

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Análise morfométrica da regeneração muscular em animais idosos tratados
com exercício de natação e ultrassom terapêutico

Luís Felipe Chedid Schilling
2013

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luís Felipe Chedid Schilling

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO MUSCULAR EM ANIMAIS IDOSOS TRATADOS COM EXERCÍCIO DE NATAÇÃO E ULTRASSOM TERAPÊUTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Dosimetria e convalidação de recursos fisioterapêuticos.

Orientadora: Profª Drª Adriana Pertille

PIRACICABA
2013

Dedico este trabalho aos meus pais e irmã, que suportaram a saudade para que eu realizasse este sonho.

À minha avó Eulina, pelo exemplo de alegria e vivacidade.

AGRADECIMENTOS

Realizar um sonho é uma escolha árdua que requer muita dedicação, esforço e privações, porém ao longo do caminho encontramos pessoas que ajudam a tornar essa tarefa mais leve. Por isso tenho muito a agradecer.

Aos meus pais, Marco Antônio Ruas Schilling e Sabine Braga Chedid, por nunca terem medido esforços para apoiar e proporcionar meus sonhos, sempre me ensinado a seguir os princípios morais e valorizar o estudo. Meu incentivo é a vontade de lhes orgulhar e retribuir tudo o que fizeram e continuam a fazer por mim. Obrigado pela confiança!

À Minha irmã Ana Paula Chedid Schilling por todo o carinho, cumplicidade e empenho em se fazer presente, independente da distância. Tuas visitas me carregavam de energia para concluir este trabalho.

À Adriana Sillman Hergert por estar do meu lado em todos os momentos. Pela paciência, apoio e conforto nos momentos difíceis e por me manter forte e focado. Foste muito mais que namorada, foste amiga e exemplo.

À Profª Drª Adriana Pertille por toda paciência, carinho e incentivo na orientação. Foste exemplo de como educar com dedicação e amor. Teus ensinamentos não se limitaram à minha vida acadêmica. Levarei teus conselhos comigo para toda a vida.

Ao meu braço direito, Paulo Cesar Oliveira. Tua ajuda foi imprescindível nesta conquista. Domingos e feriados cuidando dos ratinhos se tornaram mais agradáveis com teu companheirismo.

Aos demais amigos de laboratório e colegas de mestrado, em especial à Aline, Cássio, Thiago, Elie e Ana Claudia. Obrigado pelo apoio e por fazerem dos laboratórios ambientes sempre divertidos.

Aos professores Dr. Carlos Alberto Silva e Dr. Renato Ferretti e às professoras Drª Delaine Rodrigues Bigaton, Drª Maria Luiza Polacow e Drª Marlene Aparecida Moreno pela contribuição neste trabalho e na minha formação acadêmica.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

RESUMO

O processo de envelhecimento, e as conseqüentes alterações morfofisiológicas dele decorrentes, desencadeiam a redução da habilidade regenerativa das células satélites, redução da vascularização tecidual e aumento da produção de fibroblastos, desenvolvendo-se, por fim, um ambiente celular desfavorável para a ativação e sustentação de um mecanismo regenerativo adequado. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com exercício de natação e ultrassom sobre a regeneração muscular de modelos experimentais idosos após lesão miotóxica. Foram utilizados 40 ratos Wistar com 18 meses de idade, divididos em 4 grupos experimentais: lesão (LE; n=10) somente submetidos à lesão; ultrassom (US; n=10), que após a lesão receberam tratamento com ultrassom pulsado de 1MHz; natação (NAT; n=10), cujos animais foram tratados com um programa de exercício de natação; e natação+ultrassom (NATUS; n=10), que receberam ambas as terapias após a lesão. Os animais foram submetidos à lesão por bupivacaina no músculo tibial anterior direito e as amostras foram coletadas 7 e 14 dias após a lesão, totalizando 3 e 6 sessões de tratamento, respectivamente. A análise da regeneração muscular foi realizada através de microscopia de luz. Para análise estatística utilizou-se os testes ANOVA one-way e Tukey. Nos resultados obtidos a análise histológica demonstrou que após 14 dias houve redução significativa na área de inflamação/regeneração em todos os grupos de tratamento quando comparados ao grupo LE14. Com relação à área de secção transversal das fibras em processo de regeneração, nenhuma das terapias utilizadas foi capaz de melhorar a maturação das fibras musculares, e após 14 dias as fibras do grupo NATUS14 se mostraram significativamente menores do que os demais grupos estudados. Conclui-se que as terapias propostas demonstraram eficácia somente na redução da área de inflamação/regeneração. A combinação das terapias comprometeu a maturação das fibras musculares.

Palavras-chave: envelhecimento, regeneração muscular, terapia por ultrassom, exercício de natação.

ABSTRACT

The aging process and the morphophysiological changes resulting from it, triggering a reduction in regenerative ability of satellite cells, reducing vascular tissue and increasing production of fibroblasts, developing, finally, a cellular environment unfavorable for the activation and maintenance of a regenerative mechanism appropriate. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of swimming exercise and pulsed ultrasound therapy treatment on muscle regeneration of the old experimental models after myotoxic injury. Wistar old rats with 18 months old were divided in four groups: G. injury (IN; n=10), the animals were submitted to muscle injury and received no treatment; G. ultrasound (US; n=10), after the injury the animals were treated with pulsed ultrasound 1 MHz; G. swimming (SW; n=10), after the injury the animals were treated with swimming exercise; and G. swimming+ultrasound (SW+US; n=10), after the injury the animals were treated with both therapies. The myotoxic injury was induced by bupivacaine in Tibialis Anterior muscle and the samples were collected after 7 and 14 days after injury, totaling 3 and 6 sessions. The muscle regeneration was evaluated by Light Microscopy. The data were statistically analyzed by one-way ANOVA and Tukey's tests. The histological analysis showed that after 14 days of treatment there was significant reduction in the area of inflammation/regeneration in all groups compared to IN14 group. About the cross-sectional area of fibers in regeneration process, no therapies used were able to improve the maturation of muscle fibers, and after 14 days the muscle fibers of SWUS14 group were significantly smaller than the other groups studied. The results of the present study suggest that the proposal therapies have only demonstrated efficacy in the reduction of inflammation/regeneration area. The combination of therapies committed the maturation of muscle fibers.

Keywords: Aging, muscle regeneration, ultrasound therapy, swimming exercise.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Animais	13
3.2 Lesão Muscular	13
3.3 Grupos Experimentais	13
3.4 Aplicação do UST	14
3.5 Protocolo de Treinamento Físico - Natação	14
3.6 Coleta do Material	15
3.7 Análise Histológica	15
3.8 Análise dos Resultados	16
3.9 Análise Estatística	17
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXO	43

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético possui uma grande capacidade de adaptação diante de variados tipos de estímulos, sejam eles fisiológicos, como exercício, ou em condições patológicas, como lesões e doenças degenerativas. Esta capacidade denomina-se plasticidade (Grounds et al., 2002; Shi et al., 2006). Este importante potencial regenerativo se deve a uma população de células especiais com grande capacidade mitogênica, as células satélite. Quando ativadas, diferenciam-se em mioblastos, e fundem-se para formar miotubos que então se desenvolvem em uma nova fibra ou fundem-se a outras, a fim de construir ou reparar uma fibra muscular (Lieber, 2002; Chargé e Rudnicki, 2004; Gayraud-Morel et al., 2009; Tedesco et al., 2010).

Os mecanismos de diferenciação e crescimento de um músculo em regeneração dependem de uma variedade de fatores de crescimento e miogênicos (Marsh et al., 1998). Sabe-se que a manutenção do potencial regenerativo do músculo esquelético depende, inclusive, da idade do indivíduo (Renault et al., 2000; Charge, Brack e Hughes, 2002). As alterações morfofisiológicas que ocorrem nos tecidos em decorrência do envelhecimento, contribuem para o declínio da habilidade das células satélites em reparar o tecido lesado (Young et al., 2004). Pesquisas relatam sobre a diminuição na quantidade de células satélites em decorrência do envelhecimento (Gibson e Shultz, 1983; Shefer et al., 2006), contudo, o número de células satélites remanescentes no tecido muscular envelhecido é suficiente para a ativação e sustentação de um mecanismo regenerativo adequado, se não houver a associação de um ambiente celular desfavorável (Carosio et al., 2009).

