

Alterações hematológicas provocadas pelo ultra-som de 1MHz na forma contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos

Hematological changes produced by 1MHz continuous ultrasound, applied during the acute phase of iatrogenic muscle injury in rats

Plentz RDM^{1,2,3}, Stoffel PB¹, Kolling GJ⁴, Costa ST^{4,5}, Beck C⁴, Signori LU^{1,2}

Resumo

Contextualização: A literatura demonstra o efeito benéfico da terapia ultra-sônica de baixa intensidade sobre o processo de cicatrização de vários tecidos. **Objetivo:** Avaliar o efeito do ultra-som contínuo (USC) sobre a dinâmica hematológica do processo inflamatório agudo de lesão muscular iatrogênica. **Métodos:** Foram utilizados 16 ratos da raça Wistar (350 a 400g), divididos em grupo controle (GC=8) e grupo experimental (G1=8), submetidos à incisão cirúrgica na face lateral do membro posterior direito, onde o músculo bíceps femoral foi lesionado transversalmente. O USC (1MHz) foi aplicado sobre o local da lesão a uma intensidade de 0,4W/cm², durante três minutos, na 1^a, 8^a e 24^a hora após a lesão. Nestes períodos, foram realizadas as coletas de sangue por punção venosa do plexo retroorbital para as análises sanguíneas das séries brancas e vermelhas. **Resultados:** O USC diminuiu 8% dos eritrócitos na primeira coleta (9,9±0,1 *versus* 7,8±0,1; x10⁵/mm³, p<0,001); dobrou os neutrófilos segmentados na segunda coleta (3.166,8±161,4 *versus* 6.426,2±306,0; x10³/mm³ p=0,008) e os eosinófilos na terceira coleta (2.883,6±99,0 *versus* 4.714,4±275,2; x10³/mm³ p=0,011) em relação ao GC. Não se observaram diferenças entre os grupos no hematócrito, leucócitos totais, neutrófilos bastonetes, monócitos e linfócitos, nos três momentos estudados. **Conclusões:** A aplicação do USC no tratamento agudo de lesão muscular é contra-indicada nesta condição, pois promove a redução dos eritrócitos, aumento dos neutrófilos segmentados e dos eosinófilos, favorecendo a hemorragia e o aumento do processo inflamatório.

Palavras-chave: terapia por ultra-som; reabilitação; sistema musculoesquelético; ferimentos e lesões; inflamação; hematologia.

Abstract

Background: The literature shows the beneficial effects of low-intensity ultrasound therapy on the healing process of several biological tissues. **Objective:** To evaluate the effects of continuous ultrasound (CUS) on the hematological dynamics of an acute inflammatory process in iatrogenic muscle injuries. **Methods:** Sixteen Wistar rats (350 to 400g) were divided into a control group (CG=8) and an experimental group (G1=8). The rats were submitted to a surgical incision on the lateral aspect of the right hind limb, in which the biceps femoris muscle was transversally injured. The CUS (1MHz) was applied to the injury site at an intensity of 0.4W/cm², for three minutes, in 1, 8 and 24 hour after the injury. At these times, blood was drawn by venipuncture of the retroorbital plexus, for analysis of red and white blood cells. **Results:** The CUS reduced erythrocytes in 8% at the first blood collection (9.9±0.1 *versus* 7.8±0.1; x10⁵/mm³; p<0.001); it doubled the number of segmented neutrophils at the second collection (3,166.8±161.4 *versus* 6,426.2±306.0; x10³/mm³; p=0.008) and the eosinophils at the third collection (2,883.6±99.0 *versus* 4,714.4±275.2; x10³/mm³; p=0.011), in relation to the CG. No differences between the groups were seen with regard to hematocrit, total leukocytes, rod neutrophils, monocytes or lymphocytes at the three times studied. **Conclusions:** Application of CUS for acute treatment of muscle injuries is contraindicated under this condition, because it promotes reductions in erythrocytes and increases in segmented neutrophils and eosinophils, thus favoring hemorrhage and increasing inflammatory process.

Key words: ultrasound therapy; rehabilitation; musculoskeletal system; wounds and injuries; inflammation; hematology.

