em 68% e aumento da amplitude de movimento, quando comparados ao grupo controle. Nesse estudo não foram avaliados os efeitos da aplicação tópica de hidrocortisona na ausência do US, sendo dessa forma impossível serem comparados ambos os efeitos.

Para permitir comparar tal efeito, Koeke *et al.* (2005) verificaram o processo de reparo no tendão de Aquiles lesado sob quatro condições: aplicação tópica de hidrocortisona, sonoforese com hidrocortisona, ultrassom sem hidrocortisona, e controle sem tratamento. A aplicação do ultrassom foi em modo pulsado com frequência de 1 MHz e intensidade de 0,5 W/cm², com duração de 5 minutos em cada sessão. Eles observaram que a concentração, o estado de agregação, a orientação e a deposição das fibras de colágeno no local da tenotomia foi qualitativamente melhor e significativa no grupo submetido à sonoforese quando comparado ao grupo que recebeu apenas o tratamento com US e ao que recebeu a aplicação tópica da hidrocortisona. O grupo que recebeu tratamento apenas com o US também apresentou resultados melhores quando comparado ao que recebeu a aplicação tópica da hidrocortisona.

McElnay *et al.* (1985) constataram que a penetração transdérmica de alguns anestésicos e antiinflamatórios não-hormonais foram intensificados pelo US, atribuindo esse efeito ao fármaco utilizado.

Singer *et al.* (1998) concluíram que o uso de ultra-som de baixa intensidade e baixa frequência é considerado seguro para aumento da distribuição tópica de medicamentos através da pele, produzindo reações mínimas; e que altas intensidades podem causar lesão relacionada ao aquecimento local.

Mutoh *et al.* (2003) concluíram que a baixa frequência e baixa intensidade da sonoforese são capazes de induzir um aumento da penetração transdérmica de componentes hidrofílicos como a calceína.

Polacow *et al.* (2004) observaram que a aplicação do ultra-som modo contínuo, com frequência de 3 MHz e intensidade de 0,2 W/cm², foi capaz de aumentar a penetração de tiratricol (usado no combate à celulite) através da pele, quando comparado à aplicação tópica do mesmo.

Rosim *et al.* (2004) verificaram que a aplicação do ultra-som modo contínuo, com frequência de 1 MHz e intensidade de 0,5 W/cm², durante 5 minutos, foi capaz de aumentar a penetração transcutânea de diclofenaco sódico através da pele de humanos sadios.

Mitragotri *et al.* (1997) sumarizaram um amplo número de trabalhos que apresentaram tanto resultados positivos quanto negativos da aplicação dessa técnica. Também, segundo Byl (1995), resultados conflitantes têm sido publicados a respeito da intensificação da permeabilidade de drogas através da pele pela sonoforese, alguns não tendo obtido efeito positivo.

Nesse sentido, são necessários ainda estudos sobre a eficácia da aplicação transcutânea de diversas drogas antiinflamatórias com sonoforese. E, se a deposição de droga por ultra-som é uma aplicação

clínica de uso crescente, tal uso ainda padece da escassez de parâmetros precisos, quantificados na literatura, baseados em evidências. Em sua meta-análise, Parizzoto *et al.* (2003) sugerem que pesquisas sobre sonoforese para tratamento de distúrbios musculoesqueléticos detalhem melhor os critérios e parâmetros utilizados, aumentando sua confiabilidade, de modo a que se possa, com o tempo, determinar parâmetros exatos para utilização dessa técnica.

Arnica montana

A *Arnica montana* é uma planta da família Asteraceae, conhecido desde o século XVI. Suas folhas e raízes são utilizadas na fabricação de medicamentos.

É utilizada topicamente no tratamento de hematomas, contusões, flebites, distensões musculares, alívio da dor e edema, cicatrizações, afecções bucais, entre outros (Knussel *et al.*, 2002). Seus princípios ativos mais importantes são lactonas sesquiterpênicas (arnicolide, helenalina e dihidro-helenalina), flavonóides (incluindo quercitina e seus derivados como quercitina-3-mono-glucosídeo e quercitina-3-glicogalacturônico), álcools (arnidiol, arnilenediol, isoarnilenediol), carotenóides, óleo essencial, ácido fenilcarboxílico (assim como ácido clorogênico e seus derivados) e outros constituintes (Bucay, 1995). Destes, as lactonas sesquiterpênicas são os principais, particularmente os ésteres helenalina e dihidro-helenalina, sendo responsáveis por sua atividade antiinflamatória, o que foi demonstrado por vários estudos *in vitro* e *in vivo* (Klaas *et al.*, 2002; Knussel *et al.*, 2002; Bergonzi *et al.*, 2005).

Ao estudar a penetração transdérmica de preparações da planta e de suas lactonas sesquiterpênicas, Wagner *et al.* (2004) concluíram que uma quantidade suficiente dessas últimas pode penetrar a barreira da pele,

gerando efeitos antiinflamatórios, mas que o uso tópico de preparações da planta, como as flores de arnica, pode apresentar vantagens.

A melhor penetração das lactonas sesquiterpênicas da tintura de arnica pode ser favorecida pelos demais constituintes das flores da *Arnica*, como álcoois, monoterpênicos, óleos essenciais, entre outros (Merfort, 2003). Em particular, os monoterpênicos são usados como veículos para penetração de drogas (Moghimi, 1998). A helenalina inibe a migração de neutrófilos, a quimiotaxia e, em altas concentrações, as prostaglandinas sintetase (Hall, 1980). Além disso, lactonas sesquiterpênicas, como a helenalina e altas concentrações da 13-dihidrohelenalina, têm mostrado uma ativação inibitória do fator de transcrição NF- κ B em células T (Kos *et al.*, 2005), em células B e em células epiteliais (Lyss, 1997). NF- κ b tem um papel importante na resposta imune humana, regulando a transcrição de vários genes pró-inflamatórios e inflamatórios (D'Acquisto, 2002).