A ineficiência na ativação e proliferação das células satélites decorrente do desequilíbrio em vias de sinalização, lenta ativação de células inflamatórias, aumento da produção de fibroblastos, diminuição da vascularização, espessamento da lamina basal e redução no nível de IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) são algumas das alterações provenientes do envelhecimento, que geram um ambiente celular desfavorável e consequentemente prejudicam a regeneração muscular (Burdzińska, Gala e Paczek, 2008; Silva e Conboy, 2008; Desaki, 2008; Carosio et al., 2009, Degens, 2010).

Vários modelos de lesão são propostos para examinar os mecanismos de regeneração do músculo esquelético, dentre eles a contusão, criolesão e uso de substâncias químicas, como anestésicos. A bupivacaina é um anestésico miotóxico que induz a degeneração de cerca de 80% das fibras de um músculo esquelético (Marsh et al., 1998). Este modelo de lesão é amplamente utilizado em estudos experimentais por apresentar fácil reprodutibilidade e uma reação inflamatória mais intensa quando comparada a lesões realizadas com outros anestésicos como lidocaína, articaína e mepivacaína (Pinto et al., 2008).

A grande incidência de lesões musculares tem ocasionado aumento de estudos relacionados não somente ao processo de regeneração muscular, mas também aos tratamentos fisioterapêuticos (Ferrari et al., 2005). Dentre os quais podemos destacar recursos eletro-termo-fototerápicos (ultrassom terapêutico, laser, ondas curtas, estimulação elétrica nervosa transcutânea e infravermelho) e cinesioterapêuticos (exercícios terapêuticos e terapia manual).

Uma modalidade cinesioterapêutica muito utilizada na reabilitação de disfunções musculoesqueléticas é o exercício aquático. A redução de peso corporal na água promove menor estresse nas articulações e tecidos moles, e a temperatura aquecida da água promove diversos efeitos fisiológicos, como aumento da circulação periférica e diminuição da sensibilidade dos terminais nervosos, tornando este exercício seguro e incrementando o processo de reparação tecidual (Burns e Lauder, 2001; Faria et al., 2008; Pestana et al., 2011). Os efeitos da terapia na água dependem de fatores como a temperatura e profundidade, a duração do tratamento, o tipo e intensidade do exercício e a necessidade específica de cada indivíduo (Degani, 1998; Pestana et al., 2011). Contudo, os variados protocolos utilizados nesta modalidade ainda causam divergências entre os resultados obtidos (Faria et al., 2008; Pestana et al., 2011).

Faria et al. (2008), através de um protocolo de mobilização precoce de intensidade moderada, constataram melhora no processo de reparo (aumento no número de fibras) nos grupos submetidos à terapia. Já Pestana et al. (2011) utilizando-se de um protocolo intenso, porém tardio, não observaram alterações morfológicas nos grupos que realizaram exercício aquático.

Outro recurso amplamente utilizado nas práticas clínicas e desportivas é o ultrassom terapêutico (UST), que produz diversos efeitos como aumento do metabolismo local, aumento da circulação, extensibilidade do tecido e regeneração tecidual (van der Windt et al., 1999; Berna-Senna et al., 2005). É comumente aplicado nos distúrbios do sistema musculoesquelético, como na aceleração da regeneração de lesões musculares (Dyson, 1987).

A variedade de parâmetros observados na prática clínica indica o uso indiscriminado do UST para amenizar os sintomas e as manifestações inflamatórias que envolvem o sistema musculoesquelético. Experimentos realizados com este recurso demonstram que sua interação com os tecidos biológicos provoca alterações fisiológicas, que podem ser benéficas ou não dependendo dos parâmetros utilizados (Lopes et al., 2005). Além disso, é comum na prática clínica a associação do UST com outras terapias, como o exercício físico, com o objetivo de potencializar os seus efeitos (van der Windt et al., 1999).

Markert et al. (2005) utilizaram o ultrassom contínuo de 3 MHz, com intensidade de $0,1 \text{ W/cm}^2$ na contusão do músculo gastrocnêmio de animais jovens e tratados por 4 semanas. Os efeitos da terapia foram avaliados de forma isolada ou combinada com o treinamento de caminhada em esteira. A análise histológica, incluindo a quantificação da área de secção transversa (AST) das fibras musculares, não demonstrou diferença entre os grupos.

Há um grande interesse em encontrar meios para acelerar e melhorar o processo de reparo muscular, especialmente em situações como lesões em atletas, transplantes, distrofias musculares, atrofia por desuso, entre outras (Pestana et al., 2011). Contudo, ainda existem poucos estudos voltados aos mecanismos de regeneração muscular em modelos direcionados ao idoso e à sarcopenia. O prejuízo da função muscular afeta sensivelmente a qualidade de vida do idoso, tornando mais difícil ou impossibilitando a execução de atividades de vida diária. A perda de funcionalidade e a consequente dependência podem acarretar também problemas psicológicos e emocionais, comprometendo a qualidade de vida do idoso (Lacourt e Marini, 2006).

A população de idosos vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas, como também a preocupação com o envelhecimento saudável. Segundo dados do IBGE, a projeção da população brasileira de pessoas acima de 80 anos aumentará de 2.982.240 em 2013 para 5.912.229 em 2030, com maioria do gênero feminino (IBGE, 2008). Neste contexto, é notório o número de idosos que frequentam academias, clubes ou centros de reabilitação para praticar algum tipo de atividade física. Entretanto, a atividade física excessiva ou mal orientada pode resultar em lesões ou dores musculoesqueléticas, que requerem a intervenção fisioterapêutica.

Posto isto, este trabalho visa prover ao fisioterapeuta informações sobre a aplicabilidade e efetividade do exercício de natação e do ultrassom terapêutico, de forma isolada ou associada, sobre a lesão no tecido envelhecido. Considera-se a hipótese que a associação dos recursos pode ser benéfica no tratamento de lesões musculares no modelo experimental idoso, acelerando o processo de regeneração.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com exercício de natação e ultrassom terapêutico sobre a regeneração muscular de animais idosos após lesão induzida por anestésico local.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a regeneração muscular em animais idosos;
- Avaliar e comparar a eficácia do tratamento com exercício de natação e US de 1MHz, 7 e 14 dias após a lesão;
- Analisar morfometricamente, através da quantificação da área de secção transversa e percentual de tecido conjuntivo, a relação dos tratamentos propostos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar, com 18 meses de idade oriundos do Biotério Central da UNIMEP e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob temperatura ambiente de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, submetidos a ciclo claro/escuro de 12h, com água e ração *ad libitum*. Este projeto faz parte de um trabalho desenvolvido pelo grupo aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, através do protocolo nº 012/2010 (Anexo 1).

3.2 Lesão Muscular

O músculo tibial anterior (TA) direito de todos os animais recebeu injeção intramuscular (99 mg/Kg) de bupivacaina (Bupstésic[®] com vaso, União Química S/A), segundo protocolo de Pinto et al. (2008). Para aplicação os animais foram contidos manualmente por um pesquisador, enquanto outro pesquisador realizava o procedimento.

3.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos:

- Lesão (L, n=10): submetidos à lesão no TA, sem nenhum tipo de intervenção;
- Natação (NAT, n=10): submetidos à lesão e ao protocolo de treinamento físico;
- Ultrassom (US, n=10): submetidos à lesão e tratados com UST;
- Natação + Ultrassom (NATUS, n=10): submetidos à lesão, ao protocolo de treinamento físico e posteriormente à aplicação do UST.

Com o objetivo de acompanhar o processo de regeneração, os grupos foram subdivididos em dois tempos distintos, com eutanásia no 7º dia após a lesão (n=5 por

grupo) e 14º dia após a lesão (n= 5 por grupo). A pata esquerda foi considerada como controle (CT).

3.4 Aplicação do UST

O UST foi aplicado na região do músculo TA dos grupos US e NATUS. O equipamento utilizado foi Sonapulse IBRAMED® de 1 MHz (registro ANVISA nº 10360310024), cabeçote com área efetiva de radiação (ERA) de 1 cm², intensidade 1,5 W/cm², modo pulsado a 50%, resultando em intensidade instantânea de 0,75 W/cm² com frequência de 16 Hz. O equipamento foi aferido e calibrado antes do início da terapia.

