

THIAGO SAIKALI FARCIC

Efeito da aplicação do ultrassom terapêutico durante 4 e 5 minutos por área do transdutor no processo de reparação de tendão de ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto

São Paulo

2016

THIAGO SAIKALI FARCIC

Efeito da aplicação do ultrassom terapêutico durante 4 e 5 minutos por área do transdutor no processo de reparação de tendão de ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Farcic, Thiago Saikali

Efeito da aplicação do ultrassom terapêutico durante 4 e 5 minutos por área do transdutor no processo de reparação de tendão de ratos / Thiago Saikali Farcic. -- São Paulo, 2015.

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

Programa de Ciências da Reabilitação.

Orientadora: Raquel Aparecida Casarotto.

Dedicatória

*Dedico aos meus amados pais
Elaine Saikali e Cláudio Sidnei Fiuza Farcic
que sempre me apoiaram e fizeram acreditar na realização dos meus sonhos.*

*A Priscila Farcic Sein,
minha amada esposa, companheira no amor e na vida,
que sempre me apoiou nas horas difíceis e incentivou meu crescimento.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus.

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

A minha esposa pelo amor e todos os momentos de reflexão, tolerância, diversão e incentivo.

Aos meus irmãos e tios por toda ajuda, compreensão e carinho.

À Universidade de São Paulo, por ter me recebido como aluno do Programa de Ciências e Reabilitação, possibilitando minha titulação.

A minha orientadora Profa. Dra. Raquel Aparecida Casarotto pela paciência, carinho e todos os ensinamentos transmitidos ao longo de toda minha formação.

Ao meu grande amigo Cristiano S. Baldan vulgo “Picreta”, pelos momentos de auxílio na experimentação. Agradeço pelo seu apoio, confiança, companheirismo em todas as etapas do doutorado.

Ao meu padrinho Igor Masson vulgo “anão” por todo apoio e incentivo transmitidos nas difíceis etapas, além das críticas construtivas que foram primordiais na construção desta tese.

A minha amiga Aline F. Machado pela amizade e as inúmeras sugestões realizadas no decorrer da minha formação.

Aos professores e amigos Fátima Caromano, Sílvia Maria Amado João, Nivaldo Antonio Parizotto, Leonardo Massabki, José A. Megasi.

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

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

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

Normalização adotada

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

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

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

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

Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos	vi
Normalização adotada	viii
Lista de figuras	xi
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Lesão tendínea e reparação tecidual	3
2.2 Ultrassom Terapêutico	4
2.3 Efeitos da terapia por ultrassom.....	6
2.4 Efeitos do ultrassom terapêutico na lesão tendínea.....	7
2.5 Dosimetria do Ultrassom terapêutico	12
3. OBJETIVO	15
4. MÉTODOS.....	16
4.1 Animais	16
4.2 Técnica operatória.....	16
4.3 Protocolo de Tratamento.....	18

4.4	Análise histológica.....	19
4.5	Análise estatística	21
5.	RESULTADOS	22
6.	DISCUSSÃO.....	25
7.	CONCLUSÃO	30
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

Lista de figuras

Figura 1 - A: Incisão longitudinal e exposição do tendão do calcâneo na face posterior do membro traseiro do rato; B: Sutura da incisão cirúrgica com fio Náilon 4.0.	17
Figura 2 - Contensão e irradiação do tendão do calcâneo na face posterior do membro traseiro do rato.	19
Figura 3 - Retardo ótico entre os GC, GT, UST3, UST4 e UST5. RO – retardo ótico; GC – grupo controle; GT – grupo tendão; UST3 – grupo UST3; UST4 – grupo UST4; UST5 – grupo UST5; * - diferença significativa.	22
Figura 4 - Imagens referentes à observação qualitativa da análise de birrefringência dos tendões de ratos tenotomizados. Amostras posicionadas com o eixo longitudinal dos tendões em 45° com a normal. Nas imagens GT, UST3 e UST4 é possível notar menor organização das fibras colágenas quando comparados com os grupos GC e UST5.....	24

Lista de abreviaturas e símbolos

UST	Ultrassom Terapêutico
%	Porcentagem
SATA	média espacial e a média temporal
W/cm²	Watts por centímetro quadrado
cm	Centímetro
MHz	Megahertz
cm²	Centímetro quadrado
ERA	área de radiação efetiva
EPM	Escola Paulista de Medicina
g	Gramma
mg/kg	Miligrama por quilograma
ms	Metros por segundo
Hz	Hertz
CO₂	Dióxido de carbônico
°C	Grau Celsius
μm	Micrometro
η	Índice de refração
λ	Comprimento da onda
RO	Retardo óptico
KS	Kolmogorov-Smirnov

Resumo

Farcic TS. *Efeito da aplicação do ultrassom terapêutico durante 4 e 5 minutos por área de transdutor no processo de reparação de tendão de ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos tempos de aplicação 3, 4 e 5 minutos por ERA do ultrassom terapêutico (UST) na organização das fibras de colágeno em lesão do tendão do calcâneo de ratos. Foram utilizados quarenta ratos machos Wistar, dos quais 32 sofreram tenotomia total do tendão do calcâneo e foram divididos em 5 grupos: GC, sem tenotomia e tratamento; GT, com tenotomia e sem tratamento; UST3, UST4 e UST5 submetidos à tenotomia e tratados com UST nos tempos de 3, 4 e 5 minutos por área de radiação efetiva respectivamente. Os animais foram submetidos à primeira aplicação do UST foi 24 horas após a cirurgia de tenotomia. A irradiação ultrassônica foi aplicada com os seguintes parâmetros: 1 MHz, modo pulsado com 20% do ciclo de trabalho (2 ms de emissão / 8 ms de intervalo), frequência de 100 Hz, 0,5 W / cm² de intensidade e ERA de 0,5 cm². A aplicação foi realizada 1x/dia. Os animais foram sacrificados após a 10^a sessão de tratamento, no 12^o dia pós-operatório. Os tendões foram retirados cirurgicamente para análise da organização das fibras colágenas através do método de birrefringência (retardo óptico - OR). As fibras colágenas mostraram melhor agregação e organização no grupo UST3, UST4 e UST5 quando comparado ao GT (p<0.05) e o UST5 apresentou melhor resposta na comparação intergrupos. Conclui-se que o UST, aplicado no tempo de 5 minutos por área de radiação efetiva, apresentou a melhor dose-resposta quanto à organização das fibras colágenas no reparo tecidual de tendões de ratos.

Descritores: birrefringência; dosimetria; ratos; tendão do calcâneo; terapia por ultrassom; traumatismo dos tendões.

Abstract

Farcic TS. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo";2016.