Não foram encontrados estudos que avaliassem os eventuais benefícios da sonoforese com *Arnica montana*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo n° 745/05).

Animais

Neste experimento foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar, machos, sedentários, pesando em média 300 ± 50 g, com 90 dias de vida. Esses animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Unesp) *campus* Botucatu, SP e mantidos no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da Unesp *campus* Rio Claro, em gaiolas coletivas com no máximo cinco ratos, que foram alimentados com ração balanceada para roedores (Labina®) com 23% de proteína e água *ad libitum*, em condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro; ambiente higienizado; temperatura a 25°C e ventilação controlada).

Grupos experimentais

Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

- ♦ grupo controle: 10 ratos que sofreram lesão muscular, mas não foram submetidos a qualquer forma de tratamento;
- ♦ grupo ultra-som (US): 10 ratos que sofreram lesão muscular e foram tratados com ultra-som;
- ♦ grupo ultra-som+arnica (US+A): 10 ratos que sofreram lesão muscular e foram tratados com sonoforese (ultra-som e gel de arnica);
- ♦ grupo arnica: 10 ratos que sofreram lesão muscular e foram tratados com massagem de gel de arnica.

Lesão muscular

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico a 2%, pesados e tricotomizados na pata posterior direita. A pele foi seccionada, o músculo tibial anterior (TA) e sua fáscia foram expostos. Nestes foi feito um corte de 3 mm de largura por 3 mm de profundidade com auxílio de uma lâmina de bisturi, de maneira a seccionar as fibras transversalmente no terço médio do músculo (Figura 5). Nessas condições, o diâmetro da área lesada foi considerado como sendo de 0,5 cm². Feita a lesão, a pele foi suturada, e no local foi feita assepsia com álcool 70%. Durante os dois primeiros dias, foram oferecidas 20 gotas de dipirona sódica diluída em meio litro de água para todos animais.

Figura 5 Secção transversal das fibras no terço médio do músculo tibial anterior

Equipamento de ultra-som terapêutico

Neste experimento foi usado um aparelho gerador de ondas ultrassônicas (Figura 6), modelo Sonacel[®] da Bioset (Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda.), tendo o cabeçote com área de radiação efetiva (ERA) de 0,5 cm² (Figura 7). Antes de ser utilizado, o aparelho foi calibrado em uma balança radiométrica Ultrasound Power Meter[®] com precisão de ± 20 mW. A área do transdutor é de 1 cm² e o tipo de cristal gerador de ultra-som é a cerâmica PZT.

Figura 6 Equipamento de ultra-som utilizado (modelo Sonacel® da Bioset)

Figura 7 Cabeçote do aparelho de ultra-som com área de radiação efetiva de 0,5 cm²

Gel de arnica

O gel de arnica utilizado é comercializado pelo Herbarium® – Laboratório Botânico Ltda. (Figura 8), preparado com tintura de *Arnica montana*. A dosagem utilizada foi a recomendada pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasil, 2004), que preconiza a aplicação tópica de uma dose diária de 1 mg/ml de lactonas sesquiterpênicas. Considerando a composição do gel, foram aplicados em cada sessão 500 mg do gel.

Figura 8 Gel de *Arnica montana* utilizado (Herbarium)

Protocolo de tratamento

Para a aplicação do US e da arnica, todos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico a 2%.

Os animais dos grupos submetidos ao US foram tratados 24 horas após a cirurgia com os seguintes parâmetros: frequência de 1 MHz,

intensidade de $0,5 \text{ w/cm}^2$ (média temporal e espacial SATA), modo pulsado 1:2 (2 ms *on* e 4 ms *off*, 33%), com tempo de aplicação de 3 minutos a cada sessão. A aplicação (Figura 9) foi feita uma vez ao dia, durante 3 dias. Os animais foram sacrificados 24 horas após a última aplicação.

A fim de excluir o ar entre as interfaces, evitando assim a reflexão da onda ultra-sônica (Casarotto *et al.*, 2004), foi utilizado como agente acoplador um gel hidrossolúvel comercial (500 mg em cada aplicação). No caso do grupo sonoforese (US+A), foi utilizado a mesma quantidade de gel de arnica.

Os animais do grupo arnica receberam massagem com 500 mg de gel de arnica sobre a área lesada durante 3 minutos com a mesma frequência.

Figura 9 Aplicação do ultra-som terapêutico na área de lesão

Coleta do músculo e análise morfológica

Os animais foram submetidos à eutanásia quatro dias após a lesão com dose letal de 20 mg/100g de pentobarbital sódico. O músculo TA dos diferentes grupos experimentais foi removido e seu terço médio, local da lesão, colhido e colocado em um suporte de cortiça com a ajuda de um meio de inclusão para congelamento (*tissue tec*). O conjunto foi envolvido

em talco mineral para ser criofixado em nitrogênio líquido, onde foi mantido e conservado. Os músculos foram congelados em uma posição onde os cortes puderam oferecer imagens transversais e longitudinais das fibras musculares e da fenda incisional.

Para análise morfológica das fibras musculares e do tecido conjuntivo adjacente, foram realizados cortes seriados com a espessura de 10 μm , obtidos em um criótomo a -25°C . Colheram-se uma série de amostras da região superficial da lesão e, a partir daí, mais duas séries localizadas a 200 μm de profundidade da outra. Cada série de corte forneceu três lâminas, que foram coradas com H-E (hematoxilina-eosina). Foi feita a documentação fotográfica das lâminas em fotomicroscópio Zeiss, onde se procurou registrar as alterações morfofuncionais do tecido lesado.