Cada sessão teve duração de 5 minutos, utilizando como meio de contato gel hidrossolúvel. As aplicações foram realizadas 3 vezes por semana, por 7 e 14 dias após a lesão, no período matutino, sendo a primeira aplicação realizada 24 h após a lesão. Para aplicação do recurso os animais foram contidos manualmente por um pesquisador, enquanto o outro realizava o procedimento. Após o término do tratamento o grupo 7 dias realizou um total de três sessões e o grupo 14 dias um total de seis sessões.

3.5 Protocolo de Treinamento Físico - Natação

Os animais dos grupos NAT e NATUS foram submetidos a um programa de natação, 3 vezes por semana, com duração de 30 minutos. Para o treinamento utilizou-se um tanque coletivo com água numa altura de 40 cm e temperatura de 30° C ± 2° C. Os animais foram adaptados previamente ao treinamento na semana que antecedeu a lesão, permanecendo 10 minutos no tanque no primeiro dia, com acréscimo de 10 minutos por mais dois dias, totalizando 30 minutos (DALIA et al., 2011). Não foi colocado nenhum tipo de

carga no animal e ao final do treinamento o grupo 7 dias realizou um total de três sessões e o grupo 14 dias um total de seis sessões.

3.6 Coleta do Material

A eutanásia ocorreu no 7º e 14º dia após a lesão. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina (50mg/mL) e cloridrato de xilazina (2g/100mL), na proporção de 1:1, em dose de 0.3 mL/100g de peso corporal. Após sinais de anestesia geral, o músculo tibial anterior de ambas as patas foi retirado, pesado e fixado em suporte de madeira com tragacanth gum, imerso em isopentano à -80°C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -159°C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70°C. Para obtenção dos cortes, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23° C, seccionados transversalmente utilizando criostato (Microm-HS505E) e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) ou Tricrômico de Masson (TM).

3.7 Análise Histológica

Cortes transversais seriados com espessura variando entre 8 e 12 µm foram coletados do músculo TA de cada animal, para as seguintes análises:

- **Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE):** para análise da localização do núcleo, da área de secção transversa (AST) das fibras musculares e da presença de áreas de inflamação/regeneração. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina segundo a rotina do laboratório, desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan.

- **Coloração por Tricrômico de Masson:** para marcação de tecido conjuntivo. Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, lavados em água corrente e imersas em solução de Masson (0,7g de Ponceau Fucsina, 0,03g de Fucsina ácida, 0,7g de Orange G e 100ml de solução de ácido acético 0,2%), banhadas em solução de ácido acético a 0,2% e mergulhadas em solução de verde-luz, desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan.

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 20X e conectado a um computador com software *Image Pro-Plus*® 6.2 (Media Cybernetics).

3.8 Análise dos resultados

Para a análise da área de secção transversa foram utilizados dois cortes aleatórios por lâmina, sendo uma lâmina para cada animal, onde foram contadas 200 fibras musculares normais (CT) e 200 fibras em regeneração. As fibras foram classificadas a cada 200 μm^2 para análise da variância. Também foi quantificada a porcentagem de infiltrado inflamatório e a área em regeneração (% Infl/Reg).

As áreas de inflamação/regeneração foram caracterizadas por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração. Essas fibras possuem pequeno diâmetro, citoplasma escasso fortemente basófilo e núcleo central (Grounds e Torrisi, 2004; Grounds et al., 2005; Marques et al., 2008; Pertille, Macedo e Oliveira, 2012). As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 28X e conectado a um computador com software *Image Pro-Plus*® 6.2 (Media Cybernetics).

A mensuração da quantidade de tecido conjuntivo, nas lâminas coradas com Tricrômico de Masson foi realizada através do software *Image ProExpress* com imagens

adquiridas através de vídeo câmera (Nikon Express Series), acoplada ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 400) com objetiva de 28X.

Foram analisadas 15 imagens por animal, e sobre as imagens foi sobreposta uma grade contendo 88 intersecções, onde foram contabilizadas aquelas que se sobrepunham sobre tecido conjuntivo, e posteriormente transformadas em porcentagem.

3.9 Análise Estatística

A avaliação dos dados foi realizada através do programa SPSS 13.0, considerando média e desvio padrão. Para análise estatística utilizaram-se os testes de Shapiro-Wilk para normalidade e ANOVA one-way e Tukey para os dados com distribuição normal. Para todas as análises foi adotado um valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

4. RESULTADOS

O peso corporal dos animais não apresentou diferença entre os grupos, mantendo peso compatível com a idade de 18 meses. O músculo TA direito (lesado) apresentou redução (em média 25%) no peso quando comparado ao respectivo controle (TA esquerdo) em todos os grupos 14 dias ($p < 0,05$). No grupo NAT7 observou-se redução (30%) do peso do TA direito quando comparado ao esquerdo ($p < 0,05$). Houve diferença significativa entre os músculos TA direito nos grupos LE7 e LE14, sendo que o grupo LE14 apresentou menor peso muscular (33%; $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os músculos SOL direito e esquerdo (Tabela 1).

Tabela 1: Valores em média e desvio padrão do peso corporal dos músculos tibial anterior (TA) e sóleo (SOL) em gramas, de todos os grupos estudados, do lado direito (D - lesado) e esquerdo (E - controle).

Grupo	Peso Corporal (g)	TA D (g)	TA E (g)	SOL D (g)	SOL E (g)
Lesão 7 dias	615,93 ± 44,6	0,854 ± 0,15 [#]	0,957 ± 0,10	0,245 ± 0,04	0,248 ± 0,06
Lesão 14 dias	546,44 ± 73,3	0,566 ± 0,04*	0,853 ± 0,07	0,203 ± 0,01	0,202 ± 0,03
Natação 7 dias	554,16 ± 106,33	0,668 ± 0,13*	0,952 ± 0,09	0,218 ± 0,02	0,234 ± 0,02
Natação 14 dias	577,72 ± 36,74	0,636 ± 0,07*	0,939 ± 0,12	0,230 ± 0,04	0,237 ± 0,04
US 7 dias	543,68 ± 43,99	0,722 ± 0,12	0,866 ± 0,12	0,214 ± 0,02	0,242 ± 0,04
US 14 dias	581,99 ± 62,50	0,613 ± 0,06*	0,917 ± 0,02	0,246 ± 0,03	0,233 ± 0,04
NATUS 7 dias	562,16 ± 48,09	0,719 ± 0,07	0,891 ± 0,07	0,238 ± 0,04	0,233 ± 0,03
NATUS 14 dias	619,31 ± 44,36	0,701 ± 0,17*	0,968 ± 0,09	0,253 ± 0,04	0,260 ± 0,01

* difere do respectivo controle; # difere do grupo LE14; $p < 0,05$

A análise morfológica permitiu verificar que os músculos do grupo controle apresentaram aspecto histológico normal, com presença de fibras com núcleos periféricos, sem sinais de lesão ou processo inflamatório (Figura 1).

Todos os grupos apresentaram área de inflamação/regeneração compatível à lesão realizada. Nos grupos 7 dias notou-se grande infiltrado inflamatório e fibras musculares em processo inicial de regeneração. Nos grupos 14 dias observou-se redução do infiltrado inflamatório e fibras musculares em processo avançado de regeneração, com núcleo centralizado (Figura 1).

O grupo LE14 diferiu dos demais grupos do mesmo período ($p < 0,01$), sugerindo que o processo inflamatório foi extenso neste grupo (Figura 2).