The aim of this study was to evaluate the effect of application times 3, 4 and 5 minutes ERA of therapeutic ultrasound in the organization of the collagen fibers in rat calcaneal tendon injury. Forty male Wistar rats were used, of which 32 underwent complete tenotomy of the calcaneal tendon and were divided into 5 groups: GC without tenotomy and treatment; GT tenotomy with and without treatment; UST3, UST4 UST5 and submitted to tenotomy treated with therapeutic ultrasound at times 3, 4 and 5 minutes per effective radiating area respectively. The animals were submitted to the first application of therapy US tenotomy 24 hours after surgery. Ultrasonic irradiation was applied with the following parameters: 1 MHz, pulsed mode at 20% duty cycle (2ms transmission / 8 ms interval), frequency 100 Hz, 0.5 W / cm² intensity and ERA 0.5 cm². The application was performed 1x / day. The animals were sacrificed after the 10th treatment session, on the 12th postoperative day. The tendons were surgically removed for analysis of the organization of the collagen fibers through birefringence method (optical delay - OR). The collagen fibers showed better aggregation and organization in group UST3, UST4 and UST5 when compared to the GT (p <0.05) and UST5 showed better response in the intergroup comparison. We conclude that the UST, applied in time of 5 minutes for effective radiation area, presented the best dose-response as the organization of the collagen fibers in tissue repair of rat tendons.

Descriptors: birefringence; dosimetry; rats, achilles tendon, ultrasonic therapy, tendon Injuries.

1. INTRODUÇÃO

Ao sofrer uma lesão tendínea, independente da atividade profissional que se exerça, uma reabilitação rápida e eficiente é necessária. A lesão do tendão do calcâneo é uma lesão grave e uma das mais comuns entre as lesões tendíneas, prevalecendo em atletas, principalmente em esportes de alto impacto que envolvem saltos e corridas (Reynold et al.,1991; Stehno-Bittel et al.,1998; Riley 2008; Salate et al.,2005). Pode também ocorrer de forma espontânea em indivíduos com degeneração tendínea que apresentam aumento da quantidade de colágeno tipo III, redução do tipo I e diminuição da agregação do colágeno (Riley 2008; Coombs et al.,1980; Maffulli et al.,2000).

O processo de cicatrização das lesões tendíneas pode levar meses para se completar. Durante o período de recuperação, geralmente o paciente é submetido à imobilização para evitar complicações funcionais, entretanto a imobilização prolongada pode levar a alterações morfológicas no tendão (Salate et al.,2005; Gum et al.,1997; Demir et al.,2004).

Devido à alta incidência destas lesões, estudos sobre dosimetria dos recursos terapêuticos são necessários, com o objetivo de melhorar o reparo tendíneo, reduzindo o tempo de recuperação e o retorno às atividades rotineiras (Saini et al., 2002; Arruda et al., 2007). Pesquisadores têm estudado modalidades terapêuticas não farmacológicas, com o objetivo de acelerar o processo de reparação tecidual, tais como: ultrassom terapêutico, laserterapia de baixa intensidade (Farcic et al., 2013; Enwemeka; Reddy, 2000; Saini et al., 2002; Carvalho et al., 2006; Wood et al., 2010; Neves et al., 2011) e

estimulação elétrica (Burssens et al., 2003; Burssens et al.,2005; Folha et al., 2015).

Dentre as ferramentas terapêuticas que estão à disposição para tratar uma lesão tendínea, o Ultrassom Terapêutico (UST) é um recurso de grande uso na rotina dos profissionais da Fisioterapia (Dyson et al.,1987; Farcic et al., 2012). Há relatos que datam o início de sua utilização em 1950 (Bélanger, 2010; Farcic et al., 2012). Estudar os efeitos terapêuticos deste recurso na fase de reparo tecidual pode auxiliar decisões clínicas dos fisioterapeutas relacionadas ao uso ou não deste recurso na melhoria do processo de reparação tecidual do tecido tendíneo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lesão tendínea e reparação tecidual

O processo de cicatrização das lesões tendíneas pode levar meses para concluir-se. Durante o período de recuperação, geralmente o paciente é submetido à imobilização para evitar complicações funcionais, entretanto a imobilização prolongada pode levar a alterações morfológicas no tendão (Salate et al.,2005; Gum et al.,1997; Demir et al.,2004). A reparação tecidual é didaticamente dividida em 3 fases distintas: inflamatória, proliferativa e de remodelamento (Li et al.,2007; Kondo et al.,2007; Ansell et al.,2012). Dentre as fases do processo de cicatrização do tendão, as fases proliferativa e de remodelamento são responsáveis pela intensa proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e o alinhamento destas fibras no eixo longitudinal do tendão (Enwemeka et al.,1989).

Já a fase inflamatória é caracterizada por alterações vasoativas que promovem exsudação de fagócitos do sangue para a margem da lesão (Pereira, 1994; Jozsa; Kannus, 1997). Simultaneamente, as plaquetas agregam-se ao redor do epitélio dos vasos lesados e ao colágeno exposto, excretando fosfolipídeos que estimulam o mecanismo de coagulação. Fibrinas e fibronectinas formam ligações transversas com o colágeno, o que resulta em uma estrutura para estancar o sangramento local e resistir às forças de tensão durante o período inicial de reparo (Jozsa; Kannus, 1997).

Aproximadamente no 3º dia pós-lesão os fibroblastos iniciam a produção de fibrilas que se agregam ao acaso no espaço extracelular, este

acontecimento de certa forma colabora para proteger o tecido tendíneo contra as forças aplicadas no início da cicatrização (Enwemeka et al., 1988).

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

2.2 Ultrassom Terapêutico

O UST teve sua origem na década de 1950, e vem sendo utilizado no tratamento de lesões musculoesqueléticas por diferentes profissionais demonstrando efeitos terapêuticos, principalmente nos tecidos que possuem uma alta taxa de fibras colágenas (Farcic et al., 2012; Johns, 2002; Saini et al., 2002; Kitchen, 2003; Blume et al., 2005; Larsen et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Monte-Raso et al., 2006; Wong et al., 2007; Piedade et al., 2008; Artilheiro et al., 2010; Romano et al., 2010).

O UST é um dos recursos eletrofísicos amplamente utilizado nos atendimentos de fisioterapia (Farcic et al., 2012; Robertson, 2002; Olsson et al., 2008; Schabrun et al., 2008).

Segundo levantamentos de Dyson (1987), na Austrália, mais de 90% dos fisioterapeutas tem acesso a uma unidade de UST e 80% dos fisioterapeutas o utilizam diariamente. Chipchase (2009) em uma pesquisa realizada sobre a utilização de agentes eletrofísicos por fisioterapeutas na Austrália, mostrou que o UST é o recurso mais utilizado na prática clínica, com 90% de utilização entre os entrevistados.

O UST é produzido por uma corrente alternada que flui por um cristal piezoelétrico, alojado em um transdutor que gera energia sonora. Esta, quando aplicada nos tecidos biológicos, é capaz de produzir alterações celulares por efeitos mecânicos (Mendonça et al. 2006; Olsson et al., 2008; Machado et al., 2011).