Análise quantitativa

A contagem de células foi feita em uma área de 0,625 mm², com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio e monitor de vídeo. A determinação da densidade de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares foi feita pela contagem de 10 campos por amostra, totalizando 100 campos por grupo experimental. As células com morfologia de fibroblastos e células satélites ou mioblastos foram ignoradas.

Análise estatística

Os dados quantitativos foram comparados pela análise de variância *two-way* Anova tanto intra quanto intergrupos, seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey-Kramer para verificar a significância entre os grupos. Os dados foram processados no aplicativo SAS (Statistical Analysis System) versão 9.1. Os resultados foram expressos em média e erro-padrão. Foram considerados estatisticamente significativos resultados com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados da análise quantitativa e da análise qualitativa das lâminas são apresentados a seguir.

Análise quantitativa

Os resultados obtidos foram analisados intra-grupo e inter-grupo, com o teste variância do tipo fatorial. Quanto às células mononucleares, não foi encontrada diferença significativa intra-grupos, mas diferenças significativas foram encontradas entre os grupos tratados e o grupo controle ($p<0,0001$) e na interação intra- e intergrupos ($p<0,0001$). A Figura 10 mostra os resultados da densidade (média encontrada por μm^2) de células mononucleares para os quatro grupos de animais cujos músculos foram examinados. Os valores foram claramente mais elevados nos grupos US, US+A e arnica quando comparados ao grupo controle ($p<0,0001$).

Figura 10 Densidade (média $\pm$ erro padrão) de células mononucleadas no músculo tibial anterior nos grupos controle, ultra-som (US), ultra-som+arnica (US+A) e arnica. Os grupos tratados (US, US+A e arnica) não apresentaram diferença significativa entre si (*), porém houve diferença significativa ($p<0,0001$) desses grupos quando comparados ao grupo controle (**)

Quanto à densidade das células polimorfonucleares, novamente não foram encontradas diferenças significativas intragrupos, mas diferenças significativas foram encontradas tanto entre os grupos ($p<0,0001$) quanto na interação intra- e intergrupos ($p=0,0134$). A Figura 11 mostra os resultados da densidade (média $\pm$ erro padrão de células por μm^2) nos quatro grupos. A densidade foi nitidamente maior no grupo controle quando comparada à dos demais grupos ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos US e US+A, mas os valores para o grupo arnica foram significativamente diferentes ($p<0,05$) daqueles dos demais grupos.

Figura 11 Densidade (média $\pm$ erro padrão) de células polimorfonucleadas no músculo tibial anterior dos grupos controle, ultra-som (US), ultra-som + arnica (US+A) e arnica. O grupo controle (*) apresentou diferença significativa comparado aos demais grupos ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos US e US+A (**). O grupo arnica (***) comparado aos demais apresentou diferença significativa ($p<0,05$).

Análise qualitativa

As lâminas histológicas, guardando pequenas particularidades entre os grupos, mostraram que o interior da fenda incisional produzida pela lesão cirúrgica e o tecido intersticial ou conectivo próximo aos segmentos seccionados estavam preenchidos por uma delicada rede de fibrina e por um rico infiltrado de células inflamatórias.

No grupo controle, as extremidades das fibras musculares seccionadas e com morfologia comprometida apresentaram núcleo centralizado e grupamentos de células fagocíticas em atividade (Figura 12). Na borda da lesão, um infiltrado de células inflamatórias apresentou-se intenso, chegando a atingir todo o espaço intersticial dessas fibras (Figura 13); no interior surgiu uma fina rede de fibrina (Figura 14). Houve também o aparecimento de inúmeras células fusiformes indiferenciadas, sugestivas de serem células satélites e fibroblastos em proliferação (Figura 15).

Figura 12 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo controle, corado com hematoxilina-eosina – corte transversal: fibra muscular com morfologia comprometida pela lesão apresenta núcleos centralizados (seta preta) e inúmeras células fagocíticas (seta vermelha). Barra = 20 µm

Figura 13 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo controle, corado com hematoxilina-eosina: intenso infiltrado de células inflamatórias no interstício das fibras musculares localizadas na borda da lesão. Barra = 40 μ m

Figura 14 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo controle, corado com hematoxilina-eosina: presença de células polimorfonucleares e mononucleares aderidas à rede de fibrina no interior da fenda incisional. Barra = 20 μ m

Figura 15 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo controle, corado com hematoxilina-eosina: presença de células fusiformes (seta preta) sugestivas de células satélites e fibroblastos (seta vermelha) distribuídos no sentido longitudinal das fibras musculares. Barra = 40 μ m

No músculo dos animais do grupo ultra-som, o tecido conjuntivo mostrou-se mais organizado e consistente. A fenda da lesão, diferentemente do grupo controle, apresentava pequenos vasos sangüíneos entre as fibras que iniciaram sua regeneração e entre fragmentos necróticos das fibras em estado de degeneração (Figura 16). Próximo à região da borda da lesão apareceram células fusiformes em proliferação, sugerindo o início da formação e diferenciação das células satélites em mioblastos (Figura 17). Nesse grupo pôde ser notado um aumento na espessura da rede de fibrina (Figura 18), quando comparada à do grupo controle, e a presença de células gigantes multinucleadas (Figura 19), o que sugere a ocorrência intensa de fagocitose, acelerando o processo inflamatório.