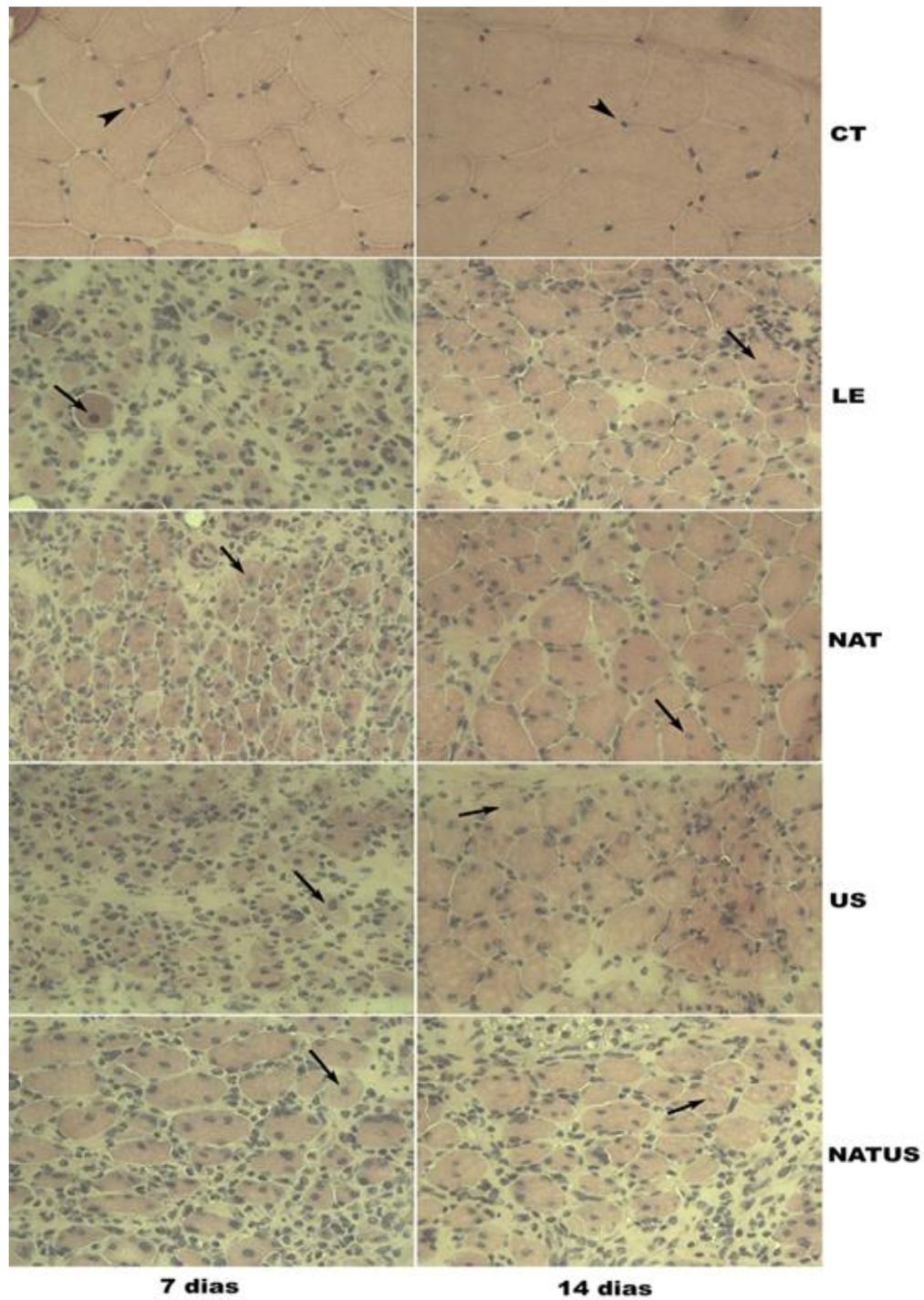


Figura 1: Cortes transversais do músculo tibial anterior corados com HE. Grupos CT: controle, LE: lesão; NAT: natação; US: ultrassom; NATUS: natação associado ao ultrassom; 7 e 14 dias após a lesão. Observar posicionamento dos núcleos periférico no grupo CT (cabeça de seta) e centralizado (seta) e processo inflamatório nos demais grupos. Aumento: 28x.

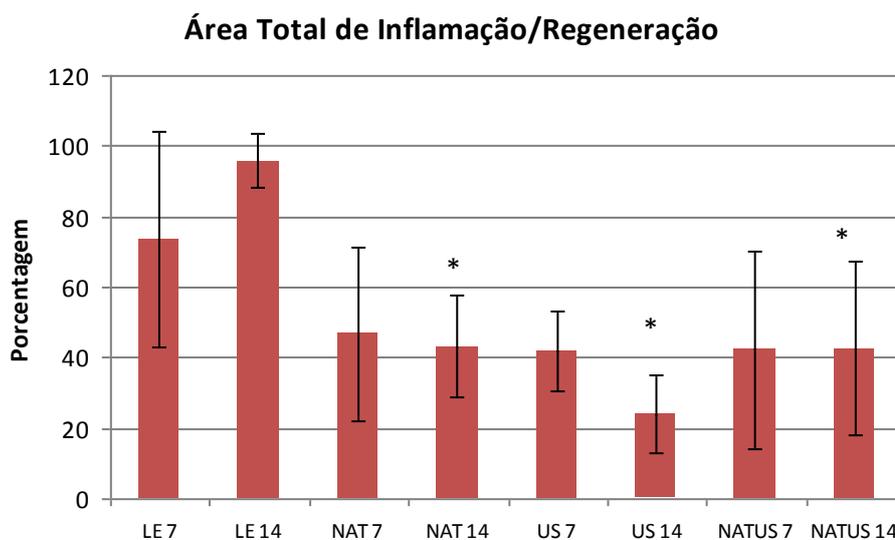


Figura 2: Porcentagem de área total de inflamação/regeneração nos grupos analisados. LE: lesão; NAT: natação; US: ultrassom; NATUS: natação associado ao ultrassom; 7 e 14 dias após a lesão. * difere do grupo LE14 ($p < 0,01$).

Em relação à quantificação de tecido conjuntivo, o grupo controle apresentou em média 0,8% de tecido conjuntivo, considerado normal para um músculo sadio (Figura 3). Os grupos NAT e NATUS 7 dias apresentaram redução na porcentagem de tecido conjuntivo quando comparados ao grupo LE7, sugerindo que a natação favoreceu inicialmente o processo de regeneração muscular ($p < 0,01$). Entretanto, nos grupos 14 dias não houve diferença estatística (Figuras 3 e 4).