Recebido: 21/04/2008 – Revisado: 22/07/2008 – Aceito: 29/09/2008

¹ Departamento de Fisioterapia, Universidade de Cruz Alta (Unicruz) – Cruz Alta (RS), Brasil

² Instituto de Cardiologia, Fundação Universitária de Cardiologia – Porto Alegre (RS), Brasil

³ Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Porto Alegre (RS), Brasil

⁴ Departamento de Medicina Veterinária, Unicruz – Cruz Alta (RS), Brasil

⁵ Departamento de Zootecnia, Centro de Educação Superior do Norte (CESNORT) – Palmeira das Missões (RS), Brasil

Correspondência para: Luis Ulisses Signori, Curso de Fisioterapia, Unicruz, Avenida General Osório, 1.323, Centro, CEP 98005-150, Cruz Alta (RS), Brasil, e-mail: l.signori@hotmail.com

Introdução ::::

Lesões no tecido muscular são comuns na prática de atividades físicas e esportivas¹; elas acontecem devido a vários mecanismos, incluindo traumas diretos (lacerações, contusões e tensões) e causas indiretas (isquemia e disfunções neurológicas)^{2,3}. A terapia ultra-sônica é comumente recomendada para o tratamento das lesões musculares, porém as evidências científicas a respeito da sua efetividade ainda são controversas⁴⁻⁷.

Na Fisioterapia, é empregado o ultra-som (US) de baixa intensidade, o qual tradicionalmente varia em relação à frequência (1 a 3MHz), intensidade ou dose (0,1 a 3W/cm²), tempo de aplicação e modo ou forma da onda (contínua e pulsada)^{8,9}. Efeitos biofísicos do ultra-som são tradicionalmente separados em efeitos térmicos e mecânicos (não térmicos). Baker, Robertson e Duck⁸ sugerem ser inadequado assumir que os efeitos biofísicos térmicos correspondam à exposição à onda contínua, e os efeitos mecânicos à onda pulsada, pois estes efeitos ocorrem simultaneamente. Entretanto, os efeitos terapêuticos térmicos e/ou mecânicos são otimizados de acordo com a forma da onda⁸, bem como são dependentes dos demais parâmetros utilizados e da interação destes com os diferentes tecidos biológicos^{5,9,10}.

Os US têm a peculiaridade de interagir com o sistema circulatório, onde são observadas alterações na coagulação pela fibrinólise¹¹, trombólise¹², alteração da vasomotricidade pela liberação do óxido nítrico¹³ e estímulo angiogênico¹⁴. Entretanto, estas respostas têm sido descritas em situações específicas e controladas.

A regeneração e o reparo muscular ocorrem em quatro estágios inter-relacionados e tempo-dependente, cujas fases são: degeneração, inflamação, regeneração e fibrose¹. Imediatamente após a lesão do tecido musculoesquelético, o espaço entre as fibras musculares encontra-se com exsudatos, onde os fibroblastos e os macrófagos são ativados, produzindo sinais quimiotáticos adicionais (fator de crescimento, citocinas, e quimiocinas) para a circulação das células inflamatórias¹ e ativação das células satélites¹⁵. As miofibrilas lesadas sofrem necrose e autodigestão¹⁶, sendo que a rápida degeneração destas leva a ativação da inflamação e contribuem para renovação dos tecidos¹⁵. A inflamação é a fase mais importante no processo de regeneração muscular, em que as ações terapêuticas devem limitar a área envolvida pelo hematoma e a excessiva reação inflamatória¹⁷. O prejuízo funcional está associado à distribuição espacial e temporal das células inflamatórias, bem como ao tipo e à magnitude da resposta¹⁸.

O US de baixa intensidade (<1W/cm²) é comumente usado para acelerar o processo de regeneração tecidual após a lesão muscular¹⁹. Esta terapia tem sido sugerida por diminuir o

tamanho da área lesada, aumentar a deposição de colágeno e aumentar a resistência elástica do tecido²⁰; entretanto os mecanismos biológicos sobre seus efeitos ainda são pobremente entendidos¹⁹. Sabe-se que o local da lesão se torna uma fonte de sinais físico-químicos, modificando as concentrações hematólogicas dos diferentes tipos de células brancas (leucócitos) e de células vermelhas (eritrócitos)^{11,15}. Dados recentes do presente grupo de pesquisa sugerem que o US, na forma pulsada, em 24 horas após lesão muscular, promove a redução dos leucócitos totais, bem como nos neutrófilos (segmentados) e monócitos, sugerindo que o US pulsado promove a inibição da proliferação dos glóbulos brancos²¹, merecendo, desta forma, estudos mais aprofundados para compreender esta interação.