Figura 16 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som, corado com hematoxilina-eosina: fenda incisional com número abundante de células inflamatórias entre fibras em estado necrótico. Pode ser notada a presença de um pequeno vaso no tecido conjuntivo (seta). Barra = 40 μ m

Figura 17 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som, corado com hematoxilina-eosina: células fusiformes em proliferação sugerindo o início da formação dos mioblastos (setas). Barra = 40 μ m

Figura 18 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som, corado com hematoxilina-eosina: rede de fibrina mais espessa quando comparada ao controle. Aderidas a ela podem ser identificadas algumas células polimorfonucleares e mononucleares. Barra = 20 μ m

Figura 19 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som, corado com hematoxilina-eosina: presença de células gigantes multinucleadas em meio ao tecido necrótico (seta). Barra = 20 μ m

No músculo dos animais de grupo ultra-som+arnica, o tecido conjuntivo recém-formado na fenda incisional apresentou-se preenchido por infiltrado

inflamatório (Figura 20). Os leucócitos aderidos à espessa rede de fibrina já estavam picnóticos, com suas atividades fagocíticas esgotadas, demonstrando seu estado relativamente avançado de degeneração (Figura 21). Na região próxima à fenda incisional verifica-se a presença de infiltrado inflamatório composto predominantemente por células polimorfonucleares do tipo neutrófilo (Figura 22) e, na matriz do tecido conjuntivo, por células mononucleadas como macrófagos, plasmócitos e mastócitos (Figura 23).

Figura 20 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som+ arnica, corado com hematoxilina-eosina: matriz extra-celular do tecido conjuntivo mostra um intenso infiltrado inflamatório em meio ao tecido necrótico. Barra = 20 µm

Figura 21 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som+ arnica, corado com hematoxilina-eosina: rede de fibrina espessa com leucócitos picnóticos a ela aderidos. Barra = 40 μ m

Figura 22 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som+ arnica, corado com hematoxilina-eosina: infiltrado localizado no interior da fenda incisional, com a presença marcante de células polimorfonucleares (setas). Barra = 5 μ m

Figura 23 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo ultra-som+arnica, corado com hematoxilina-eosina: células mononucleares predominantes na matriz do tecido conjuntivo próximo às fibras musculares seccionadas (setas). Barra = 5 μ m

No grupo arnica, além de algumas células polimorfonucleares e mononucleares, houve o aparecimento de fibroblastos, aderidos à rede de fibrina (Figura 24) e a presença de leitos vasculares (Figura 25), o que não se repetiu nos outros grupos. Estes são espaços sem formação de células endoteliais, por onde passa o sangue durante a fase de reparo. Na região onde as fibras musculares foram seccionadas, os fragmentos necróticos foram tomados por numerosos leucócitos, como neutrófilos e macrófagos em atividade fagocitária (Figura 26). No delicado tecido conjuntivo que começou a se formar, nota-se que células inflamatórias, fibroblastos e células satélites, estavam distribuídas de maneira desordenada (Figura 27), o que poderia dificultar a organização dos mioblastos no sentido longitudinal do eixo das fibras, atrasando ou prejudicando a formação de miotubos.

Figura 24 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo arnica, corado com hematoxilina-eosina: fibroblastos (seta verde) presentes, dentre inúmeras células polimorfonucleares (seta vermelha) e mononucleares (seta preta). Barra = 20 μ m

Figura 25 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo arnica, corado com hematoxilina-eosina: presença de leitos vasculares na matriz extra-celular (seta). Barra = 20 μ m

Figura 26 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo arnica, corado com hematoxilina-eosina: fragmentos necróticos tomados por numerosas células inflamatórias com predomínio de neutrófilos e macrófagos. Barra = 20 μ m

Figura 27 Fotomicrografia de músculo tibial anterior de rato do grupo arnica, corado com hematoxilina-eosina: na região próxima às fibras musculares seccionadas por entre o infiltrado inflamatório, observam-se fibroblastos (seta preta) e células satélites (seta vermelha) distribuídas de maneira desordenada. Barra = 20 μ m

6 DISCUSSÃO

Como os neutrófilos e macrófagos são as principais células de um processo inflamatório agudo (Grounds, 1987; Armstrong, 1990; Hawke & Garry, 2001; Pizza *et al.*, 2002), decidiu-se verificar neste trabalho suas densidades após os tratamentos recebidos.

Os parâmetros para aplicação do ultra-som foram retirados da literatura consultada. Foi escolhida a frequência terapêutica do transdutor de 1 MHz de modo a que onda alcançasse o tecido muscular. A intensidade aplicada foi de $0,5 \text{ w/cm}^2$, com base nos resultados obtidos por Enwemeka *et al.* (1990), Gan *et al.* (1995) e Cunha *et al.* (2001), que sugerem o uso de intensidades de $0,5 \text{ w/cm}^2$ ou menores para obter taxas máximas de regeneração em tecidos. Devido ao fato de o aumento da permeabilidade do extrato córneo da epiderme ser causado pelo efeito não-térmico de cavitação do US, foi escolhida a modalidade de aplicação pulsada. Love e Kremkau (1980) mostraram que o tratamento com o US pulsado poderia causar um aquecimento nos tecidos inferior a $0,5^\circ\text{C}$, com 10 minutos de exposição. E o tratamento foi iniciado 24 h após a lesão para maximizar o efeito de regeneração do US, pois, segundo Markert *et al.* (2005), o início do tratamento antes das primeiras 24 h poderia levar a um aumento da ação degenerativa dos neutrófilos.

Nas lâminas do grupo controle, 96 h após a lesão muscular, foi observada uma densidade maior de células mononucleares (Figura 10) e menor de células polimorfonucleares (Figura 11). Isso está de acordo com os achados de Tidball (1995), que descreve um predomínio de células mononucleares 48 h após a lesão. Esse infiltrado inflamatório intenso foi verificado entre as fibras musculares seccionadas (Figura 13), sendo também observada a presença de células fusiformes, prováveis células satélites e fibroblastos em proliferação (Figura 15). Esses achados

coincidem com o que é indicado por Hawke e Garry (2001), segundo os quais as células satélites começam a se diferenciar em mioblastos e miotúbulos 96 h após uma lesão.