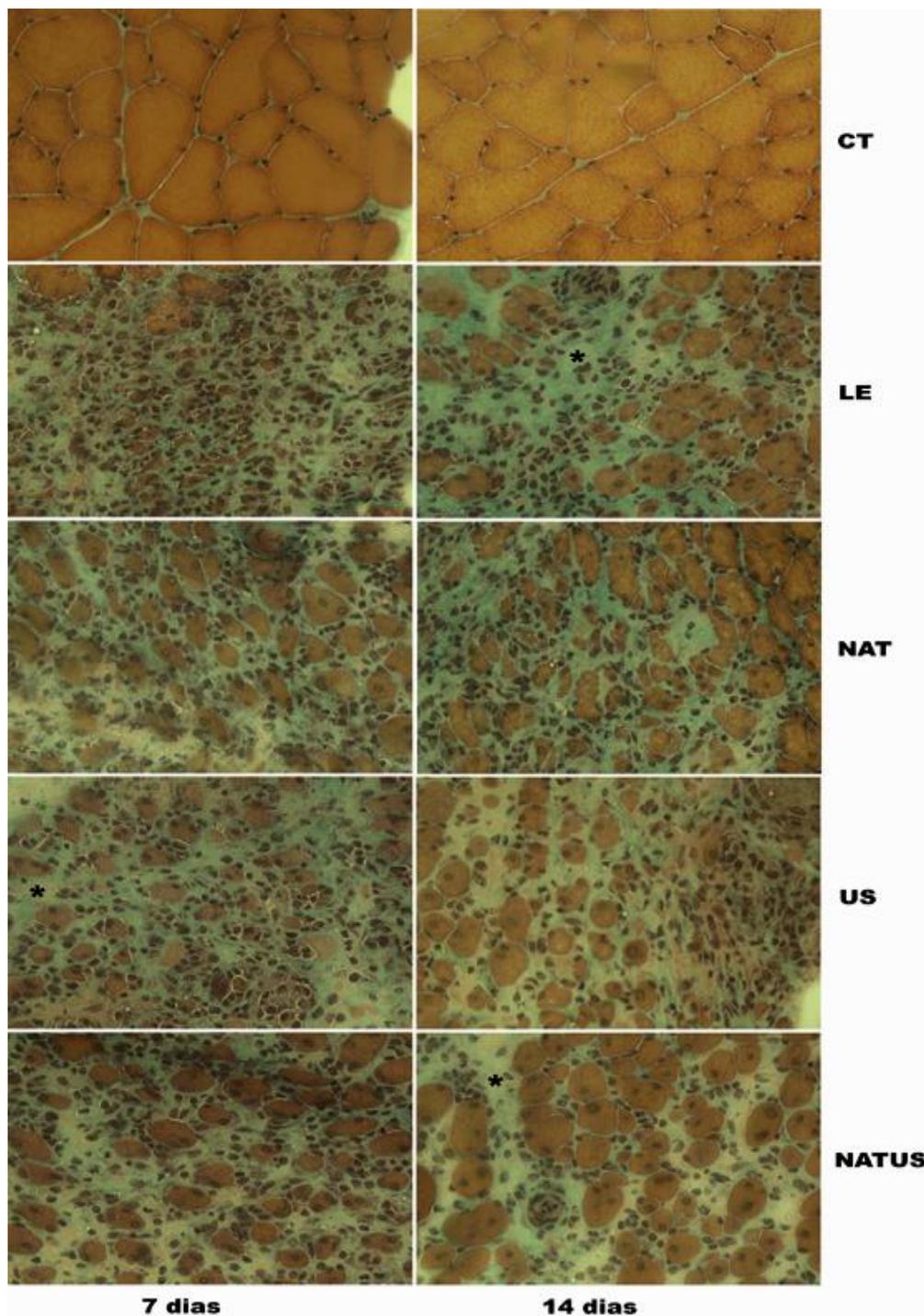


Figura 3 – Cortes transversais do músculo tibial anterior de ratos idosos corados com Tricrômico de Masson. Grupos CT: controle, LE: lesão; NAT: natação; US: ultrassom; NATUS: natação associado ao ultrassom; 7 e 14 dias após a lesão. Nota-se o tecido conjuntivo em verde (*) e presença de fibras em regeneração em todos os grupos tratados. Aumento de 28 x.

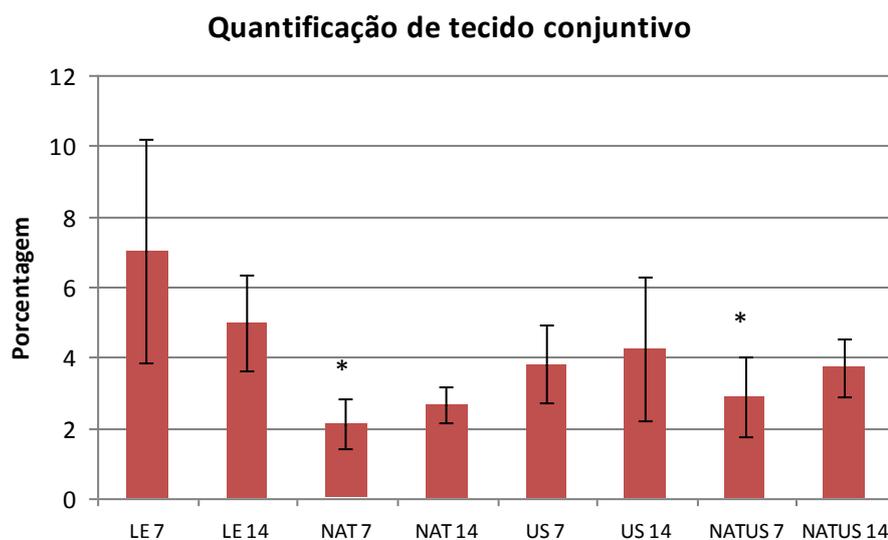


Figura 4: Porcentagem de tecido conjuntivo nos grupos analisados. LE: lesão; NAT: natação; US: ultrassom; NATUS: natação associado ao ultrassom; 7 e 14 dias após a lesão. * difere do grupo LE7 ($p < 0,01$).

Após 7 dias da lesão todos os grupos analisados apresentaram fibras musculares em estágio inicial de regeneração semelhante, como observado na Figura 5. Nesta fase as fibras musculares apresentaram diferentes áreas de secção transversa, com predomínio nas faixas de 300 a 700 μm^2 . O grupo LE7 não apresentou fibras maiores que 1.300 μm^2 e apenas os grupos US e NATUS apresentaram fibras com área entre 1.701 a 1.900 μm^2 .

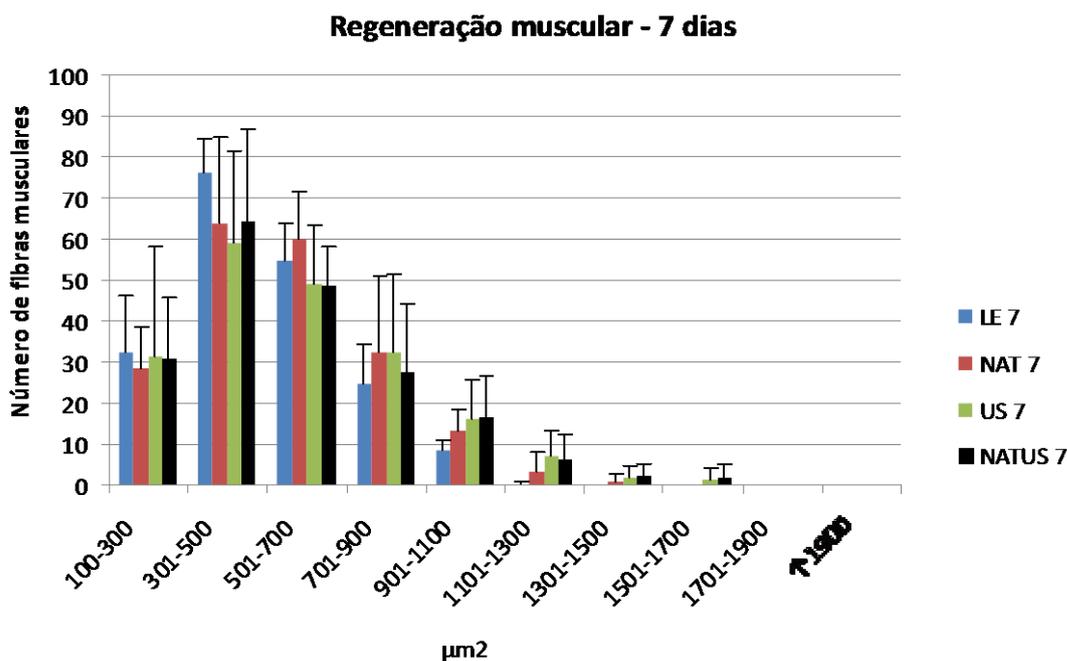


Figura 5: Média do número de fibras musculares em diferentes faixas de área de secção transversal em μm^2 . LE: lesão; NAT: natação; US: ultrassom; NATUS: natação associado ao ultrassom; 7 dias após a lesão.

Após 14 dias da lesão observou-se predomínio do número de fibras musculares nas faixas entre 500 a 1.100 μm^2 . O grupo NATUS14 apresentou redução na área de secção transversal diferindo dos demais grupos analisados (Figura 6), sugerindo que a associação dos recursos (natação e ultrassom) não favoreceu a maturação da fibra muscular do animal idoso.