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

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

O ultrassom em modo de emissão contínuo é geralmente usado para produzir efeitos térmicos, enquanto que em modo de emissão pulsado buscam-se os efeitos mecânicos. Ambos os efeitos podem ser utilizados para se chegar

mais rapidamente aos objetivos terapêuticos, desde que o UST seja aplicado em patologias adequadas e no momento apropriado.

Os efeitos terapêuticos do UST relacionam-se à antecipação de eventos relacionados à resposta inflamatória, liberação de histamina e macrófagos, angiogênese, aumento do metabolismo celular e da síntese de colágeno tipo I e III, diminuição do edema, melhor alinhamento e organização das fibras de colágeno, promovendo a aceleração no processo de cicatrização do tendão (da Cunha et al.,2001; Farcic et al 2012; Robertson 2002; Saini et al., 2002; Koeke et al.,2005; Carvalho et al.,2006; Wood et al.,2010; Tsai et al.,2011; Farcic et al.,2013; Harvey et al.,1975; Enwemeka et al.,1989; Frasson et al., 2009).

2.3 Efeitos da terapia por ultrassom

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

As alterações fisiológicas do UST em tecidos biológicos são tradicionalmente agrupadas em duas classes: efeitos térmicos e efeitos mecânicos. Ambos ocorrem no organismo, mas a proporção e a magnitude de cada um deles dependem do modo de emissão e da intensidade de saída (Draper et al., 1993; Starkey, 2001). Embora o UST com emissão pulsada seja aplicado normalmente em ciclos de trabalho de 10%, 20% ou 50% e, com baixa intensidade, considerando a média espacial e a média temporal (SATA), o mesmo é capaz de produzir alterações irrelevantes de temperatura nos tecidos nos ciclos de trabalho de 10% e 20%, porém em ciclos de 50% pode

apresentar um aumento significativo de temperatura. Gallo et al. (2004) demonstraram que o UST contínuo com uma intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$ promoveu o mesmo aumento de temperatura no músculo gastrocnêmio de seres humanos (a 2 cm de profundidade) que o UST pulsado com ciclo de trabalho de 50% e intensidade de 1 W/cm^2 , ambos aplicados por 10 minutos e frequência de 3 MHz. Neste estudo a intensidade SATA foi à mesma para as aplicações contínua e pulsada.

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

2.4 Efeitos do ultrassom terapêutico na lesão tendínea

Ng et al. (2003) realizaram um experimento com o objetivo de analisar a melhora das propriedades estruturais e a performance dos tendões do calcâneo de ratos após hemiseção durante o processo de reparação tecidual. Utilizou 30 ratos submetidos à cirurgia de hemiseção do tendão do calcâneo, divididos em 3 grupos: 10 ratos foram tratados diariamente com UST na frequência de 1 MHz, intensidade de $1,0 \text{ W/cm}^2$, com emissão contínua por 4 minutos, 11 ratos foram tratados com intensidade de $2,0 \text{ W/cm}^2$, durante 4 minutos e 9 ratos utilizados como grupo controle, sem tratamento. Após 30 dias de tratamento os animais foram mortos e os tendões submetidos a teste de carga-relaxamento, estiramento e força de tensão. Os resultados

demonstraram que ambas as doses melhoraram o reparo tecidual do tendão do calcâneo.

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

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

Koeke et al. (2005), estudaram a eficácia da aplicação tópica de hidrocortisona 10 % introduzida por meio de fonoforese comparada ao UST na reparação tecidual de tendão de rato submetido a tenotomia total. Os animais foram tratados durante 10 dias com frequência do equipamento de 1 MHz, emissão pulsada (20 %), intensidade de 0,5 W/cm². Pelo método de análise de birrefringência conclui-se que a emissão pulsada de 20 % demonstra ser um

método eficiente para promover organização estrutural das fibras de colágeno e o processo de reparação tecidual foi acelerado por um provável efeito de biomodulação da inflamação, promovendo uma maior síntese de colágeno por estimulação da proliferação dos fibroblastos. O UST promove penetração da concentração de hidrocortisona a 10 % pois o grupo tratado com fonoforese obteve o melhor resultado na análise de birrefringência.

Ng et al. (2003), compararam a utilização do UST e exercício na reparação do tendão do calcâneo após transecção cirúrgica. Os animais foram divididos em 5 grupos: Grupo controle, grupo tratado com UST na intensidade de 1 W/cm² durante 4 minutos, grupo tratado com UST na intensidade de 2 W/cm² durante 4 minutos, grupo tratado com corrida e grupo tratado com natação. Após os 30 dias de tratamento os animais foram sacrificados e os tendões submetidos ao teste biomecânico. Os resultados demonstram que o grupo tratado com UST com intensidade de 2,0 W/cm² e exercício de corrida promoveram aumento da força do tendão reparado.

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

Frasson et al. (2009), verificaram a microestrutura do tendão calcâneo sob o efeito do UST com modo de emissão pulsado em duas intensidades diferentes. Os animais do grupo controle não receberam tratamento; o grupo 1 foi submetido ao UST com frequência de 1 MHz e pulsado (20%), com área de radiação efetiva de 1,0 cm² e intensidade média instantânea de 0,3 W/cm²; o grupo 2 recebeu UST nos mesmos parâmetros, mas com intensidade de 1,5 W/cm²; no grupo 3, placebo, foi aplicado tratamento simulado (ultrassom desligado). Nos três grupos, o tratamento consistiu em uma sessão diária de 5 minutos, por um período de 10 dias. No 11º dia pós-operatório os tendões foram removidos para análise qualitativa e quantitativa, por meio de microscopia de luz polarizada, de luz e força atômica. As análises qualitativas foram coincidentes, mostrando melhor organização, agregação e orientação das fibras de colágeno no grupo 1 quando comparado ao grupo controle, 2 e 3. A análise quantitativa apresentou contagens médias de 400,7 fibroblastos e 2,22 capilares sanguíneos por campo de análise, não encontrou diferença significativa entre os grupos. Conclui-se que o processo de regeneração tendínea em ratos pode ser beneficiado pelo tratamento com UST pulsado em baixa intensidade, mais especificamente na intensidade de 0,3 W/cm².

Romano et al. (2010), investigaram as propriedades mecânicas de tendões flexores profundos de coelhos submetidos à tenotomia seguida de tenorrafia e tratados com UST com diferentes intensidades, em comparação com tendões submetidos somente ao procedimento cirúrgico. Amostra constituiu de quarenta e quatro coelhos divididos em quatro grupos experimentais. O grupo A recebeu UST com uma intensidade de 1,4 W/cm², o grupo B com 0,6 W/cm², ambos no modo contínuo, o grupo C com 0,6 W/cm²,

no modo pulsado a 50% e o grupo D não recebeu tratamento ultra-sônico. A frequência ultra-sônica empregada foi de 1 MHz. Após a morte dos animais os tendões foram dissecados e submetidos ao ensaio mecânico de tração e análise histológica qualitativa. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, com isso, concluiu que o UST não melhorou as propriedades mecânicas dos tendões flexores após reparo, porém o autor relata que pode existir alterações na reparação tendínea devido a imobilização inadequada.