A contagem de células nas lâminas do grupo ultra-som mostrou uma densidade maior de células mononucleares (Figura 10) e menor de polimorfonucleares (Figura 11) do que nas do grupo controle, sendo que a densidade das células mononucleares foi maior que a das polimorfonucleares. Esses achados corroboram os de estudos (Speed, 2001; Kitchen & Partridge, 2003), que mostram a capacidade de o US acelerar as fases da inflamação: nesse grupo, a fase de reparo está adiantada em relação ao grupo controle. O padrão histológico das lâminas do grupo US mostra como o tecido conjuntivo começou a se organizar com mais consistência e a rede de fibrina apresentou-se mais espessa, porém em menor extensão (Figura 18). A presença de células gigantes multinucleadas, que nada mais são do que macrófagos fundidos (Figura 19), demonstram a intensa atividade fagocítica na região. Nessa etapa, iniciou-se a regeneração das fibras lesadas (Figura 17), com o conseqüente aumento da presença de células satélites. Isso pode ser um indicativo de um aumento na velocidade de formação e diferenciação dos mioblastos (Figura 17). Esses achados não foram observados no grupo controle.

Nas lâminas do grupo arnica, verificou-se uma densidade maior de células mononucleares (Figura 10) e menor de células polimorfonucleares (Figura 11) quando comparadas às do grupo controle. Esses resultados podem ser justificados pela ação antiinflamatória dos princípios ativos da arnica, a helenalina e dihidro-helanina, que inibem o fator de transcrição NF-kB (que regula a transcrição de várias citocinas inflamatórias), inibindo assim a migração e quimiotaxia de neutrófilos e, em grande dose, a síntese de prostaglandinas (Hall *et al.*, 1980; Tak & Firestein, 2001).

Segundo Wagner *et al.* (2004), o aumento da penetração das lactonas sesquiterpênicas da tintura de arnica pode ser causado pelos componentes oleosos das flores de arnica, em particular os monoterpenos, que facilitam a passagem transdérmica da droga. Os componentes do óleo essencial da tintura de arnica podem então também ser responsáveis pelo aumento de sua penetração.

Por outro lado, sabe-se que a atuação de um antiinflamatório por um período prolongado de tempo pode levar ao atraso na recuperação e à perda funcional em animais lesados (Toumi & Best, 2003). O músculo dos animais do grupo arnica apresentou características histológicas que sugerem a possibilidade de haver um atraso no reparo tecidual, tais como a distribuição desordenada de células inflamatórias, fibroblastos e células satélites, que podem dificultar a organização dos mioblastos no sentido longitudinal das fibras e atrasar a formação dos miotubos, que raramente foram encontrados nesse grupo (Figura 27).

O grupo ultra-som+arnica não apresentou diferença significativa na densidade de células mononucleares (Figura 10) e polimorfonucleares (Figura 11), quando comparado ao grupo ultra-som; ambos os grupos apresentaram o mesmo efeito pró-inflamatório, acelerando a chegada das células mononucleares ao local da lesão (Figura 20). O número de células polimorfonucleares foi menor quando comparado ao do grupo controle, mas ainda superior ao do grupo da arnica (Figura 11). O padrão histológico desse grupo também se assemelhou ao do grupo US, apresentando uma rede de fibrina mais espessa; os leucócitos encontravam-se em avançado estado de degeneração ou picnóticos (Figura 21), o que sugere que essas células estavam com sua atividade fagocítica esgotada, lançando dúvida quanto à possível aceleração do processo de regeneração. Esses achados apontam para a ineficácia da sonoforese com arnica, na medida

em que a similaridade dos resultados entre sonoforese e apenas ultra-som mostra que o gel de arnica aplicado com ultra-som não só não produziu nenhum efeito antiinflamatório a mais, como também pode ter sido até menos eficaz que o ultra-som.

Segundo Tachibana e Tachibana (2001), a cavitação, além de possibilitar um aumento da penetração de drogas nas células pela alteração da permeabilidade das membranas, pode também causar uma alteração nas propriedades químicas das drogas – o que pode ter ocorrido com a molécula de arnica. Esta pode ter sofrido uma alteração estrutural que tenha levado à inativação da ação de seus princípios ativos, resultando em uma diminuição da ação terapêutica do medicamento.

Os efeitos não-térmicos do US, como a cavitação, de acordo com Ciccone *et al.* (1991), podem ser capazes de influenciar o transporte da membrana celular, mas também podem ser deletérios, caso a estrutura da membrana já tenha sido previamente comprometida, o que poderia acelerar ainda mais os mecanismos inflamatórios. Isso também pode ter ocorrido no presente estudo, considerando a lesão prévia a que os ratos foram submetidos. Segundo Mitragotri (2001), a permeabilidade do extrato córneo à passagem de drogas pela bicamada lipídica é determinada por dois importantes coeficientes, de divisão e difusão, e ambos podem ser aumentados ou diminuídos pela ação do US. Na literatura há numerosos relatos de medidas da permeabilidade de diversas drogas, mas não há informação alguma sobre a permeabilidade da *Arnica montana* nem da influência que esta sofre sob a ação do US.

Os dados sugerem pois que a *Arnica montana* tem efeito antiinflamatório *quando utilizada topicamente* em lesão muscular aguda. No entanto, na sonoforese com arnica, efeitos não-térmicos do ultra-som podem ter alterado a estrutura molecular da arnica, causando inativação

de seus princípios ativos, bloqueando sua ação terapêutica; ou pode mesmo ter agravado ainda mais o quadro inflamatório dos músculos previamente lesados.

Novos estudos devem ser realizados sobre sonoforese com *Arnica montana*, a fim de se melhor compreender tanto os presentes achados quanto seus efeitos no processo inflamatório subsequente à lesão muscular.