Estudos experimentais que avaliam o efeito do ultra-som contínuo (USC) na dinâmica hematológica, estimulada por lesão muscular aguda de origem iatrogênica, ainda não foram realizados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do USC na dinâmica hematológica dos diferentes tipos de células brancas (leucócitos) e vermelhas (eritrócitos) nesta condição.

Materiais e métodos ::::

Animais

A manipulação dos animais está de acordo com o guia para experimentos com animais, sendo este projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cruz Alta (Unicruz), sob o protocolo número 002/2008. Todos os animais foram mantidos por 12 horas em ciclo escuro-claro, com temperatura entre 20 a 24°C e umidade relativa do ar de aproximadamente 50%. A água e a comida eram *ad libitum* durante todo o protocolo experimental. O tempo de maturação dos animais foi de 29 semanas. Após a maturação, 16 ratos da raça Wistar (com peso entre, 350 a 400g) foram usados neste estudo. Os ratos foram randomizados em dois grupos: grupo controle (submetido ao protocolo de lesão e ao procedimento terapêutico, estando o equipamento de ultra-som desligado; CG=8) e grupo experimental tratado com USC (G1=8). Os grupos foram submetidos a uma incisão cirúrgica na face lateral do membro posterior direito de acordo com o protocolo de lesão.

Protocolo de lesão

Os animais foram anestesiados pela associação de xilazina (7mg/kg) e ketamina (70mg/kg) intraperitoneal. Foi realizada uma incisão cirúrgica longitudinal na pele do membro posterior esquerdo, para facilitar a divulsão do tecido subcutâneo e proporcionar fácil acesso a porção média do músculo bíceps-femoral, o qual teve suas fibras de seu ventre muscular

incididas transversalmente em aproximadamente 50% do seu volume. Posteriormente, a lesão cutânea foi fechada por sutura cirúrgica. Este músculo foi escolhido pelo seu fácil acesso nesses animais, e por não estar próximo a estruturas ósseas, o que indiretamente poderia interferir no estímulo terapêutico do US.

Tratamento ultra-sônico

Após a cirurgia, os ratos foram tratados com USC, sendo este aplicado diretamente sobre o local da lesão. O equipamento de ultra-som era AVATAR V (modelo 9075 Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda, Amparo, São Paulo, Brasil), que foi calibrado na fábrica antes do estudo, pelo método de força radiante, em que a energia ultra-sônica emanada do transdutor é aplicada sobre um cone imerso em água (alvo) e sua energia mecânica (ultra-som) é 'pesada', e então convertida em seu equivalente térmico (Watts). O tratamento ultra-sônico foi aplicado no modo contínuo, com uma frequência de 1MHz, intensidade de $0,4W/cm^2$, durante três minutos, cabeçote (nº TR3CCE02) de 3cm de diâmetro (área efetiva de radiação – ERA: $5cm^2$), sendo realizado movimentos circulares do cabeçote de 1/3 de seu respectivo raio sobre o local da lesão²². O procedimento foi realizado imediatamente após a cirurgia, na 8ª e 24ª hora após o protocolo de lesão. Os animais do GC foram manipulados da mesma maneira, mas com o aparelho desligado.

Preparação e medidas hematológicas

Foram colhidas amostras de sangue por meio da venopunção do plexo orbital direito, com o auxílio de um capilar de microhematócrito previamente heparinizado, e acondicionados em tubos de ependorff com anticoagulante²³. As coletas de amostras foram realizadas na 1ª, 8ª e 24ª hora após a lesão.

Para a determinação do número de leucócitos por mililitro (mL) de sangue, utilizou-se a câmara de Neubauer, utilizando a técnica da macrodiluição. Para tal, diluiu-se 20µL de sangue com 4mL do líquido de Türk e contou-se os leucócitos nos quatro quadrados grandes-angulares; multiplicou-se por 50, expressando os resultados em µL. Antes das contagens das células, a câmara de Neubauer permaneceu por cinco minutos dentro de uma placa de Petri invertida, contendo um chumaço de algodão úmido, permitindo assim a sedimentação das células. Para a observação da morfologia e contagem diferencial das células brancas, para as quais os avaliadores encontravam-se cegos frente ao protocolo experimental, fez-se um esfregaço de sangue em lâmina, que recebeu o corante de Romanowsky. Depois de lavada e secada à temperatura ambiente, examinou-se

a lâmina no microscópio óptico. Foram contadas 100 células seguindo a técnica de zig-zag de Shilling, sendo os valores expressos em $x10^3/mm^3$.

