



## Efeito do ultrassom terapêutico na lesão do músculo tibial anterior em ratos

S R Gonçalves<sup>1,2\*</sup>, S Salman<sup>1</sup>, K C Almeida<sup>1</sup>, C Martignago<sup>3</sup>, C A Anaruma<sup>2</sup>, C Tim<sup>1</sup>, L Assis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Engenharia Biomédica, Universidade Brasil, UNBR, São Paulo, SP

<sup>2</sup>Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP

<sup>3</sup>Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP

\*silmaanato@gmail.com

**Introdução, Motivação e Objetivo:** O envolvimento de lesões do tecido muscular são rotineiramente encontradas em centros de reabilitação. Estas podem ser resultado de uma variedade de eventos, incluindo trauma direto como as lacerações e contusões ou trauma indiretos ocasionadas por doenças degenerativas (LAUMONIER; MENETREY, 2016). Histologicamente, a lesão muscular esquelética é caracterizada por rompimento de miofilamentos, alterações nas mitocôndrias, descontinuidade sarcolemal e um desequilíbrio celulares que ativam enzimas intracelulares e outras proteínas, que desencadeiam o mecanismo da lise celular. Classicamente, o processo de regeneração muscular consiste em uma sequência altamente controlada de eventos bioquímicos e celulares, envolvendo três fases interdependentes: degeneração e/ou inflamação, regeneração e remodelamento (JARVINEN *et al.*, 2005; TIDBALL, 2005). A inflamatória ocorre imediatamente após a lesão e é caracterizada pelos fenômenos vasculares e exsudativos, com a presença de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares). Destaca-se nesta fase que a duração excessiva de mediadores inflamatórios pode ser prejudicial para o processo normal de regeneração muscular, uma vez que amplificam o quadro inflamatório e dificultam a miogênese. Durante o reparo, há uma ativação e proliferação de células satélites e fibroblastos no endomísio, seguida por neovascularização, para que as fibras sejam remodeladas e organizadas. Na fase de remodelamento, as fibras musculares são reconstituídas e reorientadas, além de um aumento gradual das características estrutural e funcional do músculo afetado. Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento de novas abordagens clínicas com o objetivo de modular o processo inflamatório e otimizar a recuperação do tecido muscular, restabelecendo assim sua função fisiológica normal. De acordo com a literatura, o ultrassom terapêutico (US) tem sido utilizada com fins terapêuticos e atualmente é considerada uma técnica segura e eficaz no tratamento clínico de uma série de condições patológicas nos mais diversos tecidos devido suas características analgésica, moduladora do processo de inflamação e reparação tecidual. O US é caracterizado por transferir energia mecânica para dentro do tecido (DOAN *et al.* 1999; KHANNA *et al.* 2008). O US produz excitação celular, que pode melhorar a atividade celular ao invés de inibir, quando aplicado durante um processo inflamatório, o seu efeito geral é de estimular ou facilitar a cascata inflamatória, agindo como um mediador pro inflamatório (WATSON, 2008; RANTANEN *et al.* 1999) e não como um anti-inflamatório (ALFREDO *et al.*, 2009). Embora o US seja um recurso muito utilizado na prática clínica, os mecanismos celulares e moleculares da atuação do mesmo sobre o reparo do tecido muscular permanecem incertos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ultrassom contínuo na regeneração do músculo tibial anterior lesado em ratos.

**Metodologia:** Este trabalho foi conduzido de acordo com as diretrizes do Comitê de ética animal da Universidade de São Paulo (ICB- protocolo 052/03). Para a execução do estudo proposto foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, divididos em 4 grupos (n=5): Grupo submetidos à lesão muscular e não tratados



com US por 21 dias (L21) e 28 dias (L28), Grupo submetidos à lesão muscular e tratado com US por 21 dias (LUS21) e 28 dias (LUS28). Para a realização da lesão muscular, os animais foram previamente anestesiados com solução de Ketamina (80mg/kg) e Xilazina (40mg/kg). Em seguida, utilizando um busturi, foi realizado um corte transversal no terço médio do músculo tibial anterior direito com dimensões de 3mm de largura por 3mm de profundidade. Após, a pele foi suturada e realizou-se a assepsia local com polivinilpirrolidona-iodo. Para o tratamento, foi utilizado um US terapêutico, modo contínuo, 1MHz e 0,2 W/cm<sup>2</sup>, por 1 minuto, 1 vez ao dia, por 21 e 28 dias consecutivos, sendo este iniciado 24 horas após a indução da lesão. Ao término do período experimental (22 e 29 dias após a indução da lesão), os animais serão submetidos à eutanásia com dose letal de anestésico. A primeira aplicação de US ocorreu 24 horas após a lesão, No primeiro dia útil após o termino do período experimental de cada grupo (22 e 29 dias), os animais foram sacrificados, o terço médio do músculo tibial anterior foi seccionado para obtenção dos cortes seriados por congelamento (10 µm de espessura) e corados com reação de HE (hematoxilina-eosina). Para avaliação e comparação dos efeitos do tratamento foram realizadas análises histomorfológicas e densidade de células inflamatórias (polimorfonucleares e mononucleares) e fibroblastos na área da lesão (10 campos por amostra com área de 0,625 mm<sup>2</sup>, utilizando o software Image J). Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade das amostras. Comparações entre os grupos experimentais foram feitas pela análise de variância utilizando ANOVA one-way, seguido pelo pos-teste de Tukey para comparação individual entre os grupos. Os dados expressam a média (±erro padrão da média). Foram considerados significantes valores de  $p < 0,05$ .

**Resultados:** Na análise histomorfológica foi observado intensa quantidade de infiltrado inflamatório no grupo L21 quando comparado ao LUS21. Já, nos grupos L28 e LS28 foi observado a presença de um leve infiltrado inflamatório. No grupo LUS21 apresentou melhor organização longitudinal das fibras musculares quando comparado ao L21. Resultados semelhante foram observados no LUS28 quando comparado ao L28 adicionado à presença de neoformação vascular. Com relação à densidade de células inflamatórias, foi possível observar uma redução do número de inflamatórias nos grupos LUS21 ( $88,8 \pm 1.5$ ) e LUS28 ( $3.6 \pm 1.6$ ) quando comparado aos grupos L21 ( $20.0 \pm 3.3$ ) e L28 ( $12.8 \pm 2.4$ ), respectivamente. Além disso, o número de fibroblasto foi apenas maior no grupo LUS21 ( $27.0 \pm 6.9$ ) em relação ao grupo L21 ( $14.2 \pm 4.4$ ).

**Discussão e Conclusão:** A busca por recursos terapêuticos que possam estimular o processo regenerativo e favorecer a recuperação estrutural e funcional do tecido lesado é a atual procura nas mais diversas áreas da saúde. Entender como reparar um tecido lesado compreende primeiramente o estudo dos mecanismos envolvidos na adaptação tecidual frente aos diferentes estímulos utilizados durante a reabilitação. Baseado nos resultados encontrando no presente estudo, US terapêutico contínuo promoveu uma diminuição na densidade de células inflamatórias e melhorou a organização das fibras musculares nos grupos tratados com US em ambos períodos experimentais. Baseado nestes resultados o US terapêutico pode favorecer o processo de reparo do tecido muscular lesado, reduzindo o tempo do processo inflamatório e otimizando o reparo do tecido muscular lesado.

**Palavras chaves:** regeneração muscular; ultrassom terapêutico contínuo; fibroblastos.