7 CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos propostos para este estudo, pode-se concluir o seguinte:

- ♦ Os resultados da contagem e verificação da densidade de células inflamatórias mostram valores nitidamente mais elevados da densidade de células mononucleares nos grupos US, US+A e arnica (sem diferença entre estes), quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$), que apresentou menor densidade. Isso indica que houve aceleração do processo de regeneração nos grupos tratados, em relação ao grupo que não recebeu tratamento. No grupo controle também foi verificada maior densidade de células polimorfonucleares em relação aos demais, como esperado. No entanto, não foi verificada diferença entre os grupos US e US+A, sugerindo que ambos os tratamentos tiveram efeito similar. E no grupo tratado só com massagem de arnica a densidade das células polimorfonucleares foi significativamente menor, sendo este o efeito esperado de um antiinflamatório
- ♦ A análise morfológica comparativa entre os tecidos lesados dos quatro grupos mostrou que, enquanto no grupo controle um intenso infiltrado inflamatório entre as fibras musculares seccionadas, além das prováveis células satélites e fibroblastos em proliferação, sugeriam a vigência do processo inflamatório natural, nos grupos tratados com ultra-som e sonoforese o tecido conjuntivo apresentou-se com mais consistência, com a presença de células gigantes multinucleadas, demonstrando intensa atividade fagocítica na região da lesão, sugerindo aumento na velocidade de formação e diferenciação dos mioblastos e da conseqüente regeneração das fibras lesadas. Os tecidos do grupo tratado com arnica tópica apresentaram

características histológicas que sugerem a possibilidade de haver um atraso no reparo tecidual, o que também pode ser esperado como efeito de um antiinflamatório, devido ao fato de este diminuir a chegada de células de defesa ao local da lesão.

Entretanto, como mais uma vez não houve diferença entre os grupos US e US+A, pode-se concluir que a sonoforese com arnica não foi mais eficaz que o ultra-som na recuperação da lesão muscular. Sugere-se que o US pode ter anulado ou minimizado o efeito regenerativo da *Arnica montana* por sonoforese na fase inflamatória aguda da lesão muscular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen KGR, Battye CK. Performance of ultrasonic therapy instruments. *Physiotherapy* 1978;64(6):174-9.
- Brasil. Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação em Vigilância Sanitária. Resolução nº 89, de 16 de março de 2004. Lista de registro simplificado de fitoterápicos. Diário Oficial da União 18 mar 2004 [citado 8 fev 2005]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
- Armstrong RB. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc* 1990;22:429-35.
- Armstrong CF, Fischman DA. Morphogenesis of skeletal muscle fibers. In: Engel AG, Banker BQ. *Myology: basic and clinical*. New York: McGraw-Hill; 1994.
- Barros Jr EA. Os efeitos do ultra-som na cicatrização de tendões flexores de coelhos após tenorrafia [dissertação]. Ribeirão Preto: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2001.
- Bassoli DA. Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2001.
- Bergonzi MC, Bilia AR, Casiraghi A, Cilurzo F, Minghetti P, Montanari L, et al. Evaluation of skin permeability of sesquiterpenes of an innovative supercritical carbon dioxide arnica extract by HPLC/DAD/MS. *Pharmazie* 2005;60:36-8.
- Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel AG, Banker BQ. *Myology: basic and clinical*. New York: McGraw-Hill; 1994. v.1, p.97-104.
- Brasileiro Filho G. *Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- Brown MRC, Holland RL, Hopkins WG. Motor nerve sprouting. *Annu Rev Neurosci* 1981;4:17-42.
- Bucay JW. Algunas notas sobre la planta medicinal Arnica montana. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 1995;33:312-26.
- Byl, NN. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. *Phys Ther* 1995;75:539-53.
- Cagnie B, Vinck E, Rimbaut S, Vanderstraeten G. Phonophoresis versus topical application of ketoprofen: comparison between tissue and plasma levels. *Phys Ther* 2003;83:707-12.
- Carlson BM, Faulkner JA. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Med Sci Sports Exerc* 1983;15:187-98.

- Carlson BM, Hansen-Smith FM, Magon DK. The life history of a free muscle graft. In: Mauro A. Muscle regeneration. New York: Raven Press;1979. p.365-83.
- Casarotto RA, Adamowski JC, Fallopa F, Bacanelli F. Coupling agents in therapeutic ultrasound: acoustic and thermal behavior. Arch Phys Med Rehabil 2004;85:162-5.
- Ciccone CD, Leggin BG, Callamaro JJ. Effects of ultrasound and trolamine salicylate phonophoresis on delayed-onset muscle soreness. Phys Ther 1991;71:666- 75.
- Crepon F. Eletrofisioterapia e reeducação funcional. São Paulo: Lovise; 1996.
- Cunha A, Parizotto NA, Vidal BC. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendon calcaneus) of the rat. Ultrasound Med Biol 2001;27:1691-96.
- D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of nuclear factor kappa b: an emerging theme in anti-inflammatory therapies. Mol Interv 2002; 2:22-35.
- Dionísio VC. O efeito do ultra-som terapêutico na vascularização pós-lesão muscular experimental em coelhos [dissertação]. Ribeirão Preto: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1998.
- Docker MF. A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound. Physiotherapy 1987; 73:154-5.
- Dubowitz V, Brooke MH, Neville HE. Histological and histochemical stains and reactions. In: Dobowitz, V. Muscle biopsy: a modern approach. London: W. B. Saunders; 1985. p.20-33.
- Dyson M. Stimulation of tissue regeneration by pulsed plane-wave ultrasound. IEEE Trans Sonics Ultrasonics 1970;17:133-40.
- Dyson M. Non-thermal cellular effects of ultrasound. Br J Cancer 1982; 45:116-20.
- Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. Physiotherapy 1987; 73:116-128.
- Dyson M. Role of ultrasound in wound healing. In: Kloth LC, editors. Alternatives in wound management. Philadelphia: F. Davis; 1990. p.259-84.
- Dyson M, Franks C, Suckling J. Stimulation ok healing varicose ulcers by ultrasound. Ultrasonics 1976;14:232-6.
- Dyson M, Pond JB, Josefh J, Warwick R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. Clin Sci 1968; 35:273-85.
- Dyson M, Smalley DS. Effects of ultrasound on wound contraction. In: Miller R, Corbert U, editors. Ultrasound interactions in biology and medicine. New York: Plenum Press; 1983. p.151-8.
- Dyson M, Suckling J. Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. Physiotherapy 1978, 64:105-8.

- Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendonza S. The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Med Biol* 1990; 16:801-7.
- Fang JY, Fang CL, Sung KC, Chen HY. Effect of low-frequency ultrasound on the in-vitro percutaneous absorption of clobetasol 17-propionate. *Int J Pharm* 1999; 9:33-42.
- Ferrari AL. Estudos dos mecanismos de cavitação em meio biológico [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1987.
- Fischman DA. The development of striated muscle. In: Bourne G. The structure and function of muscle. New York: Academic Press; 1972.
- Frizzel LA, Dunn F. Biophysics of ultrasound. In: Lehman JF. Therapeutic heat and cold. London: Williams & Wilkins; 1984.
- Frizzel LA, Linke CA, Carstensen L, Fridt CW. Thresholds for focal ultrasonic lesions in rabbit kidney, liver and testicle. *IEEE Trans Biomed Eng* 1977; 24:393-6.
- Gan BS, Sherebrin MH, Scilley CG. The effects of ultrasound treatment on flexor tendon healing in chicken limb. *J Hand Surg* 1995; 20: 809-14.
- Gartner PL, Hiatt JL. Histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
- Griffin JE, Echternach JL, Price RE, Thouchstone JC. Patients treated with ultrasonic-driven hydrocortisone and with ultrasound alone. *Phys Ther* 1967; 47:594- 601.
- Grounds MD. Phagocytosis of necrotic muscle in muscle isografts is influenced by the strain, age, and sex of host mice. *J Pathol* 1987;153:71-82.
- Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1997.
- Hall IH, Starnes Jr CO, Lee KH, Waddell TG. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. *J Pharm Sci* 1980; 69:537-43.
- Hart J. The effect of therapeutic ultrasound on dermal repair with emphasis on fibroblast activity [PhD thesis]. London: University of London; 1993.
- Harvey W, Dyson M, Pond JB, Grahame R. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. *Rheumatology* 1975;14:237.
- Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001;91:534-51.
- Hoogland R. Terapia ultrasônica. Enraf-Nonius 1986;(1)5-35.
- Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1999.
- Kahn J. Principles and practice of electrotherapy. New York: Churchill Livingstone; 1991.

- Kitchen SS. Eletroterapia: prática baseada em evidências. 11a ed. São Paulo: Manole; 2003.
- Kitchen SS, Partridge CJ. A review of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 1990; 76:593-600.
- Klaas CA, Wagner G, Laufer S, Sosa S, Loggia RD, Bomme U, Pahl HL, Merfort I. Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from arnica flowers. *Planta Med* 2002; 68:385-391.
- Knussel O, Weber M, Suter A. Arnica Montana gel in osteoarthritis of the knee: an open multicenter clinical trial. *Adv Ther* 2002; 19:209-18.
- Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Solate ACB. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound Med Biol* 2005, 31:345-50.
- Kos O, Lindenmeyer MT, Tubaro A, Sosa S, Merfort I. New sesquiterpene lactones from arnica tincture prepared from fresh flowerheads of arnica montana. *Planta Med* 2005; 71:1044-52.
- Lehmann JF. The biophysical mode of action of biologic and therapeutic ultrasonic reactions. *J Acoust Soc Am* 1953; 25:17-25.
- Lehmann, JF. Ultrasonic diathermy. In: Krusen FH, Kootke FJ, Ellerwood P, editors. *Handbook of physical medicine and rehabilitation*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1965. p.271- 99.
- Lehmann JF, De Lateur BJ. Diatermia e calor superficial, laser e crioterapia. In: Kottke FJ; Lehmann JF. *Tratado de medicina física e reabilitação de Krusen*. Rio de Janeiro: Manole; 1994.
- Love LA, Kremkau FW. Intracellular temperature distribution produced by ultrasound. *J Acoust Soc Am* 1980; 67:1045-50.
- Low J, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. 3a ed. São Paulo: Manole; 2001.
- Lyss G, Schmidt TJ, Merfort I, Pahl HL. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF-kB. *Biol Chem* 1997; 378:951-61.
- Maltin C, Harris JB, Cullen MJ. Regeneration of mammalian skeletal muscle following the injection of the snake-venom toxin, paipoxin. *Cell Tissue Res* 1983; 232:565-77.
- Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil* 2005; 86:1304-10
- Mauro A. Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9:493-5.