Para a determinação do número de hemácias por mL de sangue, utilizou-se a câmara de Neubauer, com a técnica da macrodiluição. O líquido de Marcano foi empregado como diluente para contagem dos eritrócitos, sendo utilizado 4mL do diluente para 20µL de sangue, contando-se os eritrócitos nos cinco quadrados médios do quadrado central e multiplicando-os por 10.000, e seus valores expressos em $x10^5/mm^3$. Na determinação do hematócrito, o tubo de microhematócrito foi preenchido com sangue em aproximadamente 3/4 de sua capacidade e vedado em uma das extremidades com auxílio do bico de Bunsen. Então, colocou-se o capilar em microcentrífuga por cinco minutos, a 3.000rpm, realizando-se a leitura no cartão específico.

Análise estatística

Os dados estão apresentados em forma de média e erro padrão. Para as comparações das alterações hematológicas entre os grupos, foi utilizada a análise de variância ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Bonferroni. A taxa de erro alfa menor que 5% ($p<0,05$) foi considerada estatisticamente significante.

Resultados

O hematócrito apresentou uma redução progressiva ($p<0,001$), sendo que para o G1 esta redução foi observada apenas na última coleta e, para o GC esta ocorreu na oitava e na 24ª hora. Não se observaram diferenças entre os grupos ($p=0,076$) e na interação dos mesmos ($p=0,077$), conforme Tabela 1.

Os eritrócitos apresentaram uma redução de aproximadamente 8% na primeira coleta de sangue para o G1 (USC *versus* controle; $p<0,001$). O GC apresentou redução em relação à primeira hora, na segunda e na terceira coleta de aproximadamente 27% ($p=0,011$), e, no G1, esta variável não se modificou ao longo do tempo (Tabela 1). A modificação na interação entre os grupos ($p<0,001$) representa a manutenção nas concentrações de células vermelhas no G1 e a redução no GC (Figura 1).

Os leucócitos totais não sofreram alterações para ambos os grupos durante o protocolo experimental (Tabela 1). O G1 aumentou as concentrações sanguíneas dos neutrófilos segmentados na oitava hora (USC *versus* controle; $p=0,008$) e manteve-se inalterado ao longo do tempo. Já o GC os valores se modificaram ao longo do tempo ($p=0,045$), sendo que na última coleta estes representaram aproximadamente à metade

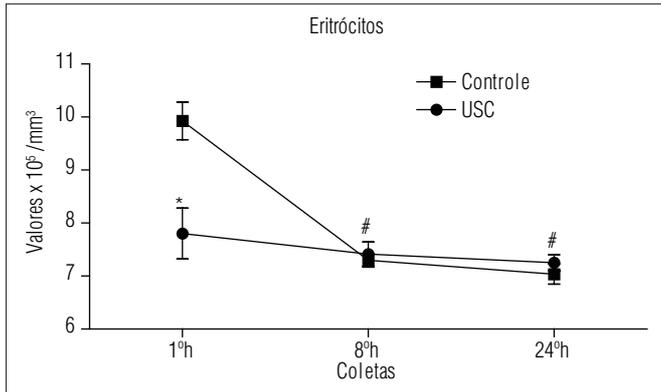


Figura 1. Comportamento dos eritrócitos durante protocolo experimental. Valores expressos em média e erro padrão ($\times 10^3/\text{mm}^3$). Para as comparações entre os grupos a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (grupo $p < 0,001$; tempo $p = 0,011$; interação $p < 0,001$), seguidas de *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0,05$ variação entre os grupos; # $p < 0,05$ variação no tempo *versus* 1ª hora; USC=ultra-som contínuo; controle=grupo submetido ao procedimento com equipamento de ultra-som (US) desligado.

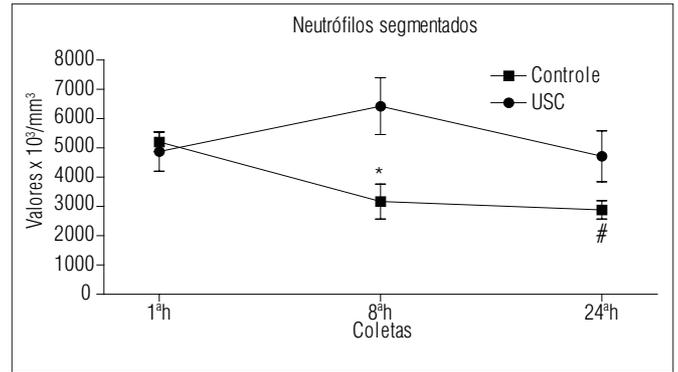


Figura 2. Comportamento dos neutrófilos segmentados durante protocolo experimental. Valores expressos em média e erro padrão ($\times 10^3/\text{mm}^3$). Para as comparações entre os grupos a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (grupo $p = 0,008$; tempo $p = 0,045$; interação $p = 0,157$) seguidas de *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0,05$ variação entre os grupos; # $p < 0,05$ variação no tempo *versus* 1ª hora; USC=ultra-som contínuo; controle=grupo submetido ao procedimento com equipamento de ultra-som (US) desligado.

Tabela 1. Variáveis hematológicas após a lesão muscular e aplicação do ultra-som contínuo.

Variáveis hematológicas	Unidade	Grupo n (8)	Coletas sanguíneas			ANOVA 2-vias valor p		
			1ª hora	8ª hora	24ª hora	Grupo	Tempo	Interação
Hematócrito	%	Controle	48,8±0,4	43,9±0,4#	37,5±0,3#†	0,076	<0,001	0,077
		USC	48,0±0,2	46,8±0,4	41,7±0,3#†			
Eritrócitos	$\times 10^5/\text{mm}^3$	Controle	9,9±0,1	7,3±0,04#	7,0±0,06#	<0,001	0,011	<0,001
		USC	7,8±0,1*	7,4±0,07	7,2±0,05			
Leucócitos totais	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Controle	9.075,5±137,4	8.642,1±161,4	8.133,1±185,1	0,425	0,602	0,638
		USC	9.840,0±487,9	8.837,4±330,3	9.690,9±337,0			
Neutrófilos segmentados	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Controle	5.204,5±105,3	3.166,8±161,4	2.883,6±99,0#	0,008	0,045	0,157
		USC	4.879,0±214,4	6.426,2±306,0*	4.714,4±275,2			
Neutrófilos bastonetes	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Controle	37,6±6,6	32,2±4,8	68,6±8,5	0,093	0,328	0,042
		USC	81,8±5,9	160,2±19,2	45,5±4,9			
Monócitos	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Controle	464,1±30,7	822,5±35,7	864,8±35,2	0,144	0,014	0,840
		USC	287,9±19,3	704,7±77,8	526,0±26,4			
Eosinófilos	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Controle	188,8±9,6	144,9±13,2	134,3±6,6	0,011	0,015	0,015
		USC	183,4±21,7	112,4±11,3	413,3±24,1*#†			
Linfócitos	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Controle	3.259,8±87,8	4.471,9±158,7	4.158,0±115,6	0,187	0,072	<0,001
		USC	4.409,5±259,4	1.673,7±50,0#	3.958,8±138,6†			

Os valores estão expressos em média±EP (erro padrão). USC=ultra-som contínuo; controle=grupo submetido ao procedimento sem o ultra-som (US) ligado; p=avaliação das comparações para ANOVA de duas vias, seguido de teste de *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ variação entre os grupos; # $p < 0,05$ variação no tempo *versus* 1ª hora; † $p < 0,05$ variação no tempo *versus* 8ª hora.

da primeira hora (Figura 2). Os neutrófilos jovens (bastonetes) e os monócitos ($p = 0,014$, não confirmados pelo teste de Bonferroni) não apresentaram alterações durante o protocolo experimental (Tabela 1).

Os eosinófilos no G1, na última coleta, aumentaram três vezes em relação ao GC (USC *versus* controle; $p = 0,011$); já em relação à primeira e a segunda coletas (tempo $p = 0,015$), esta aumentou respectivamente, 225 e 360% (Tabela 1). As alterações

na interação dos grupos ($p = 0,011$) demonstram que, enquanto os dados do GC se mantiveram constantes na última coleta, no G1 os valores aumentaram (Figura 3).

Os linfócitos não apresentaram diferenças entre os grupos e ao longo do protocolo experimental (tempo). Entretanto, a interação ($p < 0,001$) se modificou, sendo que na segunda coleta os valores para o G1 diminuíram em relação aos demais momentos (Tabela 1).

Discussão

O principal achado desse trabalho foi à demonstração, pela primeira vez na literatura, que o tratamento com USC, aplicado ao processo inflamatório agudo proveniente de lesão muscular iatrogênica, promove: a redução das células vermelhas (eritrócitos) na primeira hora; o aumento de porções das células brancas representadas pelos neutrófilos segmentados na oitava hora e pelos eosinófilos na 24^a hora.

O USC produziu uma maior redução dos eritrócitos na primeira hora após lesão muscular, possivelmente devido ao seu efeito térmico¹⁰, cujo estímulo provocaria uma hemorragia mais extensa. Sendo estas células as mais abundantes no sangue, esta hemorragia repercute na redução dos eritrócitos. A injúria do endotélio dispara uma seqüência de eventos, iniciando-se com a deposição das plaquetas, que leva a formação do trombo branco, que provisoriamente obstrui a lesão endotelial²⁴. Esse trombo é rapidamente infiltrado pela fibrina, onde os eritrócitos são capturados, formando o trombo vermelho, principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido²⁵, mecanismo que provavelmente estava presente neste estudo.

Outro aspecto a ser considerado é que os eritrócitos apresentaram uma redução ao longo do tempo apenas no GC (na 8^a e 24^a hora), o que pode ter sido induzido pelas sucessivas coletas sanguíneas; este fato reforça que a hemorragia induzida pelo USC representou a diferença na primeira hora. O hematócrito reduziu ao longo do tempo para ambos os grupos, reforçando a hipótese que as sucessivas coletas e a hemorragia se associam na redução dos eritrócitos.

Além dos efeitos térmicos outros mecanismos estão descritos na literatura pelos quais o USC pode ter favorecido a hemorragia, dentre estes: a liberação do óxido nítrico que induz a vasodilatação dependente do endotélio¹³, a fibrinólise¹¹ e a trombólise¹²; sugerindo-se que esses fenômenos também estão envolvidos nesta resposta.

Uma vez que os neutrófilos são as células mais abundantes da série branca no sangue, um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos^{26,27}. Na fase precoce após o dano no tecido musculoesquelético, leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) são as células mais abundantes no local da lesão¹, sendo que um dia após a lesão, eles constituirão 50% das células migradas a esse sítio²⁷. Este fenômeno pode explicar a redução dos neutrófilos segmentados no GC ao longo do experimento.

Após este extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da lesão para formar uma barreira contra a invasão de microorganismos e promover o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesados^{26,27}. O USC alterou esta resposta, sendo que na oitava

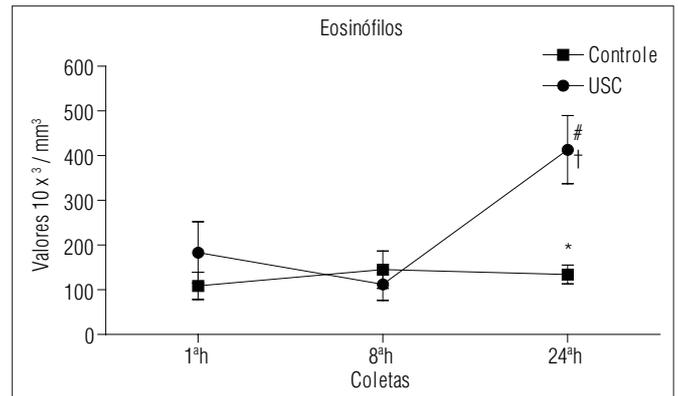


Figura 3. Comportamento dos eosinófilos durante o protocolo experimental. Valores expressos em média e erro padrão ($10^3/\text{mm}^3$). Para as comparações entre os grupos a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (grupo $p=0,011$; tempo $p=0,015$; interação $p=0,015$) seguidas de *post hoc* de Bonferroni; * $p<0,05$ variação entre os grupos; # $p<0,05$ variação no tempo *versus* 1^a hora; † $p<0,05$ variação no tempo *versus* 8^a hora; USC=ultra-som contínuo; controle=grupo submetido ao procedimento com equipamento de ultra-som (US) desligado.

hora, a concentração sistêmica dos neutrófilos segmentados foi maior que no GC.

O início da reação inflamatória é ampliado depois com as células satélites e com os tecidos necróticos das fibras musculares, os quais são potencializados pela liberação no local de citocinas (IL-6; IL-1 β) e fatores de crescimento celular (TNF- α ; FGF; IGF) que atuam na quimiotaxia, aumentando a resposta e o extravasamento das células inflamatórias¹, sendo este mecanismo otimizado pelo efeito térmico do USC. Outro aspecto a ser considerado é que não foi observada a redução dos neutrófilos segmentados em relação à primeira hora no grupo experimental. Este aumento nas concentrações na oitava hora e o retardo na redução sistêmica na 24^a hora dos neutrófilos segmentados sugere uma resposta sistêmica pró-inflamatória desta terapia.

Os leucócitos polimorfonucleares (ou neutrófilos) vão sendo substituídos progressivamente pelos monócitos¹, sendo que estes são muito abundantes no local da lesão entre o segundo e o quinto dia²⁸, devendo as suas concentrações sanguíneas serem alteradas antes deste período. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que não houve alterações nas concentrações sistêmicas destas células durante o protocolo experimental, entretanto o tempo de 24 horas pode não ter sido suficiente para alterar esta variável.

De acordo com os princípios básicos de inflamação, os monócitos são transformados em macrófagos, que, então, se empenham ativamente na proteólise e fagocitose do material necrótico pela liberação de enzimas lisossômicas²⁹. Fagocitose de macrófago é um processo notavelmente específico para o material necrótico, como os cilindros preservados das

lâminas basais que cercam a região de necrose das miofibrilas lesadas sobreviventes ao ataque dos macrófagos, servindo de andaimes dentro dos quais as células satélite viáveis começam a formação de novas miofibrilas¹.

Os monócitos, além de auxiliar os neutrófilos na eliminação de microorganismos pela fagocitose, também apresentam seus peptídeos pelo complexo maior de histo-compatibilidade às células T auxiliares. Desta forma, a fagocitose destas células atua como elo entre o sistema imune inato e o adaptativo²⁸. Entretanto, os linfócitos, ao final da fase de reparação, constituem o subsistema mais abundante²⁷; eles são atraídos para a região da lesão em igual número que os monócitos e, a partir do 14º dia, são os leucócitos que predominam na região³⁰. As alterações na interação dos linfócitos para o G1 representam oscilações naturais na contagem destas células em avaliações repetidas, pois estas não são acompanhadas de diferenças entre os grupos ou diferenças no tempo.

Pela ação de mediadores inflamatórios, os capilares dos vasos não-lesados se dilatam, deixando mais lenta a circulação sanguínea, permitindo, assim, a marginação dos leucócitos e sua ligação às moléculas de adesão expressas nas células endoteliais. Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento³¹. Os resultados da presente pesquisa sugerem que após 24 horas de lesão muscular tratada com USC, os eosinófilos aumentaram em aproximadamente três vezes a sua concentração celular, entretanto estes valores ainda se encontram dentro de parâmetros fisiológicos.

Os resultados desse trabalho na aplicação do USC diferem do estudo com ultra-som na forma pulsado²¹, o qual sugere que esta forma de aplicação leva a diminuição das séries brancas (leucócitos totais, neutrófilos segmentados e monócitos). De forma que nesse estudo houve um aumento das séries brancas e uma diminuição das séries vermelhas sanguíneas. Uma

combinação de fatores, inclusive o tipo de tecido examinado, modelo de dano, e modo de aplicação (contínuo ou pulsado), intensidade, e frequência de tratamento de US, podem explicar resultados diferentes de outros estudos^{21,32}.

As limitações da pesquisa residem na ausência de análises histológicas e histoquímica tecidual, as quais permitiriam relacionar os dados hematológicos sistêmicos com os teciduais, bem como quantificar a área da lesão através de ultrasonografia.

Conclusões

O presente estudo experimental demonstra que o uso do USC (na 1ª, 8ª e 24ª hora, com aplicações de três minutos de duração, a uma intensidade de 0,4W/cm²) na fase aguda de lesão muscular iatrogênica, promove alterações na dinâmica hematológica. Estas alterações se caracterizam pela redução dos eritrócitos, aumento dos neutrófilos segmentados e dos eosinófilos. Estas modificações sugerem o aumento da hemorragia e da amplificação da resposta inflamatória muscular, reforçando a contra-indicação da aplicação do USC na lesão muscular aguda.

Agradecimentos

Ao aluno Adão Saurin do curso de Fisioterapia e Danielli Maria Donadel aluna do Curso de Medicina Veterinária, que colaboraram nas coletas dados; à técnica de laboratório Jéssica Arsand do curso de Medicina Veterinária, que ajudou no processamento das análises hematológicas e aos funcionários do Biotério da Unicruz, Roberto Machado Moraes e Giovane Lopes Seccon.

Referências bibliográficas

- Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33(5):745-64.
- Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. *Biomechanics, physiology, and histology.* *Am J Sports Med.* 1994;22(5):702-10.
- Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A(5):822-32.
- Harris GR, Susman JL. Managing musculoskeletal complaints with rehabilitation therapy: summary of the Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on musculoskeletal rehabilitation interventions. *J Fam Pract.* 2002;51(12):1042-6.
- 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.
- Warden SJ. A new direction for ultrasound therapy in sports medicine. *Sports Med.* 2003;33(2):95-107.
- Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med.* 2004;25(1):73-7.
- Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther.* 2001;81(7):1351-8.

9. O'Brien WD Jr. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93(1-3):212-55.
10. Johns LD. Nonthermal Effects of Therapeutic Ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis. *J Athl Train.* 2002;37(3):293-9.
11. Kashyap A, Blinc A, Marder VJ, Penney DP, Francis CW. Acceleration of fibrinolysis by ultrasound in a rabbit ear model of small vessel injury. *Thromb Res.* 1994;76(5):475-85.
12. Riggs PN, Francis CW, Bartos SR, Penney DP. Ultrasound enhancement of rabbit femoral artery thrombolysis. *Cardiovasc Surg.* 1997;5(2):201-7.
13. Sugita Y, Mizuno S, Nakayama N, Iwaki T, Murakami E, Wang Z et al. Nitric oxide generation directly responds to ultrasound exposure. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34(3):487-93.
14. Barzelai S, Sharabani-Yosef O, Holbova R, Castel D, Walden R, Engelberg S et al. Low-intensity ultrasound induces angiogenesis in rat hind-limb ischemia. *Ultrasound Med Biol.* 2006;32(1):139-45.
15. Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve.* 1999;22(6):724-32.
16. Lille ST, Lefler SR, Mowlavi A, Suchy H, Boyle EM Jr, Farr AL et al. Inhibition of the initial wave of NF-kappaB activity in rat muscle reduces ischemia/reperfusion injury. *Muscle Nerve.* 2001;24(4):534-41.
17. Worrell TW. Factors associated with hamstring injuries. An approach to treatment and preventative measures. *Sports Med.* 1994;17(5):338-45.
18. Douglas MR, Morrison KE, Salmon M, Buckley CD. Why does inflammation persist: a dominant role for the stromal microenvironment? *Expert Rev Mol Med.* 2002;4(25):1-18.
19. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(12):1701-6.
20. Byl NN, McKenzie A, Wong T, West J, Hunt TK. Incisional wound healing: a controlled study of low and high dose ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1993;18(5):619-28.
21. Costa ST, Lauxen J, Sturzenegger TM, Signori LU, Plentz RDM. Efeito anti-inflamatório do ultra som de 1 MHz na dinâmica Hematológica. *Rev Bras Fisioter.* 2006;10(Supl 1):60-1.
22. Chang CJ, Hsu SH, Lin FT, Chang H, Chang CS. Low-intensity-ultrasound-accelerated nerve regeneration using cell-seeded poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) conduits: an in vivo and in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;75(1):99-107.
23. Chen J, Yang WL, Li G, Qian J, Xue JL, Fu SK et al. Transfection of mEpo gene to intestinal epithelium in vivo mediated by oral delivery of chitosan-DNA nanoparticles. *World J Gastroenterol.* 2004;10(1):112-6
24. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med.* 1995;332(23):1553-9.
25. Davies MJ. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation.* 1990;82(3 Suppl):II38-46.
26. Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol.* 1997;139(5):1349-60.
27. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bröcker EB, Gillitzer R. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol.* 1998;153(6):1849-60.
28. DiPietro LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock.* 1995;4(4):233-40.
29. Farges MC, Balcerzak D, Fisher BD, Attaix D, Béchet D, Ferrara M et al. Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(2):E326-35.
30. Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(8):2890-4.
31. Wong DT, Donoff RB, Yang J, Song BZ, Matossian K, Nagura N et al. Sequential expression of transforming growth factors alpha and beta 1 by eosinophils during cutaneous wound healing in the hamster. *Am J Pathol.* 1993;143(1):130-42.
32. Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 2002;83(1):1-4.