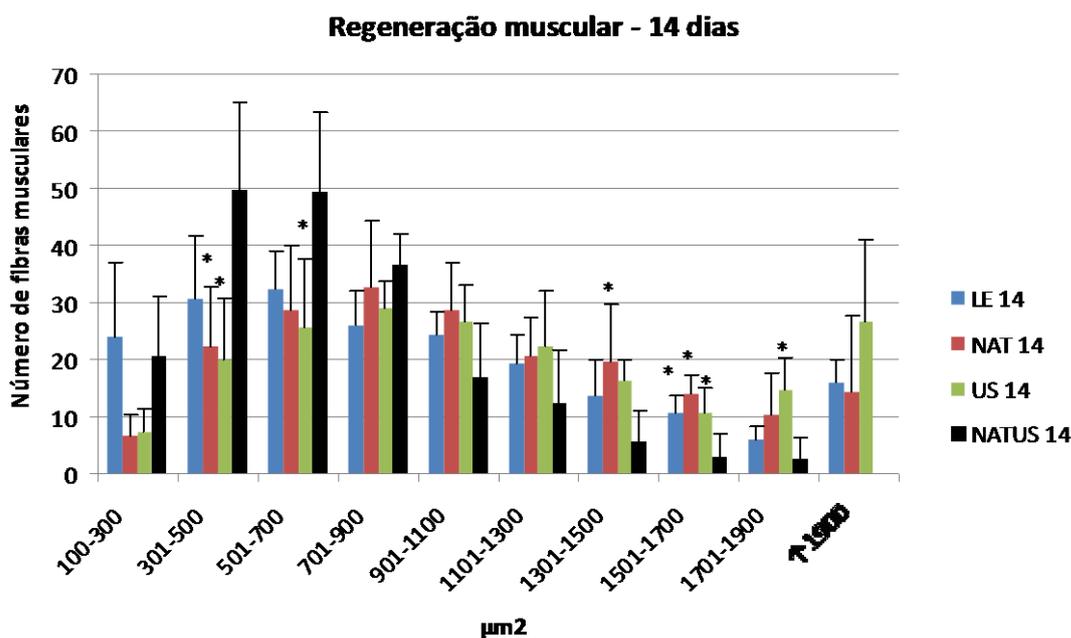


Figura 6: Média do número de fibras musculares em diferentes faixas de área de secção transversal em μm^2 . LE: lesão; NAT: natação; US: ultrassom; NATUS: natação associado ao ultrassom; 14 dias após a lesão. * difere do grupo NATUS na respectiva faixa.

Na Figura 7 observa-se a evolução do processo de regeneração muscular nos grupos analisados, comparando 7 e 14 dias. Nota-se um perfil semelhante entre os grupos LE, NAT e US, com aumento significativo no número de fibras musculares com maior área de secção transversal 14 dias após a lesão. Entretanto, no grupo NATUS tal característica não foi observada, sugerindo que a associação dos recursos pode ter comprometido a maturação das fibras musculares após 14 dias da lesão.

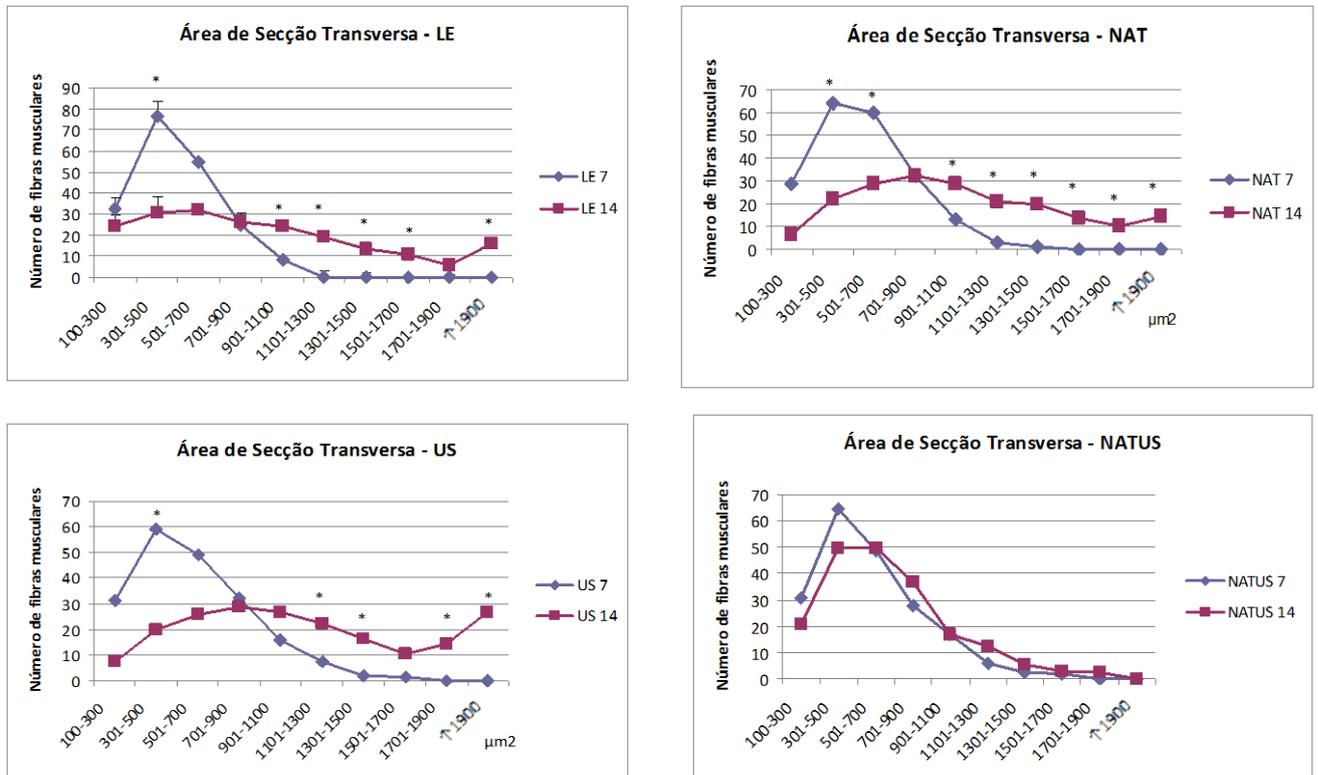


Figura 7: Média do número de fibras musculares em diferentes faixas de área de secção transversal em μm^2 . LE: lesão; NAT: natação; US: ultrassom; NATUS: natação associado ao ultrassom; 7 e 14 dias após a lesão. * diferença entre 7 e 14 dias na respectiva faixa.

5. DISCUSSÃO

A análise morfométrica demonstrou que após 14 dias houve redução significativa na área de inflamação/regeneração em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo LE14. Com relação à área de secção transversal das fibras em processo de regeneração, nenhuma das terapias utilizadas foi capaz de melhorar a maturação das fibras musculares, e após 14 dias as fibras do grupo NATUS se mostraram significativamente menores do que os demais grupos estudados.

Ao estudar a regeneração muscular em animais idosos é preciso considerar a instalação do processo de envelhecimento e o efeito que este desencadeia na regeneração. O declínio na quantidade de células satélites quiescentes no músculo esquelético, somado ao conjunto de fatores que prejudicam sua ativação e proliferação, resulta no comprometimento da funcionalidade dessas células e, conseqüentemente, na deficiência da capacidade regenerativa do músculo esquelético de indivíduos idosos (Vignaud et al., 2003; Brack e Rando 2007; Denges, 2010).

O modelo de lesão utilizado neste estudo não é similar ao que geralmente encontramos na prática clínica. Entretanto, a lesão causada por um anestésico miotóxico produz danos similares entre os animais, facilitando a comparação intra e intergrupos. Além disso, por não haver cicatriz como em modelos de criolesões, não é necessário aguardar alguns dias para iniciar a atividade aquática. Isto se torna importante visto que estudos mais recentes apontam que uma mobilização imediata favorece a regeneração do músculo lesado (Gregory et al., 1995; Menetrey et al. 1999; Faria et al., 2008).

A natação foi escolhida por ser uma atividade física amplamente utilizada na reabilitação de pacientes ortopédicos, principalmente idosos. A redução do peso corporal na água reduz o impacto nas articulações, prevenindo lesões secundárias (Burns e Lauder, 2001). Dentre os efeitos fisiológicos desta atividade, o aumento da circulação periférica e consequente aumento dos suprimentos de oxigênio e outros nutrientes, e ainda a ação da pressão hidrostática favorecendo uma melhora do retorno sanguíneo e linfático, reduzindo assim edemas, podem corroborar com o processo de regeneração muscular (Pestana et al., 2012).

Embora ainda escassos, há um interesse crescente na realização de estudos experimentais tendo a natação como atividade eleita. Entretanto, ainda não há consenso sobre o melhor protocolo a ser seguido e o efeito de algumas variáveis sobre a regeneração muscular, como o tempo do início do tratamento, o tempo de cada sessão e a duração total da terapia, assim como sua frequência, ainda não foram bem definidos.

Faria et al. (2008) realizaram três diferentes protocolos de natação em animais jovens submetidos à lesão por anestésico. Seus achados indicam que a mobilização precoce é superior à tardia, e que uma sessão de treinamento mais prolongada (45 minutos) é melhor que uma sessão curta (15 minutos).