- Maxwell L. Therapeutic ultrasound: Its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. *Physiotherapy* 1992;78:421-5.
- McElnay JC, Matthews MP, Harland R, Mc Cafferty DF. The effect of ultrasound on percutaneous absorption of ilgnocaine. *Br J Clin Pharmacol* 1985;20:421- 4.
- Menezes DF. Aplicação do ultra-som terapêutico em lesão muscular experimental aguda [dissertação]. Ribeirão Preto: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1997.
- Merfort I. Arnica: new insights on the molecular mode of a traditional medicinal plant. *Forsh Komplementarmed Klass Naturheilkd* 2003;10:45-8.
- Michlovitz SL. Thermal agents in rehabilitation. Philadelphia: F.A. Davis; 1996.
- Miller MW. Gene transfection and drug delivery. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26:59-62.
- Mitragotri S. Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. *Pharm Res* 2000;17(11):1354-9.
- Mitragotri S. Effect of therapeutic ultrasound on partition and diffusion coefficients in human stratum corneum. *J Control Release* 2001;71:23-9.
- Mitragotri S, Blankchtein D, Langer R. Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. *Science* 1995;269:850-3.
- Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. An explication for the variation of the sonophoretic transdermal transport enhancement from drug to drug. *J Pharm Sci* 1997;86:1190-2.
- Mitragotri S, Kost J. Low-frequency sonophoresis: a review. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:589-601.
- Moghimi HR, Williams AC, Barry BW. Enhancement by terpenes of 5-fluorouracil permeation through the stratum corneum: model solvent approach. *J Pharm Pharmacol* 1998;50:955-64.
- Moore MAS. Stem cell concepts. In: Mauro A. Muscle regeneration. New York: Raven Press; 1979. p.639-52.
- Muller M, Mascher H, Kikuta C, Schäfer S, Brunner M, Dorner G, et al. Diclofenac concentrations in defined tissue layers after topical administration. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62:293-9.
- Mutoh M, Ueda H, Nakamura Y, Hirayama K, Atobe M, Kobayashi D, et al. Characterization of transdermal solute transport induced by low-frequency ultrasound in the hairless rat skin. *J Control Release* 2003; 92:137-46.
- Nascimento RSTR, Anaruma CC, Bucalon AJ. Estudo experimental dos efeitos do ultra-som terapêutico, onda pulsada, sobre o processo de regeneração do tecido conjuntivo e músculo esquelético em ratos Wistar [dissertação]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista; 2002.

- Okuno E, Caldas IL, Chow C. Física para ciências biológicas e biomédicas. São Paulo: Harba; 1986.
- Parizzoto N, Koeke PU, Moreno BG, Lourencin FTC. Utilização da fonoforese em distúrbios musculoesqueléticos: uma meta-análise. Rev Bras Fisioter 2003; 7(1):9-15.
- Peake JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. Exerc Immunol Rev 2002; 8:49-100.
- Pizza FX, Koh TJ, McGregor SJ, Brooks SV. Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. J Appl Physiol 2002; 92:1873-8.
- Polacow MLO, Pires-de-Campos MSM, Leonardi GR, Carvalho L, Ribeiro MCAP, Montebello MIL. Efeito do ultra-som na permeação cutânea do tetraciclol: análise histológica. Rev Bras Fisioter 2004; 8(1):53-60.
- Pospíšilova J. Effect of ultrasound on collagen synthesis and deposition in experimental granuloma tissue. Possibilities of clinical uses of ultrasound in healing disorders. Acta Chir Plast 1976;18(4):176-83.
- Robbins SL, Angeli M, Kumar V. Patologia básica. São Paulo: Atheneu; Edusp; 2000.
- Rosim GC, Barbieri CH, Lancas FM. influência da aplicação prévia do ultra-som terapêutico na penetração transcutânea de diclofenaco sódico em humanos saudáveis. Rev Bras Fisioter 2004; 8(2):129-35.
- Ross MH, Romrell LJ. Histologia: texto e atlas. 2a ed. São Paulo: Panamericana; 1993.
- Sarvazyán AP. Some general problems of biological action of ultrasound. IEEE Trans Sonics Ultrasonics 1983;30(1):2-12.
- Singer A, Homan CS, Church AL, McClain SA. Low-frequency sonophoresis: pathologic and thermal effects in dogs. Acad Emerg Med 1998; 5:35-40.
- Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. Rheumatology 2001; 40:1331-6.
- Starkey C. Ultrasound. In: Therapeutic modalities. 2nd ed. Philadelphia: F. A. Davis; 1999.
- Tachibana K, Tachibana S. The use of ultrasound for drug delivery. Echocardiography 2001; 18:323-8.
- Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest 2001;107:7-11.
- Ter Haar G. Basic physics of therapeutic ultrasound. Physiotherapy 1978; 64(4):100-3.

- Ter Haar G. Tissue regeneration. In: Repacholi MH, Grandolfo A, Rindi A, editors. *Ultrasound medical applications, biological effects and hazard potential*. New York: Plenum Press; 1987.
- Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 1995;27(7):1022-32.
- Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med* 2003;27:363-70.
- Tyle P, Agrawala P. Drug delivery by phonophoresis. *Pharm Res* 1989;6:355-61.
- Ueda H, Ogihara M, Sugibayashi K, Morimoto Y. Change in the electrochemical properties of skin and lipid packing in stratum corneum by ultrasonic irradiation. *Int J Pharm* 1996;137:217-24.
- Wagner S, Suter A, Merfort I. Skin penetration studies of arnica preparations and of their sesquiterpene lactones. *Planta Med* 2004;70:897-903.
- Wells PNT. *Biomedical ultrasonics*. London: Academic Press; 1977.
- Williams AR. Release of serotonin from platelets by acoustic streaming. *J Acoustic Soc Am* 1974; 56:1640.
- Williams R. Production and transmission of ultrasound. *Physiotherapy* 1987; 73(3):113-6.
- Worrell TW. Factors associated with hamstring injuries: an approach to treatment and preventive measures. *Sports Med* 1994;17:338-45.
- Young SR. The effect of therapeutic ultrasound on the biological mechanisms involved in dermal repair (PhD thesis). London: University of London; 1990.
- Young SR, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics* 1990;28:175-80.
- Yurt RW. Role of the mast cell in trauma. *Surg Wound* 1981;62.
- Ziskin CM, NcDiarmid T, Michlovitz SL. Therapeutic ultrasound. In: Michlovitz SL. *Thermal agents in rehabilitation*. 3rd ed. Philadelphia: F. A. Davis; 1999.