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

Silva et al. (2010), estudaram a ação do UST em tendinite experimental por análises histomorfométrica e histopatológica. A amostra constituiu de vinte e cinco ratos Wistar divididos em três grupos experimentais (7 e 14 dias): A₇ e A₁₄, tendinite induzida sem tratamento; B₇ e B₁₄, tendinite induzida, tratada com US em emissão pulsado (10%), frequência de 1 MHz com intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$, e o grupo C sem indução de tendinite. A histologia e a histomorfometria demonstraram qualitativa e quantitativamente, um aumento

do número de fibroblastos, em sete dias, e das fibras de colágeno, em 14 dias, para o grupo tratado com UST em relação ao grupo não tratado.

Farcic et al., (2013) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes tempos de tratamento do ultrassom terapêutico sobre a organização de fibras colágenas em tendão de ratos. Para isso utilizou quarenta ratos Wistar, dos quais 32 foram submetidos à tenotomia do tendão calcâneo e, divididos em 5 grupos: GC, sem tenotomia nem tratamento; GT, com tenotomia e sem intervenção terapêutica; grupos irradiados com ultrassom terapêutico (US1, US2 e US3), submetidos à tenotomia e tratados respectivamente com ultrassom por um, dois ou três minutos por área do transdutor. Os animais foram sacrificados no 12º dia pós-operatório e os tendões foram cirurgicamente removidos para o estudo da organização das fibras de colágeno pela análise de birrefringência. Os resultados demonstraram que as fibras colágenas obtiveram melhor agregação e organização no grupo US3, comparado ao grupo tenotomia ($p < 0,05$). Os achados sugerem que a aplicação de ultrassom por três minutos por área de transdutor melhora a organização das fibras de colágeno na reparação de tendão de ratos.

2.5 Dosimetria do Ultrassom terapêutico

A relação dose-resposta na aplicação do UST é influenciada pelos seus parâmetros dosimétricos como frequência de emissão da onda, intensidade, tempo de aplicação, modo de emissão, taxa de repetição e ciclo livre (Farcic et al., 2013; Casarotto et al., 2004; Draper et al., 1995; Fu et al., 2008). Os estudos que abordam o uso do UST no reparo tendíneo demonstram que não há um consenso na padronização dos parâmetros que determinam a dosimetria

adequada para este fim, principalmente relacionada à dose-resposta do tratamento realizado (Robertson 2002; van der Windt et al., 1999; Artilheiro et al., 2010; Vidal 2003; Warden e McMeeken 2002). Portanto, a prática baseada em evidências para o uso do UST no reparo tendíneo é insuficiente, fazendo com que os profissionais justifiquem a dosimetria utilizada com base em sua experiência clínica (Robertson 2002; Warden e McMeeken 2002; Olsson et al., 2002, Farcic et al., 2013; Farcic et al., 2012; Blume et al., 2005).

Warden e McMeeken (2002) concluíram em sua pesquisa que o UST é frequentemente utilizado pelos fisioterapeutas na reabilitação esportiva, porém não existem evidências que suportem a dosimetria empregada.

Robertson (2002), realizou uma revisão sobre a relação dose-resposta do UST feita a partir de ensaios clínicos randomizados. Nesta revisão, uma aparente janela terapêutica foi identificada entre as intensidades de 0,16 e 0,5 W/cm² no modo de emissão pulsado. No entanto, em uma análise mais detalhada, o autor demonstra que a não apresentação de outros parâmetros dosimétricos impedem que esta janela seja assumida como efetiva para o reparo tecidual. Assim, o autor sugere que mais estudos sejam realizados para justificar a dosimetria desta modalidade terapêutica. Dentre os parâmetros ajustáveis do UST, o tempo de aplicação tem influência na quantidade de energia aplicada ao tecido, calculado pela fórmula: Energia (Joule) = Potência (Watts) x Tempo (segundos) (Alexander et al., 2010). O tempo de aplicação é uma variável pouco estudada na terapia com UST. Em estudo anterior do nosso grupo (Farcic et al., 2013), avaliamos o efeito dos diferentes tempos de aplicação do UST na organização das fibras de colágeno no tendão do

calcâneo de ratos, utilizando 1, 2 e 3 minutos por área de radiação efetiva (ERA). Os resultados mostraram que o UST aplicado por 3 minutos melhorou a organização das fibras de colágeno no tendão do calcâneo de ratos de forma mais efetiva, quando comparado ao grupo controle e aos tempos de aplicação de 1 e 2 minutos por área de radiação efetiva. Este estudo levou à hipótese de que tempos maiores de aplicação poderiam produzir melhor organização das fibras colágeno.

A maioria dos autores conclui que não existe uma definição sobre a dosimetria correta da utilização do UST, e principalmente a relação entre a dose e a resposta ao tratamento, necessitando mais pesquisas nesta área, para determinar parâmetros mais específicos referentes ao UST (Robertson, 2002; Vidal, 2003; Blume et al., 2005; Franco et al., 2005; Monte-Raso et al., 2006; Olsson et al., 2006; Artilheiro et al., 2010; Farcic et al., 2012; Farcic et al., 2013).

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos tempos de aplicação 3, 4 e 5 minutos por ERA do ultrassom terapêutico na organização e agregação das fibras de colágeno em lesão do tendão do calcâneo de ratos.

4. MÉTODOS

4.1 Animais

A amostra foi composta por 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar EPM 1, machos, adultos jovens, com média de idade de 90 dias, pesando entre 250 e 350 gramas (g). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos contendo oito ratos cada, por meio de sorteio. O número de animais necessários para alcançar significância foram baseados nos estudos anteriores: Farcic et al. 2013 e Eckelman et al. 2007. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas, com alimentação balanceada para roedores e água *ad libitum*.

O estudo teve início após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 063/14. Os procedimentos cirúrgicos obedeceram às normas de Experimentação Animal vigente no Brasil. Os animais foram submetidos a eutanásia no 12º dia pós-operatório, ou seja, no 13º dia de estudo.

4.2 Técnica operatória

Os animais foram pesados e posteriormente anestesiados com cloridrato de Tiletamina e cloridrato de Zolazepam (Zoletil 50, da marca VIRBAC®), de uso veterinário, na dose de 25 mg/kg de massa corpórea através de injeção intraperitoneal. Em plano anestésico, foi realizada epilação por tração manual dos pelos da face posterior da tíbia direita, local correspondente ao tendão

calcâneo. Posteriormente, foi realizada a assepsia do local com álcool 70% e em seguida a pele e o panículo carnosos foram submetidos à incisão longitudinal sobre o local correspondente ao terço médio do tendão calcâneo, expondo o mesmo para efetuar um corte transversal em seu terço médio (Figura 1A). Após a secção total do tendão, a incisão foi totalmente fechada com sutura da derme através de um único ponto na região central, utilizando fio de Náilon 4.0 (Figura 1B). Todos os procedimentos supracitados foram realizados por um pesquisador previamente treinado. O modelo de tenotomia total da porção média do tendão do calcâneo (incisão transversal do tendão dissecado) foi baseado nos experimentos de, da Cunha et al. 2006, Koeke et al. 2005, Farcic et al. 2013, Carrinho et al. 2006 e Reddy et al. 2001. No pós-operatório os animais receberam dose única intramuscular de Ceftriaxona no membro inferior contralateral com objetivo de profilaxia antibiótica, em seguida foram colocados em gaiolas individuais, limpas e sem imobilização do membro operado (da Cunha et al.,2001; Koeke et al.,2005; Arruda et al.,2007; Carrinho et al., 2006; Reddy et al.,2001).

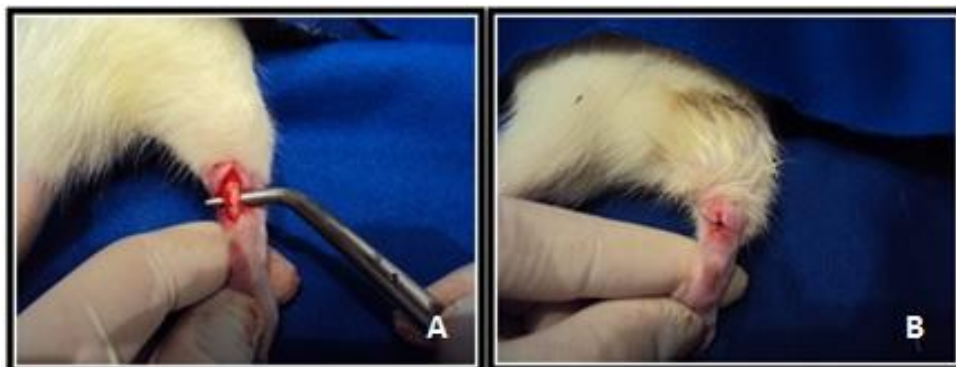


Figura 1 - A: Incisão longitudinal e exposição do tendão do calcâneo na face posterior do membro traseiro do rato; B: Sutura da incisão cirúrgica com fio Náilon 4.0.

4.3 Protocolo de Tratamento

Utilizou-se um emissor de UST da marca BIOSET®, modelo Sonacel. O transdutor foi modificado, para adequá-lo à face posterior do membro pélvico direito do rato e ao tamanho da lesão. O equipamento foi calibrado por meio de uma balança acústica modelo GT210 da marca Glutymax® e um osciloscópio da marca Intermetro®. A irradiação ultrassônica foi realizada por um pesquisador previamente treinado, com os seguintes parâmetros de emissão: 1 MHz de frequência de emissão de onda, modo pulsado com ciclo de trabalho de 20% (2 ms de emissão / 8 ms de intervalo), taxa de repetição de 100 Hz, intensidade de 0,5 W/cm² (*Spatial Average Time Average - SATA*), ERA de 0,5 cm² e a área tratada possui o tamanho de 1 cm² (Farcic et al. 2013). Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo Controle (GC, n=8): animais não submetidos a procedimento cirúrgico e nem tratados com UST; Grupo Tendão (GT, n=8): animais submetidos a tenotomia total do tendão do calcâneo e não tratado com UST; Grupo UST3 (n=8), Grupo UST4 (n=8) e Grupo UST5 (n=8): animais tenotomizados e tratados com UST com 3, 4 e 5 minutos por ERA, totalizando 6, 8 e 10 minutos de tratamento respectivamente.

Durante a irradiação, o transdutor foi posicionado perpendicularmente a área tratada e a emissão do UST ocorreu por meio da técnica dinâmica. Utilizou-se gel hidrossolúvel, à base de água como agente acoplante, com objetivo de conduzir melhor as ondas e auxiliar o deslizamento do transdutor sobre a pele do animal (Casarotto et al., 2004; Draper et al., 1995). Durante a aplicação, os animais foram estabilizados por um contensor padronizado (Figura 2) (da Cunha et al., 2001; Koeke et al., 2005).

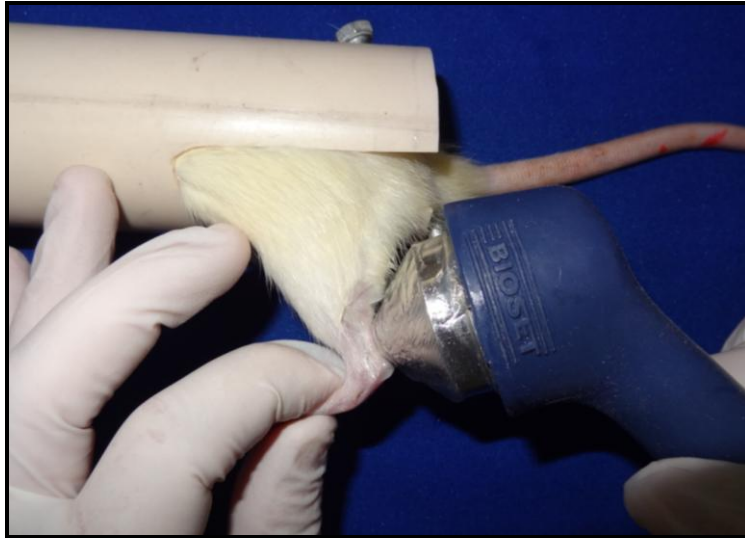


Figura 2 - Contensão e irradiação do tendão do calcâneo na face posterior do membro traseiro do rato.

Os animais foram submetidos a irradiação uma vez ao dia, sendo realizada durante os cinco primeiros dias após a cirurgia, com um dia de descanso, com o objetivo de simular a prática clínica, seguido de mais cinco dias de irradiação (Robertson 2002; Saini et al.,2002; Koeke et al.,2005; Carvalho et al., 2006). Os ratos tratados foram submetidos a eutanásia no 12^a pós-operatório juntamente com os grupos GC e GT.

4.4 Análise histológica

A eutanásia dos animais aconteceu por permanência em câmara de CO₂ a 40% de concentração de dióxido de carbono com indução prévia de anestesia na dose de 25 mg/kg de massa corpórea de Tiletamina e cloridrato de Zolazepam, de uso veterinário; a seguir as áreas referentes à lesão nos tendões foram retiradas cirurgicamente. Para a avaliação quantitativa do reparo tendíneo, os tendões removidos foram submetidos à fixação em formol 10% por 24 horas e, posteriormente, para desidratação passando por quatro banhos

em álcool de uma hora cada, iniciando pela diluição de 50%, passando para 70%, 80% e 100%. Em seguida as amostras foram banhadas em Xilol por uma hora e incluídas em parafina a 58°C. Os blocos montados foram cortados longitudinalmente em cortes seriados através de um micrótomo da marca Laica[®], com espessura padronizada de 7 µm. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro sem coloração, identificadas por um avaliador cego.

A propagação desigual da luz através de um objeto é a medida de birrefringência. Esta medida avalia a densidade e organização do material analisado e é utilizada para avaliar a organização e agregação das fibras de colágeno. A finalidade deste procedimento foi analisar a organização, estado de agregação e alinhamento das fibras de colágeno nos tendões por meio da medição da birrefringência (da Cunha et al., 2001; Carrinho et al., 2006; Baldan et al., 2010). Para isso, as lâminas de cada grupo foram imersas em água destilada cujo índice de refração é de $n = 1,333$, por 30 minutos, para análise de birrefringência. O retardo óptico (RO) foi medido utilizando um microscópio de luz polarizada da marca LEICA[®] com uma objetiva pol.10X/0,22, condensador 0.9, compensador de Sénarmont $\lambda/4$, luz monocromática $\lambda = 546$ nm, obtida por meio de um filtro de interferência LEICA[®], do LAMAV (Laboratório de Materiais Vítreos do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar). Esse tipo de análise tem sido utilizado para mensurar o grau de organização das fibras colágenas de forma quantitativa em diversos estudos (Koeke et al., 2005; Wood et al., 2010). As medidas resultantes em graus foram transformadas em nanometro (nm) multiplicando-se os graus por 3.03 (da Cunha et al., 2001). O total de birrefringência das fibras de colágeno foi medido após embebição em água destilada. Para realizar as medições ao longo do

eixo do tendão, o eixo longitudinal das fibras de colágeno foi orientado a 45° da direção de propagação da luz de transmissão. Nesta posição, as fibras de colágeno apresentam o maior RO. As medidas foram feitas em cinco diferentes pontos da área central dos tendões que correspondem à área da lesão (da Cunha et al., 2001; Koeke et al., 2005; Arruda et al., 2007; Carrinho et al., 2006; Vidal 2003). Os dados de birrefringência foram colhidos por dois avaliadores previamente treinados, independentes e cegos.

4.5 Análise estatística

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

5. RESULTADOS

Houve diferença significativa entre os cinco grupos (GC, GT, UST3, UST4 e UST5) ($p < 0.05$). A análise entre os grupos demonstrou tal diferença na comparação dos dados de ROs entre os grupos UST3xGT, UST3xGC, UST3xUST5, UST4xGT, UST4xGC, UST4xUST5, UST5xGT e GTxGC (Figura 3).

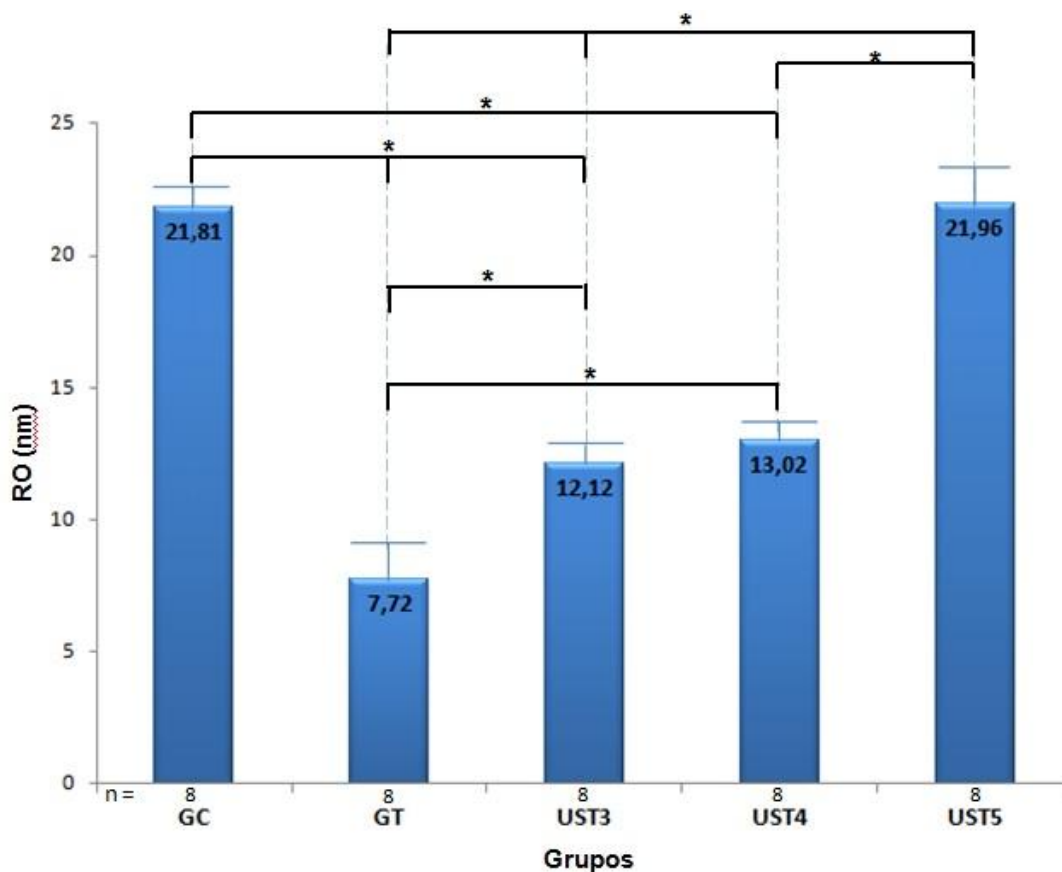


Figura 3 - Retardo óptico entre os GC, GT, UST3, UST4 e UST5. RO – retardo óptico; GC – grupo controle; GT – grupo tendão; UST3 – grupo UST3; UST4 – grupo UST4; UST5 – grupo UST5; * - diferença significativa.

Na análise histológica qualitativa é possível definir o padrão de normalidade com relação à organização de fibras colágenas (Figura 3), se o material biológico for observado à microscopia de luz polarizada. Comparando-se as imagens da Figura 4, observa-se que os animais do UST3, UST4, UST5 e GC, apresentaram maior organização das fibras colágenas, quando comparadas ao GT. Na comparação intergrupos, entre o GC e UST5, não houve diferença significativa entre os grupos, mostrando que o UST aplicado 5 minutos por área do transdutor promove uma organização do colágeno equivalente a um tendão sem lesão.

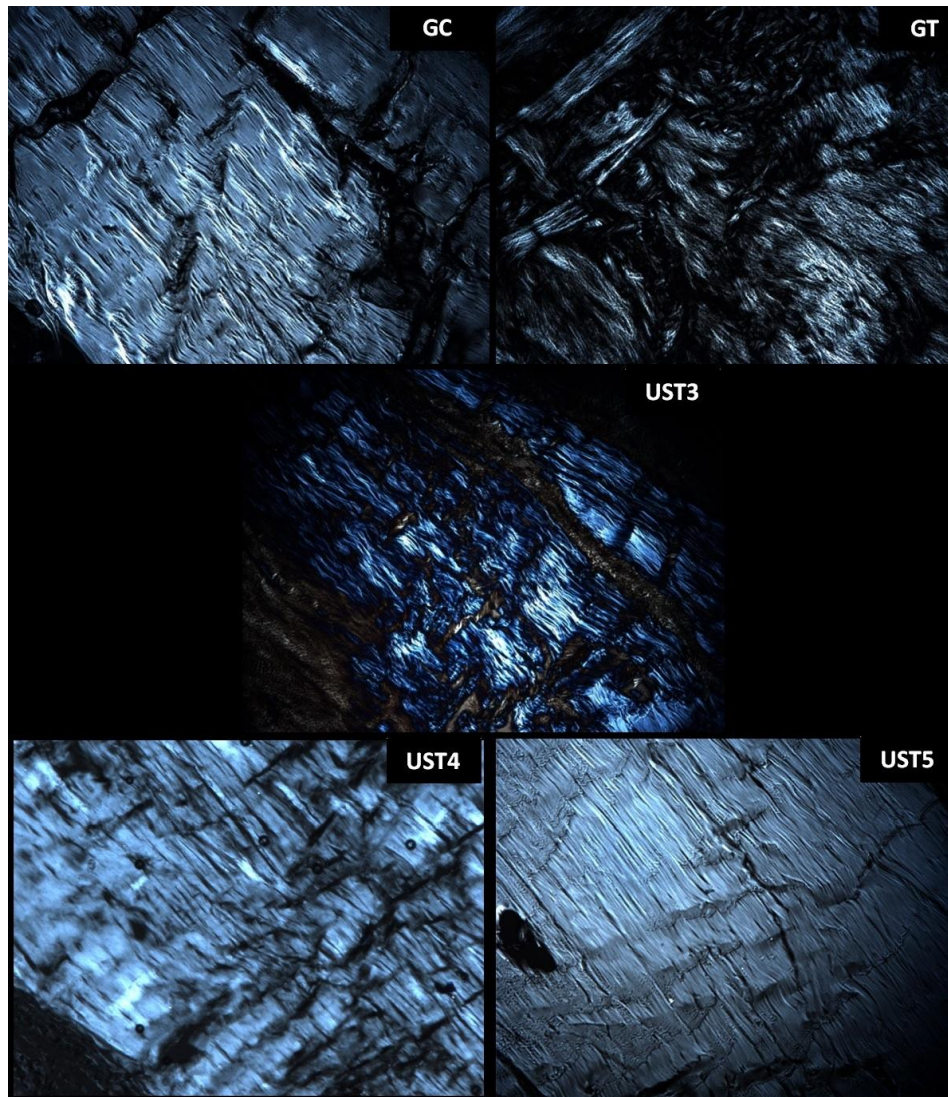


Figura 4 - Imagens referentes à observação qualitativa da análise de birrefringência dos tendões de ratos tenotomizados. Amostras posicionadas com o eixo longitudinal dos tendões em 45° com a normal. Nas imagens GT, UST3 e UST4 é possível notar menor organização das fibras colágenas quando comparados com os grupos GC e UST5

6. DISCUSSÃO

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

O rato é muito utilizado na avaliação da birrefringência nas fibras de colágeno do tendão (da Cunha et al., 2001; Koeke et al., 2005; Farcic et al., 2013). A facilidade de obtenção em laboratório permite a eliminação de fatores individuais, como imunodeficiência de um animal, emprego de uma amostragem maior por grupos experimentais, obtenção de resultados em tempos mais curtos, devido seu metabolismo acelerado em relação aos outros animais. A seleção de animais machos se deve as alterações hormonais presentes nas ratas fêmeas.

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

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular do tendão, representando aproximadamente 70% do peso do tendão (Wood et al., 2010). A análise da organização das fibras de colágeno na lesão tendínea proporciona uma avaliação da organização das fibras colágenas do tendão (Vidal 2003). A lesão tecidual apresenta uma tendência de diminuir o valor do RO, corroborando os dados deste experimento, onde o grupo GT demonstra o menor valor de RO, seguido pelos grupos UST3, UST4, GC e UST5 (da Cunha

et al., 2001; Carrinho et al., 2006). Durante o processo de reparação tecidual, existe uma tendência dos valores de RO aumentarem, ou seja a maturação do tendão elevam os valores de RO.

Os achados de Farcic et al. (2013), demonstraram, que o uso do UST durante 3 minutos por ERA melhorou a organização das fibras de colágeno no processo de reparo trouxeram a hipótese de que tempos maiores de aplicação poderiam conferir uma melhor organização das fibras de colágeno. No procedimento operatório de retirada dos tendões foi possível observar que os animais irradiados com tempos superiores do UST apresentaram uma qualidade tecidual superior, em relação a aderência e anatomia do tendão dissecado.

A comparação entre os grupos estudados demonstrou que o UST3, UST4 e UST5 apresentaram melhor organização e agregação das fibras de colágeno quando comparados ao grupo GT. Os achados evidenciam que o grupo UST5 apresentou melhor organização e agregação das fibras de colágeno com valores semelhantes aos do grupo que manteve o tendão sem lesão (GC) na análise de birrefringência, não apresentando diferença significativa entre eles. Além disso, é possível notar uma tendência no aumento do RO de acordo com o aumento do tempo de aplicação nos grupos tratados, corroborando os achados de Farcic et al. (2013).

Os componentes da matriz extracelular (principalmente as fibras colágenas) do tecido conjuntivo presentes no tendão têm uma característica viscoelástica que dependem do tempo ao qual o tecido é submetido à deformação ou tensão para manter suas características morfofuncional (Chiquet 1999). Deste modo, tempo de aplicação do UST 5 minutos teve um

efeito biomecânico (compressão / tensão) suficiente para promover o mecanismo de sinalização celular e da matriz extracelular no realinhamento das fibras colágenas (Culaw et al.,1999) semelhante ao tendão sem lesão.

A duração da aplicação do UST depende da área a ser tratada. Oakley (1978) preconiza que a área tratada deve corresponder a um ou dois minutos para cada área e meia do perímetro da ERA, assim, em áreas maiores de tratamento pode-se aumentar de 1 a 1 minuto e meio para cada ERA porém sua justificativa é baseado em estudos empíricos ou observações clínicas. O presente estudo não corrobora com estas indicações no que diz respeito ao tempo de aplicação necessário para promover um melhor alinhamento das fibras de colágeno dos tendões de ratos. É importante ressaltar que o tamanho da área tratada deve ser uma variável descrita detalhadamente nos estudos para permitir futuras comparações. Os estudos de da Cunha et al. (2001), Koeke et al. (2005), e Wood et al. (2010) não descreveram o tamanho da área a ser tratada, porém a descrição dos demais parâmetros forneceu as informações necessárias para o cálculo da área tratada. O presente estudo aponta que o tempo maior de aplicação foi benéfico para promover um melhor alinhamento do colágeno de acordo com a análise de birrefringência.

O UST tem resultados satisfatórios no reparo tendíneo em função da ação anti-inflamatória, angiogênese, aumento de fibroblastos e melhor organização, agregação e orientação das fibras colágenas. Os estudos revisados tiveram como parâmetros do UST no reparo tendíneo, modalidades de emissão pulsada e contínua, frequência do transdutor de 1 e 3 MHz, com intensidade que variaram de 0,3 a 2 W/cm² com duração de aplicação de 2 a 10 minutos. As variações dosimétricas apresentadas na revisão demonstram

que não existem consensos nos parâmetros dosimétricos do UST (Farcic et al., 2012).

Diferentes tecidos também apresentam tempos diferentes de irradiação. Para o tecido muscular, o tempo de 2 minutos de aplicação por ERA foi suficiente para aumentar significativamente a quantidade de colágeno intramuscular, quando aplicados por 7 dias. A organização do colágeno no sítio da lesão foi significativamente melhor no início do processo de reparo tecidual (4º dia), quando irradiado por 2 minutos por área do transdutor. Não houve diferença entre os tempos de 2 e 3 minutos para este tecido (Baldan et al., 2012).

O tempo de aplicação mais comumente utilizado é o de 5 minutos, geralmente aplicados em uma área referente a 2 vezes o tamanho da ERA, sendo assim o tempo corresponde a 2,5 minutos por área de radiação efetiva (Koeke et al., 2005; Wood et al., 2010). Uma explicação para a diferença de resultados obtidos entre os demais autores aos resultados de tratamento em lesões tendíneas se deve a falta de descrição em relação à dimensão da área a ser tratada com UST (da Cunha et al., 2001; Saini et al., 2002; Koeke et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Wood et al., 2010), impossibilitando assim, a comparação dos achados (Farcic et al., 2013).

Os padrões dosimétricos utilizados nesta pesquisa são os mais utilizados nos estudos sobre o UST, exceto o tempo de tratamento que é a variável estudada. A intensidade de 0,5 W/cm², frequência de emissão da onda sonora e a forma de emissão pulsada baseia-se nas pesquisas de Cunha et al 2001, Demir et al. 2004, Koeke et al. 2005, Carvalho et al 2006, Farcic et al. 2013, Frasson et al 2009; Blume 2005; Piedade 2008.

O tempo de aplicação é uma variável importante para determinar a quantidade de energia depositada ao tecido tratado. Alexander et al (2010), em revisão sistemática sobre o uso de US em diversas patologias de ombro, aponta que os estudos que encontraram energias médias de 4.2 J por sessão de tratamento foram efetivos para as condições clínicas estudadas, enquanto que aqueles que aplicaram médias de 2,019 J não obtiveram sucesso. Os dados obtidos nesta pesquisa demonstram que a energia de 30 J (UST5) apresentou o melhor resultado na organização e agregação das fibras de colágeno de tendão de ratos. Entretanto, sugere-se que mais pesquisas devam ser realizadas sobre dosimetria nas aplicações do UST; adicionalmente, ensaios clínicos são necessários para confirmar os achados *in vivo* e *in vitro*.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que 3, 4 e 5 minutos de aplicação por ERA apresentaram a melhor organização e agregação das fibras de colágeno de tendão de rato no processo de reparação tecidual, produzindo mudanças significantes no retardo óptico. O tempo de 5 minutos de aplicação por ERA apresentou melhor resposta na organização e agregação das fibras de colágeno, não mostrando diferença significativa quando comparado ao GC.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Ansell DM, Holden KA, Hardman MJ. Animal models of wound repair: are they cutting it? *Exp Dermatol* 2012;21:581-5.

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

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

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

Baldan, CS. Influência do tempo de irradiação da terapia por ultrassom sobre o tecido conjuntivo no processo de reparação muscular de ratos. 2012. 80p. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental). Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. 2012.

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

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

Burssens P, Forsyth R, Steyaert A, Van Ovost E, Praet M, Verdonk R. Influence of burst TENS stimulation on collagen formation after Achilles tendon suture in man. A histological evaluation with Movat's pentachrome stain. *Acta Orthop Belg.* 2005; 71: 342-6.

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

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

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

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

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

Chipchase LS, Williams MT, Robertson VJ. A national study of the availability and use of electrophysical agents by Australian physiotherapists. *Physiother Theory Pract.* 2009 May;25(4):279-96.

Coombs R, Klenerman L, Narcisi P, Nichols A, Pope F. Collagen typing in Achilles tendon rupture. *J Bone Joint Surg Br* 1980;62B:258.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Enwemeka CS. The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study. *Am J Phys Med Rehabil* 1989;68(6):283–287.

Farcic TS, Baldan CS, Cattapan CG, Parizotto NA, João SMA, Casarotto RA. Treatment time of ultrasound therapy interferes with de organization of collagen fibers in rat tendons. *Braz J Phys Ther.* 2013 May;17(3): 263-271.

Farcic TS, Lima RMCB, Machado AFP, Baldan CS, Villicev CM, Esteves Junior I, Masson IFB. Aplicação do ultrassom terapêutico no reparo tecidual do sistema musculoesquelético. *Arquivo brasileiro de ciências da saúde.* 2012;37: 149-159.

Folha RAC, Pinfildi CE, Liebano RE, Rampazo EP, Pereira RN, Ferreira LM. Can transcutaneous electrical nerve stimulation improve achilles tendon healing in rats?. *Braz J Phys Ther.* 2015 Nov;19(6): 433-440.

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

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

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

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

Gum S, Reddy G, Stehno-Bittel L, Enwemeka C. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. *Am J Phys Med Rehabil* 1997;76(4):288–296.

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

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

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

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

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

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

Kondo T. Timing of skin wounds. *Leg Med*. 2007;9:109-14.

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

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25:9-18.

Machado GC, Vieira RB, de Oliveira NML, Lopes CR. Análise dos efeitos do ultrassom terapêutico e da eletrolipoforese nas alterações decorrentes do fibroedema geloide. *Fisioter Mov*. 2011 jul/set;24(3):471-9

Maffulli N, Ewen S, Waterston S, Reaper J, Barrass V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic Achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal Achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med* 2000;28(4):499–505

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Riley G. Tendinopathy - From basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4(2):82–89.

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

Robinson AJ, Snyder L. *Eletrofisiologia clínica*. Porto Alegre: Artmed; 2001.
Romano CV, Barbieri CH, Mazzer N, Volpon JB, Shimano AC, Roncaglia FB. O ultra-som terapêutico não aumentou as propriedades mecânicas de tendões flexores após reparo. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(1):10-4.

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

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

Salate A, Barbosa G, Gaspar P, Koeke P, Parizotto N, Benze B, Foschiani D. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg* 2005;23(5):470–475.

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

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

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

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

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

Tsai WC, Tang SF, Liang FC. Effect of therapeutic ultrasound on tendons. *Am. j. Phys. Med. Rehabil*. 2011Dec; 90(12): 1068-73.

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

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

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

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

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

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