Outros estudos apontam que um protocolo de treinamento mais intenso, de 90 min/dia, 6 vezes por semana, não apresenta diferença significativa tanto nos aspectos morfológicos e quanto a expressão de fatores miogênicos em animais jovens submetidos à criolesão (Pestana et al., 2011; Pestana et al., 2012).

Elegemos para nosso estudo um protocolo de atividade de intensidade leve a moderada, visto que se tratava de animais idosos e que estes, segundo Behnke et al. (2006), apresentam níveis de atividade espontânea aproximadamente quatro vezes menor do que animais jovens. O UST, além de ser um recurso comumente utilizado na prática clínica, geralmente é associado a outras terapias como mobilização e resfriamento com bolsas de gelo. As ondas mecânicas longitudinais de alta frequência são capazes de produzir alterações celulares por desencadear movimento molecular no tecido irradiado (Warden, 2003).

Os parâmetros de aplicação propostos para UST visaram com frequência de 1 MHz atingir a profundidade do tecido muscular, e o modo pulsado a 50% para preconizar o efeito mecânico, além da indicação do uso em lesão muscular na fase aguda (Dyson, 1982), visto que o tratamento teve início 24 h após a lesão.

Durante a fase inflamatória, o UST atua de forma estimulante aos mastócitos, leucócitos e macrófagos. Por aumentar a atividade destas células, o UST atua de forma pró-inflamatória. O benefício deste modo de ação não consiste em aumentar a reação inflamatória ou sua intensidade, mas sim como um otimizador, melhorando sua qualidade (Rantanen et al., 1999; Watson, 2008).

O presente estudo mostra que após 14 dias ambos os tratamentos propostos, assim como sua combinação apresentaram área de inflamação/regeneração reduzida, quando comparados ao grupo que não recebeu intervenção terapêutica (LE).

Rantanen et al. (1999) realizaram estudo sobre os efeitos do ultrassom de 3 MHz na regeneração de fibras musculares após lesão no músculo gastrocnêmio de ratos.

Utilizando técnicas de imunohistoquímica e morfometria evidenciaram a proliferação significativa de células satélites (96%) com o uso do ultrassom pulsado, intensidade de 1,5 W/cm², durante os primeiros estágios do reparo. Em outro estudo semelhante (Piedade et al., 2008), analisando o mesmo músculo, porém utilizando ultrassom pulsado de 1 MHz com intensidade 0,57 W/cm², foi encontrado aumento na deposição de colágeno após 4 e 14 dias de tratamento, além da formação de mioblastos e miotubos evidenciada após 14 dias de tratamento.

Embora o UST seja conhecido por sua capacidade de aquecimento de tecidos profundos, ele apresenta outros efeitos nos tecidos que não estão relacionados à geração de calor. Johns (2002) propôs um mecanismo molecular pelo qual as propriedades mecânicas do US interagem com complexos moleculares dentro das células, modulando assim as propriedades da membrana, o metabolismo celular e síntese de substâncias, especialmente a ativação de proteínas e vias de transdução de sinais, o que resulta em modificações na função celular.

Os efeitos não-térmicos do UST já foram estudados em outros modelos de lesão miotóxica. Saturnino-Oliveira et al. (2012) utilizaram US de 3MHz de forma pulsada e frequência de 0,3W/cm² na pata de camundongos lesadas com veneno de cobra. O tratamento com o anti-veneno mostrou-se mais eficaz quando combinado ao UST.

A regeneração do músculo esquelético consiste basicamente de duas fases: regeneração da miofibra e produção de tecido conjuntivo. Estes dois processos ocorrem simultaneamente e são eventos competitivos, visto que a produção excessiva de tecido conjuntivo é capaz de inibir completamente a regeneração muscular (Lehto et al., 1986).

Neste estudo constatou-se que a natação inicialmente reduziu o percentual de tecido conjuntivo na área lesada, favorecendo a regeneração muscular. Esta melhora inicial através da atividade física se deve aos efeitos fisiológicos do exercício. Sabemos que o estresse mecânico é um importante regulador de fenótipo celular, que influencia muitas funções celulares como orientação, replicação, produção de fatores de crescimento e síntese de colágeno (Bishop et al., 1993). Além disto, estudos apontam que exercícios terapêuticos induzem um crescimento mais rápido e intenso de capilares, estes desempenhando um importante papel na manutenção da oferta de oxigênio para o metabolismo adequado do tecido em regeneração (Jarvinen e Lehto, 1993).

Estes achados corroboram os de Faria et al. (2008), que mostraram uma redução no percentual de tecido conjuntivo em ratos submetidos ao treinamento de natação imediata. Contudo, a associação de ambas as modalidades terapêuticas não foi capaz de promover regeneração muscular. Pelo contrário, a combinação dos tratamentos aparentemente comprometeu a maturação das fibras musculares após 14 dias.

Markert et al. (2005), ao avaliarem os efeitos do ultrassom associado à atividade física, não observaram diferença na expressão fatores miogênicos que suportasse um papel eficaz dos recursos na regeneração muscular, nem isoladamente, nem quando associados.

Em uma revisão sistemática realizada por van der Windt et al. (1999), dos quatro estudos analisados pelos autores que visavam a associação da terapia por ultrassom à alguma modalidade de atividade física, nenhum mostrou resultados satisfatórios nesta associação.

Sabe-se que a atividade física intensa ou sobretreino pode aumentar a susceptibilidade a lesões e promover fadiga crônica. Isto ocorre, em parte, devido ao aumento na síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Cruzat et al., 2007). Estudos conduzidos nos últimos 15 anos indicam que as EROs (superóxido, radical hidroxila, óxido nítrico e radicais livres derivados do peróxido de hidrogênio) desempenham um importante papel na inflamação e alterações da função muscular (Rankin, 2004; Supinski e Callahan, 2007). A presença de EROs é essencial para proteger a célula contra agentes infecciosos. Entretanto, quando sua produção é excessiva, podem lesar biomoléculas e impedir o processo de regeneração do tecido lesionado (Kerkweg et al., 2007; Silveira et al., 2009).

Em estudo recente, Zhao e Yan (2011) hipotetizaram que, sob o efeito da cavitação causada pelo UST pulsado, a permeabilidade da membrana celular aumenta a população das EROs dentro das células, afetando diretamente a função das mesmas. Se a concentração destes fatores nas células atinge certo nível crítico, eles inibem a viabilidade das células do tecido e afetam a regeneração no local da lesão. Por outro lado, quando inflamação e a concentração neutrófilos (precursor das espécies reativas de oxigênio) diminuem, a aplicação do UST não aumenta o número de EROs dentro das células e seu efeito negativo é evitado.

Neste trabalho, a fim de prevenir o estresse oxidativo e não interferir negativamente no processo de regeneração, tomou-se o cuidado para que a atividade física à qual os animais foram submetidos não fosse intensa. Supõe-se que o aumento das EROs decorrente da própria lesão e da atividade física não é capaz de produzir efeitos negativos na regeneração muscular. Porém quando ocorre o aumento da permeabilidade da membrana celular em decorrência da aplicação do UST, o excesso destes compostos

químicos no interior das células causa efeitos deletérios às mesmas. Isto, aliado ao ambiente desfavorável devido ao envelhecimento, pode prejudicar a maturação das fibras musculares em regeneração.

Posto isto, pode-se indicar que a associação destes recursos terapêuticos não é favorável à regeneração muscular e recomenda-se a eleição de um recurso para cada fase da lesão. Sugere-se cautela ao fisioterapeuta ao escolher qual recurso utilizar diante à fase em que a lesão se apresenta.

Estudos complementares com o mesmo modelo experimental devem ser realizados para analisar outros parâmetros, como o número total de fibras musculares em regeneração e a quantificação de EROs, que podem ajudar na compreensão dos eventos discutidos e a elucidar as questões levantadas neste estudo.

6. CONCLUSÃO

Considerando-se as análises morfométricas realizadas, conclui-se que após 14 dias, as terapias propostas neste estudo mostraram-se eficazes na redução da área de inflamação, favorecendo a regeneração muscular. Entretanto, contradizendo a hipótese levantada, a combinação dos tratamentos propostos não se mostrou eficaz quanto à maturação das fibras musculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Behnke BJ, Prisby RD, Lesniewski LA, Donato AJ, Olin HM, Delp MD. Influence of ageing and physical activity on vascular morphology in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 2006; 575(2): 617-626.

Berna-Sena JD, Sanches-Garre J, Madrigal M, Zuazu I, Berna-Mestre JD. Ultrasound therapy in rectus sheath hematoma. *Phys. Ther.* 2005; 85: 352-57.

Bishop JE, Butt RP, Laurent GJ. The role of mechanical force in the regulation of fibroblasts function: implications for enhanced collagen deposition during pulmonary vascular remodelling. *Eur. Respir. Rev.* 1993; 3: 613-617.

Brack AS, Rando TA. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev.* 2007; 3(3): 226-37.

Brasil, 2008. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Projeção da população 1980-2050.

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/default.shtm. Acesso em 15/06/2013

Burdzińska A, Gala K, Pączek L. Myogenic stem cell. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008; 46(4): 401-412.

Burns A.S. and Lauder T.D. Deep water running: an effective non-weightbearing exercise for the maintenance of land-based running performance. *Mil Med.* 2001; 166: 253-258.

Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musarò A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev.* 2009; 10(1): 35-42.

Charge SB, Brack AS, Hughes SM. Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283(4): 1228-41.

Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004; 84: 209-38.

Cruzat VF, Rogero MM, Borges MC, Tirapegui J. Current aspects about oxidative stress, physical exercise and supplementation. *Rev Bras Med Esporte.* 2007; 13(5): 304-310.

Dalia RA, Guerino MR, Parizotto NA, Mello MAR, Luicano E. A influência do ultrassom e do treinamento físico sobre os triglicérides séricos e intramusculares em ratos diabéticos experimentais. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 2011; 17 (2): 123-126.

Degani, AM. Hidroterapia: os efeitos físicos, fisiológicos e terapêuticos da água. *Fisioter Mov.* 1998; 11(1): 91-106.

Degens H. The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting. *Scand J Med Sci Sports.* 2010; 20: 28-38.

Desaki J. Regeneration of muscle fibers in the extensor digitorum longus muscle of the aged rat. *J Electron Microsc.* 2008; 57(2): 59-66.

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

Faria FET, Ferrari RJ, Distefano G, Ducatti AC, Soares KF, Montebelo MIL, et al. The onset and duration of mobilization affect the regeneration in the rat muscle. *Histol Histopathol.* 2008; 23(5): 565-71.

Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. *Rev Fisioter Mov.* 2005; 18(2): 63-71.

Gayraud-Morel B, Chretien F, Tajbakhsh S. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regen Med.* 2009; 4: 293-319.

Gibson MC, Schultz E. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve.* 1983; 6: 574-80.

Gregory T.M., Heckmann R.A. and Francis R.S. The effect of exercise on the presence of leukocytes, erythrocytes and collagen fibers in skeletal muscle after contusion. *J. Manipulative Physiol Ther.* 1995; 18: 72-78.

Grounds MD, Davies M, Torrisi J, Shavlakadze T, White J, Hodgetts S. Silencing TNF α activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. *Cell Tissue Res.* 2005; 320(3): 509-15.

Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J.* 2004; 18: 676-82.

Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50: 589-610.

Jarvinen M, Lehto MYK. The effect of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries. *Sports Med.* 1993; 15: 78-89.

Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train.* 2002; 37: 293-299.

Kerkweg U, Petrat F, Korth HG, Groot H. Disruption of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NAD(P)H oxidase. *SHOCK* 2007; 27: 552–558.

Lacourt MX, Marini LL. Decréscimo da função muscular decorrente do envelhecimento e a influência na qualidade de vida do idoso: uma revisão de literatura. *Rev Bras Cien Env Hum.* 2006; 3: 114-21.

Lehto M., Jarvinen M. and Nelimarkka O. (1986). Scar formation after skeletal muscle injury. A histological and autoradiographical study in rats. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 1986; 104: 366-370.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function & plasticity: The physiological basis of rehabilitation. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2002. 448p.

Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005; 86: 1303-10.

Marques MJ, Machado RV, Minatel E, Santo Neto H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness: studies in mdx sternomastoid, diafragma and tibialis anterior. *Muscle Nerve.* 2008; 37(1): 61-7.

Marsh DR, Carson JA, Stewart LN, Booth FW. Activation of skeletal α -actin promoter during muscle regeneration. *J Musc Res Cell Mot.* 1998; 19: 897-907.

Menetrey J., Kasemkijwattana C., Fu F.H., Moreland M.S. and Huard J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. *Am. J. Sports Med.* 1999; 27: 222-229.

Pertille A, Macedo AB, Oliveira CP. Evaluation of muscle regeneration in aged animals after treatment with low-level laser therapy. *Rev Bras Fisioter.* 2012 Nov-Dec;16(6):495-501.

Pestana PRD, Alves AN, Fernandes KPF, Silva JA, França CM, , Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Swimming influence on the expression of myogenic regulatory factors during skeletal muscle repair of rats. *Rev Bras Med Esporte.* 2012; 18(6): 419-422.

Pestana PRD, Fernandes KPF, Vallio CS, Rocha DAM, Martins MD, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Swimming and morphology of skeletal muscle repair process after cryoinjury. *Fisioter Pesq.* 2011; 18(3): 264-269.

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; 48(5): 403-11.

Pinto MVM, Costa DA, Rocha LLV, Santos HR, Silva ALS, Barbosa LG, et al. Comparative Study of the Effects of the Ga-As (904 nm, 150mW) Laser and the Pulsed Ultrasound of 1 MHz in Inflammation of Tibialis Muscle of Wistar Rats. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2008; 51:225-30.

Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med.* 1999; 27(1): 54-9.

Renault V, Piron-Hamelin G, Forestier C, Didonna S, Decary S, Hentati F, et al. Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol.* 2000; 35(6): 711-9.

Saturnino-Oliveira J, Tomaz MA, Fonseca TF, Gaban GA, Monteiro-Machado M, Strauch MA, Cons BL, Calil-Elias S, Martinez AMB, Melo PA. Pulsed ultrasound therapy accelerates the recovery of skeletal muscle damage induced by *Bothrops jararacussu* venom. *Braz J Med Biol Res Online Provisional Version.* 2012.

Shefer G, Van De Mark DP, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z. Satellite cell pool size does matter: Defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol.* 2006; 294: 50-66.

Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006; 20: 1692-708.

Silva H, Conboy IM. Aging and stem cell renewal. [livro na internet]. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute; 2008 [acesso 2010 Jun 14]. Disponível em: <http://www.stembook.org>.

Silveira PCL, Victor EG, Schefer D, Silva LA, Streck, EL, Paula MM, Pinho RA. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound in med & biol.* 2009; 36(1): 44-50.

Supinski GS, Callahan LA. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J Appl Physiol* 2007; 102: 2056–2063.

Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: Regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* 2010; 120(1): 11-9.

van der Windt DAWM, van der Heijdenb GJMG, van den Bergc SGM, ter Rietd G, Wintera AF, Boutera LM. Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: a systematic review. *Pain.* 1999; 81: 257–71.

Vignaud A, Noirez P, Besse S, Rieu M, Barritault D, Ferry A. Recovery of slow skeletal muscle after injury in the senescent rat. *Exp Gerontol.* 2003; 38: 529–37.

Warden SJ. A new direction for ultrasound therapy in sports medicine. *Sports Med.* 2003; 33(2): 95-107.

Watson T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. *Ultrasonics.* 2008.

Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourc'h P, Yost MJ, et al. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys*. 2004; 4

Zhao X, Yan S. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) therapy may enhance the negative effects of oxygen radicals in the acute phase of fracture. *Medical Hypotheses*. 2011; 76: 283-285.

ANEXO



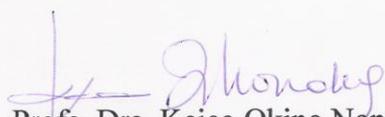
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propq@power.ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal
nº 011/2010

Protocolo nº. 012/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEEA/UFSCar **APROVOU** o projeto sob título "*Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento com ultrassom e laser de baixa intensidade*" elaborado pela pesquisadora Adriana Pertille

São Carlos, 13 de abril de 2010.


Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal