



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

TERAPÊUTICAS NO TRATAMENTO DA LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA

AGUDA: ULTRASSOM E FONOFORESE

Jaqueline de Souza

Porto Alegre, julho 2013



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**TERAPÊUTICAS NO TRATAMENTO DA LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA
AGUDA: ULTRASSOM E FONOFORESE**

Jaqueline de Souza

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmem Juracy Silveira Gottfried

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, julho 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Jaqueline de
Terapêuticas no Tratamento da Lesão Muscular
Esquelética Aguda: Ultrassom e Fonoforese. /
Jaqueline de Souza. -- 2013.
130 f.

Orientador: Carmem Gottfried.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Lesão muscular esquelética. 2. Contusão
muscular. 3. Ultrassom. 4. Fonoforese. I. Gottfried,
Carmem, orient. II. Título.

Dedicatória

À minha Isi, com muito amor!

Agradecimentos

Meus agradecimentos especiais aos meus pais, por todo amor, carinho e apoio. Em vocês eu me espelho para seguir crescendo e evoluindo. O meu maior orgulho é ser filha de vocês! Aos meus irmãos e minha tia Marlene, por todo apoio.

Segundo Dom Quixote, “... quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha juntos é o começo da realidade.” Prof^a Carmem, você foi o meu começo da realidade, acreditando no meu sonho e permitindo que ele se concretizasse. Muito obrigada pela oportunidade, ensinamentos e amizade nesta caminhada. Minha eterna gratidão e carinho à você!

A todos os professores colaboradores que contribuíram diretamente para o desenvolvimento do meu trabalho: Helder, Nádia, Mayorga, José Cláudio e, em especial, ao prof^o Carlos Alberto, que manteve sempre as portas abertas em seu laboratório, permitindo assim que eu aprendesse muito do que hoje eu sei. Aos professores membros da banca, obrigada pela disponibilidade em avaliar o nosso trabalho.

Meus agradecimentos ao Rodrigo, que com paciência nos ajudou no estudo e na construção da prensa lesionadora. Ao Sr. Valmor e a Cooperativa de Suinocultores do Vale do Caí, pelas doações das orelhas de porco.

A todos os meus colegas do lab 27 e, em especial a Roberta e Gean. Obrigada pelo apoio, carinho, auxílios e, principalmente, pela amizade! Aos colegas do lab 33, meu agradecimento pela acolhida, ensinamentos e paciência!

Minha eterna gratidão aquelas colegas que junto comigo sonharam e realizaram este estudo: Núbia – minha amiga expert em HE, Caren – minha “irmã gêmea” e amiga de todas as horas (inclusive finais de semana), Alianise – obrigada por me apresentar e guiar no mundo

da “farmácia”, Caroline – pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e carinho. Aos colegas que na reta final foram fundamentais para a concretização do trabalho: “Bob” – obrigada pelos auxílios e compreensão, admiro muito o teu trabalho; Adriana - agradeço pela sinceridade, disponibilidade e ensinamentos; Ana Carolina – sou muito grata pelos auxílios, paciência e conhecimento transmitido.

A todos os meus colegas de trabalho no curso de Fisioterapia da Unipampa, por compreenderem a minha ausência e colaborarem com meus “ajustes de horários”, permitindo que eu seguisse trabalhando e estudando. Às pessoas de Frack e Giulia, pela amizade, carinho e parceria. Aos meus alunos, pela colaboração, em especial aos horários de aulas aos sábados.

Agradecimentos muito especiais a toda a equipe de “assessoria externa uruguaianaense”: Jussara – minha grande amiga, conselheira e modelo de mulher; Fabi – minha grande e doce amiga; e Valdecir – meu grande amigo. Obrigada pela força, “quebra galhos” e momentos de lazer.

A minha “assessoria externa portoalegrense”: Aline Pagnussat – querida amiga, meu exemplo de pesquisadora e mulher, obrigada pela acolhida em sua casa, em muitas e muitas viagens; Dani R. – amiga de infância e meu apoio em todas as horas; meninas do pensionato São Benedito: Francyne, Ana Paula, Caroline e Ingrid – vocês foram meus anjos da guarda na reta final, a vocês minha amizade e todo meu carinho.

E por fim, a UFRGS e ao PPGBioq, local em que concretizei mais um sonho!

A todos vocês, minha imensa gratidão.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1 INTRODUÇÃO	6
1.1 LESÃO MUSCULAR	6
1.2 TIPOS DE LESÕES MUSCULARES	9
1.3 TRATAMENTO DO TECIDO MUSCULAR ATRAVÉS DO ULTRASSOM E FONOFORESE	11
1.3.1 Ultrassom terapêutico.....	11
1.3.1.1 Efeitos do Ultrassom	13
1.3.2 Fonoforese.....	16
1.3.2.1 Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs) e Fonoforese na Regeneração Muscular	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
PARTE II	23
CAPÍTULO I	24
CAPÍTULO II	56
CAPÍTULO III	65
PARTE III	84
3 DISCUSSÃO	85
3.1 FONOFORESE: DICLOFENACO DE SÓDIO OU CETOPROFENO?	87
3.2 EFEITOS DO ULTRASSOM E DA FONOFORESE APÓS CONTUSÃO MUSCULAR EM MODELO ANIMAL	92
3.2.1 Efeito do ultrassom e fonoforese sobre medidas de estresse oxidativo após a contusão muscular	94
3.2.2 Efeito da lesão e tratamentos sobre a inflamação muscular	97

3.2.3 Considerações gerais sobre o tratamento com Ultrassom e Fonoforese.....	100
CONCLUSÕES	102
4 PERSPECTIVAS.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
ANEXO I.....	119
APÊNDICE I	121

PARTE I

RESUMO

As lesões musculares apresentam altas incidência e são responsáveis pela maioria das limitações funcionais em trabalhadores e desportistas. O tratamento destas lesões é estabelecido conforme a sua gravidade, podendo variar entre medidas simples como aplicação de gelo, uso de medicamentos, fisioterapia e medidas mais complexas como a abordagem cirúrgica. Entre as modalidades terapêuticas da fisioterapia, o ultrassom (US) é muito utilizado e vêm sendo associado a aplicação de medicamentos de uso tópico, procedimento conhecido como fonoforese. A literatura vêm apresentando divergências em relação à efetividade da fonoforese, mecanismos de funcionamento e aplicações. Neste estudo buscou-se avaliar o efeito do US e fonoforese sobre o processo inflamatório agudo de lesões musculares. Inicialmente foram analisados os principais modelos de replicação de lesão muscular em animais. A contusão muscular mostrou-se prevalente e com maiores semelhanças com o trauma de humanos. Paralelamente, o US foi testado com dois anti-inflamatórios tópicos comerciais (diclofenaco de sódio e cetoprofeno) em experimento *in vitro* de permeação sobre a pele. Os parâmetros de quantidade e fluxo permeado mostraram melhores resultados quando na combinação com o cetoprofeno, aplicado duas vezes. Para analisar o efeito do US e da fonoforese (cetoprofeno) sobre a inflamação muscular, foi desenvolvido um estudo *in vivo* e analisado parâmetros de estresse oxidativo e marcadores de inflamação celular e tecidual. Os resultados de dano oxidativo (dano a lipídios e proteínas) e atividade antioxidante enzimática não mostraram diferenças entre os grupos após 72 h da lesão. Os resultados de defesa antioxidante não enzimática sugerem que o ultrassom possa ter efeito positivo em relação aos demais tratamentos. As medidas da enzima ciclooxigenase 2 e da citocina TNF α não foram alteradas nos grupos avaliados e, na análise morfométrica do músculo, o anti-inflamatório tópico sugere efeitos positivo. Com os parâmetros utilizados neste estudo, o US e a fonoforese não foram capazes de influenciar o processo inflamatório ou o estado redox da célula, sugerindo que a inflamação transcorreu espontaneamente.

ABSTRACT

The muscle injuries present high incidence and are responsible for most of the functional limitations in workers and athletes. The treatment of these lesions is established accordingly to their severity, ranging between simple measures as ice application, medication use, physiotherapy and a more complex intervention such as surgery. Among all therapeutic modalities in physiotherapy the ultrasound (US) is widely used and has been associated with application of topical drugs, a procedure known as phonophoresis. The literature has shown discrepancies in the effectiveness of phonophoresis, functioning mechanisms and applications. This study evaluated the effect of US and phonophoresis on the acute inflammatory process of muscle injuries. Initially were analyzed the main models for replication of muscle injuries in animals. The muscle contusion showed prevalent and with major similarities with the human trauma. At the same time, the US was tested with two commercial topic anti-inflammatory (diclofenac sodium and ketoprofen) in an in vitro experiment of skin permeation. The parameters of quantity and permeate flux showed better results when in combination with ketoprofen, applied twice. To examine the effect of US and phonophoresis (ketoprofen) on muscle inflammation, it was developed an in vivo study analyzing parameters of oxidative stress and inflammation markers in cell and tissue. The results of oxidative damage (lipids and proteins) and antioxidant enzyme activity showed no differences between the groups after 72 hours of lesion. The results of non-enzymatic antioxidant defense suggest that US may take positive effect compared to other treatments. The cyclooxygenase 2 measures and TNF α were not changed in evaluated groups, and the morphometric analysis of muscle indicate positive effects of topic antiinflammatory. With the parameters used in this work, the US and phonophoresis were not able to influence the inflammatory process or the redox state of cell, suggesting that inflammation progressed spontaneously.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABAP = do inglês *2,20-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride*

AINEs = Anti-inflamatórios não esteroidais

AUC = do inglês *Area under the curve*

CAT = Catalase

CK = Creatina quinase

DCF = Medida de diclorofluoresceína

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNPH = do inglês *Dinitrophenylhydrazine*

ELISA = do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERA = do inglês *Effective radiating area* (Área de radiação efetiva)

EROS = Espécies reativas de oxigênio

IL = Interleucina

I_{SATA} = Quantidade de energia através da unidade de área na unidade de tempo

KPB = do inglês *Potassium phosphate*

Log P = Coeficiente de partição

MDA = Malondialdeído

NF = do inglês *Number muscle of fibers* (Número de fibras musculares)

RICE = Repouso, gelo, compressão e elevação

SC = Estrato córnea

SOD = Superoxido dismutase

TAF = do inglês *Total area occupied by muscle fiber* (area total de fibras)

TAR = do inglês *Total antioxidant reactivity* (Reatividade antioxidante total)

TBARS = do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances* (Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico)

TCA = do inglês *Trichloroacetic acid*

TRAP = do inglês *Total reactive antioxidant potential* (Potencial antioxidante reativo total)

TNF- α = Fator de necrose tumoral

US = Ultrassom

1 Introdução

O tecido muscular esquelético humano, representando em torno de 50% da massa corporal (Grefte et al., 2007). A musculatura está constantemente exposta à lesões e, em especial nos esportes, as lesões musculares apresentam uma frequência que varia entre 10 a 55% de todas as lesões, alcançando por exemplo, cerca de um terço dos afastamentos no futebol (Best and Hunter, 2000, Huard et al., 2002, Rodas et al., 2009, Ekstrand et al., 2011). As opções de tratamento para as lesões musculares variam de medidas simples como repouso, gelo local, aplicação de compressão e elevação do membro, até a necessidade do uso de medicamentos, fisioterapia e, em circunstâncias mais agravantes, a abordagem cirúrgica (Mehallo et al., 2006, Jarvinen et al., 2007, Feucht and Patel, 2010, Baoge et al., 2012). O objetivo para o tratamento destas lesões é alcançar a recuperação muscular por meio da formação de um tecido cicatricial disfuncional mínimo, evitando assim a predisposição a novas lesões e capacitando o sujeito ao retorno das suas atividades o mais breve possível (Grefte et al., 2007).

A presente Tese possui como tema de estudo a lesão muscular esquelética aguda e os tratamentos clássicos utilizados como recursos fisioterapêuticos: ultrassom e fonoforese.

1.1 Lesão Muscular

O tecido muscular esquelético é constituído por células com moderada capacidade de regeneração e algumas características morfológicas específicas, tais como: presença de vários núcleos, formato alongado e grande conteúdo de filamentos intermediários responsáveis sua função contrátil (Bassel-Duby and Olson, 2006). Estas células estão envoltas por um tecido conectivo, dividido em camadas: endomísio (mais interna envolvendo cada miofibrila), perimísio (envolvendo centenas de fibras – fascículos musculares) e epimísio (mais externa), que além de unirem as células musculares, apresentam íntima relação na função coordenada de geração e

transferência de força ao tendão (Kaariainen et al., 2000). O tecido muscular também conta em sua estrutura com células nervosas, adiposas e vasculares (Gharaibeh et al., 2012).

Segundo a literatura, o processo de lesão e o mecanismo de reparo muscular é semelhante em muitos tipos de lesões, seguindo a descrição de um processo inflamatório típico (Huard et al., 2002, Sato et al., 2003, Filippin et al., 2009, Quintero et al., 2009). A inflamação muscular ocorre em três fases: destruição, reparo e remodelamento do tecido (Jarvinen et al., 2000, Jarvinen et al., 2007). Após a lesão, o tecido muscular apresentar hematoma local decorrente ao dano vascular e rompimento de miofibrilas e do sarcolema (membrana plasmática muscular) (Minamoto et al., 1999, Smith et al., 2008). A ruptura da membrana plasmática provoca um influxo de cálcio extracelular, que induz a uma proteólise dependente de cálcio no tecido (Alderton and Steinhardt, 2000, Grefte et al., 2007). Paralelamente, o extravasamento sanguíneo permite a liberação de citocinas e leucócitos para o local da lesão, sendo os neutrófilos os primeiros a chegar e a sustentar o processo inflamatório nas primeiras 24 h (St Pierre and Tidball, 1994, Brunelli and Rovere-Querini, 2008).

A ação neutrofílica tem por objetivo remover as células lesadas e atrair outras células de defesa. O principal mecanismo para remoção das células lesadas é dependente de superóxido ($O_2^{\bullet -}$, poderoso agente oxidante) e por meio da liberação da enzima mieloperoxidase pelos neutrófilos no local da lesão (Nguyen et al., 2005, Rigamonti et al., 2013). Os neutrófilos atraem outras células através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como, interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (Butterfield et al., 2006), que por sua vez, também contribuem para vias de ativação da NADPH oxidase, enzima envolvida na produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Shatwell and Segal, 1996, Butterfield et al., 2006).

O processo inflamatório conta com a produção de EROS e espécies reativas de nitrogênio para promover a destruição do tecido necrosado no local da lesão. Todavia, quando ocorre um

desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e de antioxidantes, estabelece-se o processo de estresse oxidativo, que acarreta dano tecidual, especialmente em estruturas proteicas, lipídicas e DNA (Butterfield et al., 2006, Filippin et al., 2011). Diante de estresse oxidativo as espécies reativas podem promover a exacerbação do processo inflamatório, causando dano ao tecido muscular saudável (Brickson et al., 2001, Butterfield et al., 2006, Toumi et al., 2006).

Os macrófagos trabalham orquestradamente com os neutrófilos na remoção dos debris celulares via fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, entretanto, estas células também estão envolvidos na indução da regeneração muscular e ativação das células satélites, precursoras miogênicas (Belcastro et al., 1998, Dumont and Frenette, 2013, Rigamonti et al., 2013). As células satélites residem na lâmina basal e são ativadas mediante lesão ao tecido (Ehrhardt and Morgan, 2005). Estas células ativadas proliferam-se, migram para o local da lesão, expressando fatores miogênicos regulatórios e de crescimento, citocinas e, por último, diferenciam-se para substituir as fibras musculares danificadas (Ehrhardt and Morgan, 2005, Grefte et al., 2007).

O tempo estimado para a recuperação do tecido muscular varia de acordo com a extensão e o tipo de lesão muscular, entretanto, a literatura referencia o término do processo de degeneração e inflamação entre 7 e 10 dias (Jarvinen et al., 2005) e, a conclusão da regeneração/remodelamento do tecido em torno de 28 dias (Kaariainen et al., 2000, Smith et al., 2008, Gharaibeh et al., 2012). O tempo final e a adequada regeneração muscular (formação de um tecido muscular funcional, semelhante ao anterior) estando intrinsecamente relacionados aos eventos que ocorrem nas primeiras fases da inflamação, período da fase aguda da lesão muscular (Lefaucheur and Sebillé, 1995).

1.2 Tipos de Lesões Musculares

A lesão em tecido muscular é considerada comum entre as afecções do sistema musculoesquelético e, os traumas de origem mecânica são as mais frequentes (Almekinders, 1999, Mehallo et al., 2006, Jarvinen et al., 2007). Estas lesões podem ser classificadas como diretas e indiretas, conforme a sua causa. As lesões diretas são decorrentes de um contato lesivo com objeto ou pessoa, como a contusão muscular e a laceração, enquanto as indiretas não são acompanhadas de contato, como é o caso das distensões musculares (Jarvinen et al., 2005, Rodas et al., 2009).

A contusão muscular ocorre quando o tecido é exposto a uma rápida e forte força compressiva (Jarvinen et al., 2007), sendo muito comum em humanos, especialmente nas atividades de esportes coletivos de contato e, onde traumas repetitivos são frequentes (Minamoto et al., 1999, Smith et al., 2008). Os sinais e sintomas da contusão são variados, como dor tardia, dor ao movimento, amplitude de movimento limitada, redução da força muscular, hematoma, entre outros (Jarvinen et al., 2005).

A distensão muscular ocorre quando o tecido está sujeito a um força tênsil excessiva (Jarvinen et al., 2000, Jarvinen et al., 2007). O mecanismo mais comum de lesão envolve a distensão do músculo quando em contração do tipo excêntrica, ou seja, quando a musculatura está contraindo enquanto forças tensoras contrárias estão sendo aplicadas simultaneamente no tecido, tornando o músculo mais suscetível ao dano (Beltran et al., 2011). As distensões podem ser incompletas, quando fibras musculares e unidade musculotendínea são parcialmente rompidos; ou completas, com um rompimento mais agravante e incapacitante (Ali and Leland, 2012). A gravidade da distensão é classificada segundo seus sinais e sintomas clínico: grau I (suave) – poucas fibras musculares são rompidas, perda mínima da integridade musculotendínea, queixas menores, pequena perda de força e movimento; grau II (moderada) – maior dano muscular e queixa de dor, rompimento parcial da unidade musculotendínea e significativo

prejuízo de força; grau III (grave) – grande lesão muscular e rompimento da unidade musculotendínea, resultando em perda total da função (Jarvinen et al., 2000, Barr, 2007, Heiderscheit et al., 2010, Ali and Leland, 2012).

A laceração muscular ocorre quando o tecido é exposto a uma força de esmagamento ou ruptura por objetos cortantes, acarretando rompimento e até perdas de volume do tecido (Menetrey et al., 1999, Turner et al., 2012). O rompimento e a destruição tecidual na laceração promove extenso hematoma, perda da função e a inervação muscular comumente é mais afetada, o que compromete a regeneração tecidual (Menetrey et al., 1999, Kragh et al., 2005).

Várias pesquisas utilizam modelos de lesão muscular em animais para conhecer e descrever os eventos celulares e moleculares da regeneração (Li and Huard, 2002, Li et al., 2004, Bassel-Duby and Olson, 2006, Li et al., 2013). A lesão muscular humana possui grandes semelhanças com a dos animais utilizados em laboratório, entretanto, no homem o desenvolvimento das fases da inflamação é mais fragmentada/desconexa e lenta (Kaariainen et al., 2000).

Atualmente, existem muitos modelos de lesão em animais utilizados para replicar àquelas observadas em humanos, como por exemplo: uso de cardiotoxinas (Chen et al., 2005, Mathes and Lafyatis, 2011), lesão por gelo/congelamento (Urso et al., 2010), contração máxima/exercício (Leal Junior et al., 2010), impacto de carga (Filippin et al., 2011, Shu et al., 2012) e incisão tecidual (Grefte et al., 2010). Esses modelos são utilizados indistintamente para avaliação do processo de regeneração muscular, e para testar modalidades de tratamento facilitadores da regeneração. Estudos comparando o processo regenerativo muscular tem mostrado diferenças entre os modelos de lesão (Lefaucheur and Sebille, 1995, Warren et al., 2007). Warren et al (2007) compararam a regeneração muscular em dois modelos distintos de lesão em animais (congelamento e contração) e observaram reparo tecidual semelhante, porém com extensão variada e expressão gênica diferenciada: o trauma por exercício apresentou

ativação de genes relacionados com a apoptose e, o trauma por congelamento ativou genes relacionado com o desenvolvimento de uma extensa resposta inflamatória. Assim, possíveis diferenças entre os modelos de lesão muscular em animais, poderão influenciar nas respostas regenerativas e, possivelmente, nas respostas aos tratamentos propostos.

Como as lesões musculares humanas de origem mecânica apresentam sinais e sintomas parecidos, os tratamentos clínicos baseiam-se na gravidade clínica, independente da natureza da lesão muscular (Jarvinen et al., 2005). Entre as modalidades de tratamento utilizadas na recuperação da lesão, as mais frequentes são: RICE (repouso, gelo, compressão e elevação), medicamentos (em especial analgésicos e anti-inflamatórios) e a fisioterapia (Rodas et al., 2009).

Estudos sobre o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) no tratamento das lesões musculares é vasto e conflitante. Pesquisas em animais têm mostrado que o uso prolongado deste medicamento pode atrasar a recuperação muscular ou mesmo favorecer a fibrose (Shen et al., 2005, Urso, 2013). Entretanto, o uso de AINEs na fase aguda, nas primeiras 72 h após o trauma muscular, ainda têm sido indicado na prática clínica (Rodas et al., 2009). Este tópico será desenvolvido adiante com mais propriedade.

A fisioterapia, por sua vez, utiliza-se de recursos físicos para promover e/ou favorecer a recuperação do tecido muscular. Entre as modalidades terapêuticas mais utilizadas, o ultrassom (US) ganha destaque (Watson, 2000, Warden and McMeeken, 2002) e, por isso, será o próximo tópico abordado.

1.3 Tratamento do tecido muscular através do Ultrassom e Fonoforese

1.3.1 Ultrassom terapêutico

O ultrassom é uma onda sonora do tipo mecânica, com propagação longitudinal e, com alcance de frequências acima da audível pelo ser humano (20 KHz) (Mitragotri, 2005, Humphrey, 2007). O emprego do ultrassom iniciou-se aproximadamente no início do século

vinte, quando materiais com efeito piezoelétricos tornaram-se disponíveis (Nyborg, 2001). Estes materiais são formados por cristais ou cerâmicas com capacidade de transformar a tensão elétrica em uma tensão mecânica (vibração). O cristal mais comumente utilizado é o quartzo e as cerâmicas são o tetanato de bário ou zirconato de chumbo (Taylor and Schultz, 1996).

Quando a onda sonora propaga-se num determinado meio, ela provoca a oscilação das partículas e deslocamento de fluidos na direção da propagação da onda, variando o deslocamento das partículas da sua posição de equilíbrio, produzindo mudanças na densidade e conseqüentemente, na pressão deste meio (Humphrey, 2007). Assim, a onda sonora irá transportar energia pelo meio através da energia cinética (movimento da partícula) e energia potencial (compressão de fluidos) (Humphrey, 2007).

O ultrassom terapêutico é muito utilizado em fisioterapia, principalmente para redução de edema, acelerar cicatrização de tecidos moles, desordens circulatórias entre outros (Robertson, 2002, Dalecki, 2004, ter Haar, 2007). As frequências utilizadas em fisioterapia variam entre 1 a 3 MHz (Watson, 2000, Humphrey, 2007), sendo que quanto maior a frequência da onda, menor será a profundidade de penetração no meio (Maxwell, 1992, Watson, 2000), assim na frequência de 1MHz o US pode alcançar uma profundidade de aproximadamente 4 a 5 cm no tecido humano (Watson, 2000). Além da frequência do ultrassom, a profundidade de penetração da onda sonora depende também da absorção, reflexão e/ou refração do som quando ele ultrapassa ou muda de meio (ou tecido) (Hoogland, 1989). Para favorecer a absorção do ultrassom pelo tecido reduzindo a reflexão e refração da onda, pode ser feito a aplicação do US em meio líquido ou com o uso de géis (à base de água), que auxiliam no acoplamento da onda sonora entre o meio e a pele (ter Haar, 2007).

O ultrassom terapêutico pode utilizar dois “modos” de onda: contínua e a pulsada. O modo de geração está relacionado com as características temporais da forma da onda, ou seja, como a onda sonora é moldada e transmitida (O'Brien, 2007). No modo contínuo a onda

apresenta forma (senoidal) e amplitude constante, na mesma frequência da frequência elétrica e, no pulsado a onda é produzida por sinais elétricos muito curtos intercalados por um período de ausência de onda (sinal elétrico), como se o aparelho fosse rapidamente desligado e, assim, repetidamente intercalado (O'Brien, 2007). O modo do ultrassom terá repercussões sobre os efeitos físicos e biológicos nos tecidos.

A intensidade de onda sonora (quantidade de fluxo de energia por área – W/cm^2) aplicada na terapia variam entre 0,1 a 3 W/cm^2 (Watson, 2000). Em geral, utiliza-se a I_{SATA} (quantidade de energia através da unidade de área na unidade de tempo) para prever o aquecimento do tecido e, a partir disso, definir a intensidade e tempo a ser utilizada (ter Haar, 2007). Existe a recomendação de intensidades entre 0,1 a 0,8 W/cm^2 (intensidade para o local da lesão) do ultrassom pulsado quando o tecido apresentar-se em fase aguda de inflamação (Watson, 2000), todavia, não há evidências científicas que justifiquem e evidenciem a efetividade desta orientação.

1.3.1.1 Efeitos do Ultrassom

Os efeitos biológicos do ultrassom são avaliados e classificados de acordo com os efeitos físicos provocados sobre os tecidos. Entre os efeitos físicos, estão bem descritos na literatura pelo menos três: térmicos, cavitação e o “fluxo acústico” (*acoustic streaming*) (Nyborg, 2001, Dalecki, 2004, Humphrey, 2007). Os efeitos térmicos são obtidos através da absorção da energia sonora pelos tecidos (Humphrey, 2007). A atividade celular dos tecidos é dependente de reações químicas e enzimáticas suscetíveis à variação da temperatura, assim, o consequente aumento da temperatura tecidual promovido pelo ultrassom poderá influenciar as reações bioquímicas celulares (O'Brien, 2007). A magnitude da elevação da temperatura no meio é dependente do US (intensidade e tempo de exposição) e do tecido exposto (coeficiente de absorção acústica e

irrigação sanguínea tecidual) (ter Haar, 2007). Quanto maior a intensidade ou o tempo de aplicação do US, maior será a elevação da temperatura (ter Haar, 2007).

Vários estudos têm registrado a variação da temperatura decorrente da aplicação do ultrassom terapêutico (Draper et al., 1995a, Draper et al., 1995b, Meidan et al., 1998, Cambier et al., 2001, Meshali et al., 2008). Estudos *in vitro*, em modelo de Célula de Difusão de Franz, avaliaram o aumento da temperatura na pele e compartimento receptor decorrentes da exposição do ultrassom e, constataram variações entre 5 e 6°C (3.3 MHz, 0.75 W/cm², contínuo durante 30min) (Meidan et al., 1998), e próximo a 8°C (0.8MHz, 0.5 W/cm², contínuo por 10min) (Meshali et al., 2008). Cambier et al (2001) avaliou a alteração da temperatura em cadáver humano durante a aplicação estacionária do ultrassom contínuo e pulsado na frequência de 1 MHz a 1 W/cm². Os pesquisadores verificaram que o aquecimento, no modo contínuo, a um centímetro de profundidade aumentava aproximadamente 1,49°C por minuto, a três centímetros 0,37°C e a cinco centímetros 0,09°C por minuto, entretanto no modo pulsado da onda, as mudanças observadas a 3 e 5 centímetros foram insignificantes (Cambier et al., 2001).

O efeito de cavitação é um processo onde bolhas de gás interagem com a pressão acústica provocando oscilações em seu tamanho ou forma, em torno de um raio de equilíbrio (cavitação não inercial), podendo ultrapassar este equilíbrio, colapsar e produzir uma onda de choque com grande elevação local da temperatura e pressão (cavitação inercial) (Tezel and Mitragotri, 2003, Dalecki, 2004, Polat et al., 2011). O tipo de cavitação (não inercial ou inercial) está inversamente relacionado com a frequência do ultrassom e diretamente relacionado com a intensidade da onda acústica (Sundaram et al., 2003, Lavon and Kost, 2004, Escobar-Chavez et al., 2009, Somaglino et al., 2011). Estudos com baixas frequências de ultrassom (20 a 100 KHz) têm referido efeitos físicos e biológicos decorrentes da cavitação inercial (Tang et al., 2002a, Tang et al., 2002b, Tezel et al., 2002), todavia, com frequências maiores (1 e 3 MHz), como as utilizadas no US

terapêutico, o efeito cavitacional esperado é do tipo não inercial (O'Brien, 2007, Silveira et al., 2010b).

O efeito conhecido como fluxo acústico (*acoustic streaming*) ocorre através da pressão mecânica da onda sonora capaz de formar um campo acústico, que se propaga originando um fluxo em meio líquido (Nyborg, 1982, Johns, 2002, Dalecki, 2004, VanBavel, 2007). A própria oscilação decorrente da cavitação pode também contribuir para a formação do fluxo acústico (Lavon and Kost, 2004). Estruturas internas livres no citoplasma da célula como organelas, íons e moléculas de diferentes pesos moleculares mediante este fluxo podem mais facilmente movimentar-se dentro da célula e ao longo das membranas (Nyborg, 1982, Johns, 2002).

Os efeitos biológicos sobre os tecidos são dependente dos parâmetros do US, principalmente, do modo, frequência e intensidade, porém, o tempo de exposição e forma de aplicação (estacionário ou em movimento) também pode influenciar (Mitragotri, 2005). Embora utilizado como modalidade terapêutica a muitos anos, não existe um protocolo ou guia estabelecendo os adequados parâmetros para o uso do US. Uma revisão sistemática avaliou pesquisas com ensaios clínicos randomizados, que utilizaram o ultrassom como meio terapêutico, com o objetivo de verificar relação entre dosagem e resposta ao tratamento (Robertson, 2002). O pesquisador concluiu que não existe uma relação comprovada entre dose e resposta, sugerindo maiores pesquisas para a eleição das respectivas doses terapêuticas.

Entre os efeitos biológicos do ultrassom, estudos com animais tem registrado aumento no conteúdo de proteínas musculares no grupo exposto ao US pulsado (Fisher et al., 2003), aumento do fluxo sanguíneo cutâneo (Noble et al., 2007), favorecimento da angiogênese (Mizrahi et al., 2007) e redução de células pró-inflamatórias no tecido muscular lesado (modo pulsado) (Signori et al., 2011). Todavia, outros estudos não tem observado diferenças significativas entre o uso do US como modalidade terapêutica e o seu grupo controle/placebo (Heijden et al., 1999, van der

Windt et al., 1999, Markert et al., 2005, D'Vaz et al., 2006), permanecendo em aberto a comprovação científica e o reconhecimento dos efeitos biológicos do ultrassom.

1.3.2 Fonoforese

A fonoforese ou sonoforese consiste no uso do ultrassom como meio de potencializar a penetração de agentes farmacológicos por via tópica (Mitragotri, 2005). O objetivo deste método é alcançar concentrações adequadas e rápidas no tecido alvo, sem degradar ou inativar a molécula do medicamento (Silveira et al., 2010b, Ebrahimi et al., 2012). A fonoforese tem sido muito empregado na fisioterapia (Meidan et al., 1995, Meidan et al., 1998), especialmente no tratamento de inflamações musculoesqueléticas (Kuntz et al., 2006).

A pele também é considerada uma via de administração para medicamentos cujo alvo é extra-cutâneo e, a sua utilização, garante algumas vantagens sobre as demais vias, como por exemplo, supressão do efeito da primeira passagem pelo fígado, baixos níveis no plasma e ausência da degradação via trato digestivo (Machet and Boucaud, 2002). A maior limitação da passagem de componentes exógenos pela pele encontra-se na camada mais externa da pele, a epiderme, que por sua vez, é formada por várias subcamadas, sendo a mais externa, a “estrato córnea” (SC) a maior barreira da pele (Figura 1). A SC é composta por várias camadas remanescente de células mortas, os corneócitos, ricos em queratina, e que estão mergulhados em uma matriz intercelular composta principalmente por ceramidas, ácidos graxo, triglicerídeos e colesterol (Prausnitz et al., 2004, Benson, 2005, Trommer and Neubert, 2006). O transporte transdérmico de solutos através da pele é basicamente controlado pela bicamada lipídica da estrato corneum (Prausnitz et al., 2004).

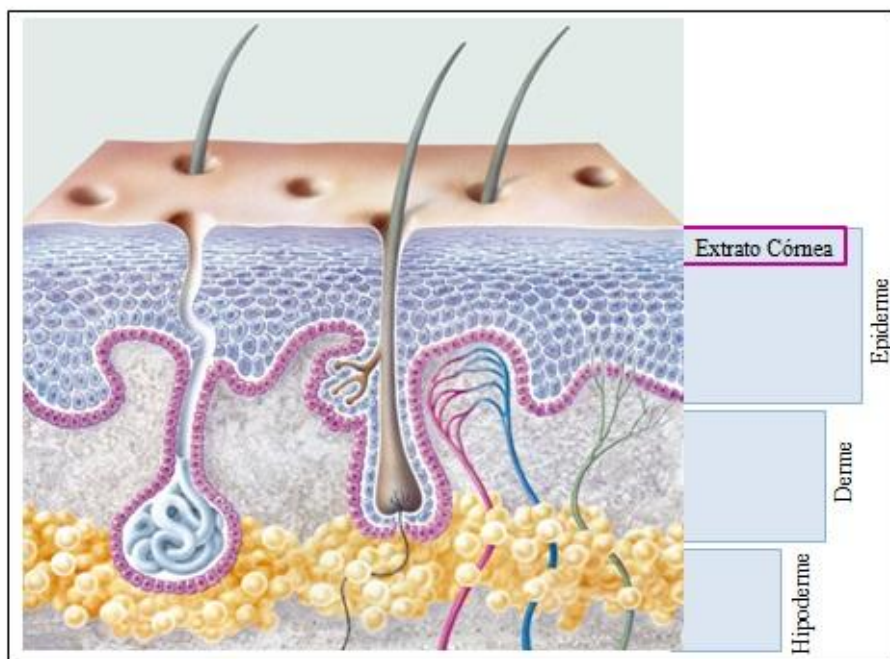


Fig 1. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Extrato córnea: subcamada mais externa da epiderme. Figura adaptada pelos autores, disponível em <<http://www.juzo.com/pt/servicos/conhecimento/dermatologia/>>, acesso em 15 de julho de 2013.

O favorecimento da permeação de substâncias sobre a pele provocada pelo ultrassom é explicado segundo os efeitos térmicos e de cavitação (Mitragotri, 2005, Polat et al., 2011). Parâmetros como frequência, intensidade e tempo de duração do ultrassom influenciam significativamente os resultados da permeação (Lavon and Kost, 2004). Estudos têm mostrado que frequências baixas (20 a 100KHz) apresentam melhores efeitos na passagem de medicamentos pela pele, comparado com frequências maiores (como 1 e 3MHz) (Tezel et al., 2001, Tezel and Mitragotri, 2003, Prausnitz et al., 2004, Ogura et al., 2008, Herwadkar et al., 2012). Todavia, as frequências baixas de ultrassom não são utilizadas como modalidade terapêutica e, por isso apresentam uso ainda muito restrito.

Estudos *in vivo*, em especial em humanos, apresentam resultados controversos sobre o efeito da fonoforese. Cagnie et al (2003) examinou a influência do US (1MHz, 1,6W/cm², 5 min. contínuo e pulsado) com cetoprofeno e constatou em tecido sinovial e gorduroso quantidades

significativas do medicamento. Rosim et al (2005) avaliaram a absorção transdérmica do diclofenaco de sódio em humanos, após irradiação por ultrassom (1 MHz, contínuo, 0,5 W/cm², 5 min) e verificaram que o US favoreceu passagem do medicamento quando na avaliação da substância em níveis plasmáticos. Ebrahimi et al (2012) combinou o uso do US (1MHz, 1W/cm², pulsado, 5min.) com um anestésico (lidocaína) por via tópica e verificou redução na discriminação de dois pontos, no toque e dor, comprovando a analgesia. Outros estudos, no entanto, apresentam resultados contrários, como por exemplo, Darrow et al (1999) que utilizou o US (1 MHz, contínuo, 1W/cm², 10 minutos) com dexametasona e não detectou, em níveis plasmáticos, quantidade significativa do medicamento. Seguindo com resultados semelhante, Kuntz et al (2006) avaliou o efeito da fonoforese (1MHz, 1W/cm², modo contínuo, 7min) com hidrocortisona em humanos e, não foram constatados concentrações do medicamento no tecido muscular analisado (Kuntz et al., 2006). Da mesma forma, a passagem do medicamento nimesulida em humanos foi mensurada por fotoacústica e a fonoforese não foi capaz de interferir no tempo de permeação do medicamento (Barja and Veloso, 2010). Essa discrepância entre resultados torna o uso desta modalidade terapêutica questionável clinicamente.

Baseado nas diferenças encontradas nos estudos, um ponto parece ser comum na literatura: a necessidade de maiores pesquisas visando comprovar a sua eficácia, indicação e mecanismo de funcionamento (Lavon and Kost, 2004, Cage et al., 2013). A partir disso, a presente tese busca contribuir com o processo de compreensão dos efeitos terapêuticos da fonoforese.

1.3.2.1 Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs) e Fonoforese na Regeneração Muscular

Os anti-inflamatórios não esteroidais são conhecidos a mais de 100 anos e, atualmente, é um grupo de medicamentos muito comum e, um dos mais prescritos na clínica médica (Kummer and Coelho, 2002, Mendes et al., 2012). O ácido araquidônico encontra-se na célula na forma

esterificada com fosfolipídios de membrana e, quando liberado por ação da enzima fosfolipase A₂, pode ser convertido em prostanóides (prostaglandina, prostaciclina e tromboxano) sob a ação da enzima ciclooxigenase (COX 1 e 2) (Mikkelsen et al., 2011). Os prostanóides exercem efeito sobre receptores de membrana na ativação da cascata da inflamação e dor (Mendes et al., 2012). Os AINEs atuam na inibição da enzima ciclooxigenase (COX 1 e 2), interferindo com a produção de prostaglandinas, e conseqüentemente, reduzindo a sua ação pró-inflamatória (Urso, 2013).

O uso de AINEs, nos processos de recuperação após lesão muscular, visam prevenir o excessivo dano tecidual pela limitação da proteólise causada pelas células de defesa, reduzir a dor e favorecer a rápida cura tecidual (Mehallo et al., 2006). Estudos em modelos animais de lesão muscular e tratamento com AINEs tem demonstrado resultados divergentes. Na avaliação da força contrátil e força tênsil de músculos lesionados por distensão em coelhos, tratados com piroxicam (AINEs), não foram encontradas diferenças entre os grupos tratado e controle (Obremsky et al., 1994). Entretanto, neste mesmo estudo a análise histológicas revelou atraso na degeneração do tecido lesionado e lenta regeneração no grupo que utilizou o medicamento (Obremsky et al., 1994). Outro estudo sugere que a via da COX é importante para a fusão das células musculares durante a regeneração (Shen et al., 2005). Corroborando com os achados de Shen et al (1996), a síntese de prostaglandinas foi encontrada como importante indutora da MyoD, um fator regulatório no desenvolvimento e regeneração muscular (Monda et al., 2009). Estes resultados apontam para um prejuízo da regeneração muscular com a utilização dos AINEs.

Estudos em humanos com o uso de AINEs mantém a divergência, por um lado indicando reduzido aumento no número de células satélites no músculo após o seu consumo (Mackey et al., 2007) e, por outro, não demonstrando redução na expressão gênica de proteínas miofibrilares (Mikkelsen et al., 2011, Urso, 2013). Pesquisas recentes com idosos e o uso de AINEs

combinados com exercícios de resistência mostraram aumentar a hipertrofia muscular e ganho de força, embora por mecanismos não conhecidos (Trappe et al., 2011, Trappe et al., 2013).

O ponto central na divergência da administração de anti-inflamatório parece estar sobre o tempo de uso deste medicamento, pois pesquisas em animais tem mostrado que o uso prolongado de AINEs é prejudicial à regeneração muscular devido ação negativa sobre a ativação de células satélites (Urso, 2013). Entretanto, embora ainda controverso, o uso controlado em curto período de tempo (em torno de 3 dias), iniciado previamente ao pico inflamatório, parece recomendado (Obremsky et al., 1994, Almekinders, 1999, Mehallo et al., 2006).

Os AINEs são em sua maioria não seletivos, portanto, atuam na inibição de COX-1 e 2. A COX-1 é constitutiva do tecido gástrico, a administração oral de AINEs pode provocar desconforto a este sistema, causando dor abdominal, ulceração e irritação a mucosa gástrica e, por isso, o uso transdérmico apresenta-se como opção (Maestrelli et al., 2006, Herwadkar et al., 2012). A combinação de AINEs tópico com a fonoforese pode favorecer níveis do medicamento com menores quantidade no plasma e sem os danos ao sistema gástrico. Confirmando esta hipótese, a fonoforese combinada com o uso de anti-inflamatórios mostrou-se positiva como modalidade auxiliar no tratamento da lesão de tecidos moles (fluocinonide) (Klaiman et al., 1998), síndrome do ombro doloroso (medicamento indometacina) (Vlak, 1999), síndrome do túnel do carpo (medicamento cetoprofeno) (Yildiz et al., 2011), dor miofascial (medicamento diclofenaco) (Ay et al., 2011), celulite edematosa (hialuronidase) (Silva et al., 2013), dor lombar crônica (capsaicina) (Durmus et al., 2013) entre outros.

Entretanto, nem todos os autores concordam com a efetividade da fonoforese. Estudos de revisão sobre ensaios clínicos randomizados que avaliam o efeito da fonoforese tem se mostrado pobres metodologicamente, com número restrito de sujeitos, ausência de critérios específicos para fatores de inclusão e exclusão e ausência de grupo placebo. Em conclusão, os trabalhos constataram que há um número limitado de ensaios clínicos randomizados que forneçam

evidências científicas da eficácia do uso da fonoforese, em especial com uso de AINEs (Meidan et al., 1995, Parizotto et al., 2003, Lavon and Kost, 2004, Abrahams, 2008).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito dos métodos terapêuticos ultrassom e fonoforese no tratamento da lesão muscular aguda.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar os modelos de lesão muscular em animais utilizados para replicar as lesões musculares comuns em humanos;
- Reproduzir o melhor modelo de lesão muscular em animais;
- Investigar o efeito do ultrassom pulsado sobre os parâmetros de permeação de anti-inflamatórios não esteroidais;
- Verificar o efeito do ultrassom sobre o processo inflamatório agudo de lesões musculares;
- Verificar o efeito da fonoforese (ultrassom e anti-inflamatório não esteroidal) sobre o processo inflamatório agudo de lesões musculares.

PARTE II

CAPÍTULO I

Muscle injury: review of experimental models.

Artigo aceito na revista *Journal of Electromyography and kinesiology*

(A comunicação encontra-se no Anexo I).

MUSCLE INJURY: REVIEW OF EXPERIMENTAL MODELS

Jaqueline de Souza^{1,2*}, Carmem Gottfried¹

¹Research Group in Neuroglial Plasticity, Department of Biochemistry, Institute of Health's Basic Science. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Course of Physical Therapy, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil.

Keywords: mechanical muscle injury, strain, contusion and laceration.

***CORRESPONDENCE ADDRESS:**

Professor Jaqueline de Souza

Campus Uruguaiana

Federal University of Pampa

Adress: BR 472, Km 592

97500 – 970 - Uruguaiana, RS - BRAZIL

Phone: +55 55 3413-4321

E-mail: jaquelinesz@yahoo.com.br

ABSTRACT

Skeletal muscle is the most abundant tissue in the human body. Its main characteristic is the capacity to regenerate after injury independent of the cause of injury through a process called inflammatory response. Mechanical injuries are the most common type of the skeletal muscle injuries and are classified into one of three areas strain, contusion, and laceration. First, this review aims to describe and compare the main experimental methods that replicate the mechanical muscle injuries. There are several ways to replicate each kind of mechanical injury; there are, however, specific characteristics that must be taken into account when choosing the most appropriate model for the experiment. Finally, this review discusses the context of mechanical injury considering types, variability of methods, and the ability to reproduce injury models.

Keywords: mechanical muscle injury, strain, contusion, laceration.

CONTENTS

1. Introduction
2. Muscular regeneration after injuries
3. Types of muscular injuries caused by mechanical trauma and its experimental models
 - 3.1. Contusion
 - 3.2. Strain
 - 3.3. Laceration
4. Concluding remarks

1 INTRODUCTION

Skeletal muscle is one of the most abundant tissues in the human body and is constantly exposed to various types of injuries. In sports, muscle injuries comprise 10 to 55% of all injuries [Kaariainen et al. , 2000]. The most common cause of injury is mechanical trauma [Huard et al. , 2002, Jarvinen et al. , 2007, Mehallo et al. , 2006], which often results in the athlete's inability to train or compete for at least several weeks [Almekinders, 1999].

Skeletal muscle tissue is composed of cells that present stable characteristics; in other words, the death of cells is a relatively rare event and is generally associated with muscle injuries such as toxic stimuli, degenerative diseases and/or genetics, physical exercise, or mechanical injury. This tissue has plastic potential with moderate capacity for regeneration and remodeling, which may change its phenotypic feature through re-innervation or physical exercise [Bassel-Duby and Olson, 2006]. Muscle recovery after a mechanical injury happens sequentially, displaying a set of well-known characteristics of cellular and molecular events [Carosio et al. , 2011, Charge and Rudnicki, 2004, Lefaucheur and Sebillé, 1995]. Together, these events are known as typical inflammatory processes and, although there is controversy in the literature [Warren et al. , 2007], the current approaches to the therapeutic treatment of muscular injuries depend on the severity of the injury, not on the type of injury [Jarvinen et al. , 2005].

Many studies evaluating muscle regeneration in animal models with muscle injuries that mimic the injuries observed in humans have been conducted [Ghaly and Marsh, 2010, Menetrey et al. , 1999, Minamoto et al. , 2001, Pratt et al. , 2012, Puntel et al. , 2011, Silveira et al. , 2010, Turner et al. , 2012]. These studies evaluated treatments that promoted the regeneration process [Luo et al. , 2012, Nozaki et al. , 2008, Silveira et al., 2010, Zimowska et al. , 2009]. They described the regenerative process in different phases of the life cycle [Ghaly and Marsh, 2010], the influence of exercise on regeneration [Ambrosio et al. , 2010, Hwang et al. , 2006, Khattak et al. , 2010], and described the pathological process that occurs in the muscle [Minamoto et al.,

2001, Song et al. , 2004, Stauber et al. , 1996]. However, the major limitation of these studies is the variety of techniques and models used to replicate the muscle injuries make the comparison and reproduction of treatments or pathological processes used in the studies difficult [Toumi et al. , 2006].

The aim of the present study is to analyze and to compare the main experimental methods used on animals utilized to replicate the mechanical skeletal muscle injuries of humans. To do this, we performed an extensive literature review of studies and articles from the last fifteen years, including previous studies that were often cited in the references of the primary articles.

2 MECHANISMS OF REGENERATION AFTER INJURY

Skeletal muscle tissue is composed of cells, known as myofibers, which have a moderate capacity to regenerate and great capacity to adapt (especially to exercise) [Bassel-Duby and Olson, 2006]. Their innervations, which form part of the myofibers, are responsible for muscle contraction [Jarvinenet al., 2005, Kaariainenet al., 2000]. Skeletal muscles are also composed of connective tissue, which resists and transmits the force generated by myofibrils to the tendon and bone structures to generate physical movement [Kaariainenet al., 2000]. When skeletal muscles are injured, any one of these components can be damaged.

Skeletal muscle injuries are common, especially when playing sports; they result in lost time from training and competition, compromising the performance of the athletes. The most frequent injuries are mechanical in origin and are classified as contusions, strains, or lacerations [Huardet al., 2002, Jarvinenet al., 2007, Kary, 2010, Mehalloet al., 2006]. Contusions and strains account for approximately 90% of muscle injuries in sports [Jarvinen et al. , 2000]. The mechanical injuries are described as those that involve disrupted connective tissues and lead to myofiber necrosis, hematomas, and inflammation [Almekinders, 1999, Jarvinenet al., 2007, Quintero et al. , 2009, Thorsson et al. , 1998]. Muscular inflammation and regeneration depends on the nature, extent, and strength of the injury [Jarvinenet al., 2007, Lefaucheur and Sebille,

1995]. According to the literature, the general process of muscle injury and repair is similar in most cases and follows the typical inflammatory process description [Filippin et al. , 2009, Huard et al., 2002, Mehallo et al., 2006, Quintero et al., 2009, Sato et al. , 2003].

Muscle inflammation occurs in three phases: damage, repair, and remodeling [Filippin et al., 2009, Huard et al., 2002, Jarvinen et al., 2007, Mehallo et al., 2006]; the last two phases happen simultaneously [Jarvinenet al., 2000]. Muscle inflammation accompanies the whole process of tissue healing and the proper evolution of this process will ensure optimal muscle regeneration that leads to appropriate muscle function. However, the exacerbation of the inflammatory response may impair muscle regeneration, disrupting homeostasis and making the restoration of muscle function difficult [Tidball, 2005].

The inflammatory process begins with the destruction of the injured muscle through the disruption of the sarcolemma; this leads to an influx of extracellular calcium and the activation of calcium-dependent proteases and phospholipases, which ultimately induces calcium-dependent necrosis, its degeneration and /or damage of myofibrils [Belcastro et al. , 1998, Grefte et al. , 2007, Kawiak et al. , 2006, Quintero et al., 2009]. As a result of this destruction, the fibers hypercontract; additionally, serum proteins deriving from disrupted tissue increase as creatine kinase, present in the cytosol of the muscle cell and found in blood samples only after mechanical stress or muscle degenerative diseases [Charge and Rudnicki, 2004, Friden and Lieber, 2001]. Considering the functionality of muscle tissue, there is a weakness in the ability to withstand passive stretch and to generate active contractions [Almekinders, 1999].

The injury also leads to rupturing blood vessels and triggers signaling via cytokines that activates diapedesis (movement of white blood cells from circulation into the tissue) [Butterfield et al. , 2006, Grefte et al., 2007]. In the inflamed cells, neutrophils are the first to reach the site of injury, followed by macrophages. These two cells are primarily responsible for the inflammatory response in at the site of the muscle injury [Brickson et al. , 2001, Charge and

Rudnicki, 2004, Tidball, 2005]. Other immunologic cells also are involved in muscle inflammation including T lymphocytes; these, with cytokine, regulate muscle repair and fibrosis [Dumke and Lees, 2011, Mann et al. , 2011]. The neutrophils are able to destroy damaged tissue through phagocytosis and proteolytic systems by releasing pro-inflammatory cytokines [Smith et al. , 2008, Toumiet al., 2006]. However, these cells release cytotoxins (such as NADPH-oxidase and myeloperoxidase) that generate reactive oxygen substances (superoxide anions, hypochlorous acid, and hydrogen peroxide) that destroy the necrotic tissue. These reactive substances may also be involved in the exacerbation of inflammatory process, causing damage to healthy myofibrils [Bricksonet al., 2001, Butterfieldet al., 2006, Toumi and Best, 2003, Toumiet al., 2006].

The macrophages that act to repair muscle come from two locations: the capillaries located in muscle tissue around the injury and the epimysium and/or perimysium. The epimysium/perimysium seem to be the primary routes for the recruitment of these cells by the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) [Arnold et al. , 2007, Chazaud et al. , 2009, Chazaud et al. , 2003]. There are macrophages with distinct functions in muscle regeneration: Type I or ED1+ macrophages, which are present in various tissues; ED2+ or type II, which are located in the muscle tissue; and ED3+ or type III macrophages, which are found in and limited to lymphoid tissue [Brunelli and Rovere-Querini, 2008, Butterfieldet al., 2006, McLennan, 1993, Smithet al., 2008, Tidball and Villalta, 2010]. ED1+ cells appear to play roles similar to neutrophils, contributing to the phagocytosis and inflammatory response. ED 2+ cells appear to act later in cell signaling and are partially responsible for the production of growth factors and cytokines involved in muscle regeneration [McLennan, 1993, Smithet al., 2008]. The macrophages appear in greater quantities in about two days after injury. This coincides with the decline in the number of neutrophils. This number rapidly decreases five days after the muscle injury has occurred [Chazaud et al., 2009, Shen et al. , 2008, Tidball, 2005]. Their extended

presence may indicate that macrophages have a role in sustaining the inflammatory response initiated by neutrophils and damaged cells [Smith et al., 2008, Tidball and Villalta, 2010]. However, these cells also play a crucial role in mediating muscle repair by secreting growth factors to myogenic cells, protecting myogenic cells from apoptosis, and modulating the myogenic process [Arnold et al., 2007, Chazaud et al., 2009, Chazaud et al., 2003, Smith et al., 2008]. There is a complex mechanism regulating macrophage action through the inflammatory stages, which depends on the influence and interaction between the cells as well as growth factors, such as TGF- β 1 (transforming growth factor-beta 1) and the cyclooxygenase enzymes pathway [Monda et al. , 2009, Shen et al., 2008].

Muscle stem cells located in the periphery of the basal membrane are a part of growth, repair (fuse with myofibers healthy), and maintenance of muscle tissue [Carosio et al., 2011, Quintero et al., 2009, Yablonka-Reuveni et al. , 2008]. Stem cells are attracted to the place of muscle injury by cytokines released by macrophages [Charge and Rudnicki, 2004, Chazaud et al., 2003, Grefte et al., 2007]. The activation of stem cells depends on the up-regulation of muscle transcriptional factors and specific genes [Carosio et al., 2011, Charge and Rudnicki, 2004, Kawiak et al., 2006, Marsh et al. , 1997]. Stem cells can differentiate into myofibroblasts (fibrotic cells of muscle tissue) or myofibers; the determining factors for differentiation are the local environmental stimuli in the tissue after the injury has occurred [Li and Huard, 2002].

The last phases of inflammation involve regeneration of the disrupted myofiber, formation and remodeling of scar tissue, angiogenesis, and recovery of muscle function [Carosio et al., 2011, Jarvinen et al., 2005, Wang et al. , 2009]. Recovering functional muscle tissue depends on the balance of the last phases inflammation [Jarvinen et al., 2005, Tidball, 2005]. Fibroblasts play an important role in muscle tissue repair by secreting extracellular matrix proteins including: collagen types I and III, fibronectin, elastin, proteoglycans, laminin and growth factors [Li et al. , 2008, Mann et al., 2011]. However, fibroblasts may exceed in the dispersal of

extracellular matrices, which restricts the diffusion of nutrients to myofibers and forms a barrier in the migration and fusion of new muscle cells. This alters the mechanical characteristics of the muscle (such as elasticity and strength), which leads to the development of fibrosis and incomplete muscle recovery [Kaariainen et al., 2000, Wang et al., 2009]. Fibrosis is characterized by the accumulation of extracellular matrices, primarily type I collagen. Although the origin is not well understood, fibrosis is usually induced by chronic connective tissue injuries [Uezumi et al. , 2011]. The transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is the major stimulator of the fibrosis process and the inductor of myogenic cells to differentiate into myofibroblasts in injured muscle [Li et al. , 2004]. TGF- β 1 inhibition has been used in research to improve muscle regeneration by preventing the fibrotic process [Zimowska et al., 2009].

3 MUSCLE INJURIES

3.1 Contusion

Muscle contusions are one of the most common types of muscle injuries [Khattak et al., 2010, Smith et al., 2008] and occurs when the tissue is exposed to a rapid and strong compressive force [Jarvinen et al., 2007] or, for example, a direct and non-penetrating hit to the muscle belly [Almekinders, 1999] which typically leads to the formation of a hematoma within the muscle [Kary, 2010]. This often occurs in team sports that have greater contact among the athletes, such as football, basketball, and handball. The symptoms of this type of injury are varied and do not follow a typical pattern; however, there is generally soreness, pain with movement, a limited range of movement, or a combination of these symptoms [Jarvinen et al., 2005].

In order to study the mechanisms of contusion injuries and muscle regeneration and to test possible treatments, experimental animal models are developed in order to replicate the process of injury observed in humans [Crisco et al. , 1996, McBrier et al. , 2009, Minamoto et al. , 1999,

Puntel et al., 2011]. The Table 1 shows the main models of injury that mimic contusion injuries in humans.

Most studies use the blunt, non-penetrating impact model. The injury is sustained by dropping a metallic mass through a guide tube; the mass is then released on the region of the muscle belly to be injured [Ambrosio et al., 2010, Crisco et al., 1996, Crisco et al. , 1994, Minamoto et al., 1999, Puntel et al., 2011]. Other studies have used the crush, which is a model of injury more invasive that uses surgical exposure of muscle belly followed by crushing [Ghaly and Marsh, 2010, Rantanen et al. , 1999, Takagi et al. , 2011, Winkler et al. , 2011]. This injury procedure is not totally compatible with the contusion injury that occurs in humans for at least two reasons. First, in humans, the contusion occurs by sudden, heavy compressive force on the muscle belly [Jarvinen et al., 2005] which means that there is no penetrating trauma. In crush injury models, there are surgical interventions involving damage to the skin and adjacent tissues which may lead, for example, to increased levels of cytokines that are not related to the trauma of the injury and that may affect the results [Smith et al., 2008]. Second, the reliability of the test is faulty Crushing can be carried out using different measures of strength to promote the injury [Smith et al., 2008]. Additionally, although some studies use the model to promote a crush injury similar to human injury [Rantanen et al., 1999, Thorsson et al., 1998, Winkler et al., 2011], the crush model is also used to replicate the most serious trauma, such as traumatic rhabdomyolysis, which happens in catastrophic events where the body remains under extended mechanical pressure, affecting the muscle tissue with great consequences that can lead to death [Akimau et al. , 2005].

The contusion model is mainly used to evaluate possible methods of injury treatment or facilitators of the muscle regeneration process; these include: the ultrasound effect [McBrier et al. , 2007, Rantanen et al., 1999, Shu et al. , 2012, Silveira et al., 2010, Wilkin et al. , 2004], exercise [Ambrosio et al., 2010, Khattak et al., 2010], cold [Puntel et al., 2011, Takagi et al.,

2011], laser therapy [Luo et al., 2012, Rizzi et al. , 2006], nonsteroidal anti-inflammatory medications [Thorsson et al., 1998], and antifibrotic therapy [Filippin et al. , 2011, Nozaki et al., 2008]. The model is also used to evaluate the process of regeneration and influence of growth factors on injured muscle [Fan et al. , 2013, Li et al. , 2013, Zimowska et al., 2009], as well as factors related to the injury model such as injury intensity [McBrier et al., 2009] and frequency of the injury [Minamoto et al., 1999].

The experimental models are applied to lower limb muscles (the hind limbs in animals), as contusions occur with increased incidence in this part of the body in humans [Jarvinen et al., 2005, Kary, 2010]. The gastrocnemius muscle, located in the hind limb, is the most commonly used in the models [Crisco et al., 1996, Filippin et al., 2011, Kami and Senba, 2002, Markert et al. , 2005, McBrier et al., 2007, McBrier et al., 2009, Puntel et al., 2011, Rantanen et al., 1999, Silveira et al., 2010, Thorsson et al., 1998, Wilkin et al., 2004]. Its more shallow location and the mixture of fiber types [Wang and Kernell, 2000] may explain the reasons for its preference. The other hind limb muscles used in the experimental models present the predominance of only one type of muscle fiber. The tibialis anterior and extensor digitorum longus, for example, only have Type II fibers; the soleus, on the other hand, only has Type I fibers [Ota et al. , 2011, Wang and Kernell, 2000]. Studies conducted on muscle contusion models are usually performed to obtain histological features of those observed in human injured muscle tissue. In most of these studies, myofibril is destroyed and necrosis with basal membrane disruption occurs; additionally, tissue hemorrhage and presence of inflammatory cells such as neutrophil and macrophage characterizing a typical inflammatory process independent of the kind of muscle fiber are present [Minamoto et al., 2001, Minamoto et al., 1999, Nozaki et al., 2008, Wilkin et al., 2004].

Between the two experimental models of contusion, the blunt, not penetrating impact is the most commonly used and has more similarities to the contusion in humans. However, these

studies used different mass weight and height, the injuries differ in terms of impact load and severity.

This study, we calculated the kinetic energy of the impact used in the studies analyzed, according previous information [Filippin et al., 2011, Rizzi et al., 2006]. We considered the mass weight and height at which the mass was released, comparing the energy of experimental model impacts as shown in Table 2. For example, for the same type of animal (Wistar adult) and muscle (gastrocnemius), the variation of the impact kinetic energy estimated reaches more than doubled when compared to previously described data [Silveira et al., 2010, Wilkin et al., 2004]. The discrepancy among studies could be decreased if the contusion injury is classified, similar to how human clinical signs and symptoms are determined. Among the contusion studies (Table 1), only one classified the type of injury produced in animals was found [McBrier et al., 2009]. When the load (mass with 267g) was applied from a height of 40 and 50 cm, the injury was mild to moderate; however, when the height was 60 cm, the injury passed from moderate to severe. At the height of 70 cm, the results showed a severe muscle injury followed by tibia and fibula fractures. Therefore, the results show that both height and weight of the impact mass are determining factors for the production of a more severe muscle injury.

Another important factor to consider when choosing blunt non-penetrating injury contusion model is the mass format used to introduce the trauma. There are studies that used a mass in the shape of a ball [Ambrosio et al., 2010, Crisco et al., 1996, Kami and Senba, 2002, Khattak et al., 2010, Li et al., 2013, Nozaki et al., 2008, Ota et al., 2011] and some used a cylinder shape [Crisco et al., 1996, Kami and Senba, 2002]. Some studies did not indicate which area was impacted [Filippin et al., 2011, Rizzi et al., 2006, Silveira et al., 2010] or mass shape [Filippin et al., 2011, Luo et al., 2012, McBrier et al., 2007, Shu et al., 2012, Silveira et al., 2010, Wilkin et al., 2004] were used to create the muscle injury. Both mass shape and area of impact are important factors in determining the severity of the injury. Using a weight with a flat shape, the

muscle injury is more uniform than if, for example, a spherical shape, which has a smaller area and increase injury in the middle of the impact area [Smith et al., 2008]. Therefore, the shape of the mass must be considered in the choice of muscle injury models to have an injury area suitable for each type of investigation.

3.2 Strain

Muscle injury by strain occurs when the muscle is subjected to an excessive tensile strength, resulting in overstretching [Jarvinen et al., 2007, Jarvinen et al., 2000]. Normally, muscle strains occur in the distal myotendinous junction, where greater force is concentrated and transferred to the skeletal muscle. The severity of the injury also increases the involvement of muscle myofibrils and tendinous insertion into the bone [Ali and Leland, 2012, Armfield et al. , 2006, Banks et al. , 2008, Jarvinen et al., 2000]. Usually, strain occurs when the muscle is involved in an eccentric contraction, when opposite tensile forces are simultaneously present, making the muscle susceptible to tearing [Beltran et al. , 2011]. Muscles that are connected to more than one joint (multi-joint) are most commonly affected by strain; these muscles include the gastrocnemius, rectus femoris and the hamstring muscles, which span the hip and knee [Ali and Leland, 2012, Almekinders, 1999, Jarvinen et al., 2007, Toumi et al., 2006]. These multi-joint muscles are commonly affected because they have to deal with large internal forces and fast changes in muscle length and contraction mode [Pull and Ranson, 2007]. These muscles are composed predominantly of Type II fibers, suggesting that metabolism influence the functional characteristics of muscles as well as the risk of injury [Toumi et al., 2006]. A combination of fatigue that results from high percentage of fast twitch muscle fibers and the dual action required for both joints in the muscles that span two joints can lead to excessive tension within the muscle during eccentric contraction, resulting in a tear and, thereby, muscle injury [Almekinders, 1999].

The clinical presentation of strains is highly variable; however, studies have shown that muscle fiber tears, hemorrhaging, and edema exist because intramuscular blood vessel are torn

[Almekinders, 1999, Jarvinen et al., 2000, Toumi et al., 2006]. The studies classified the muscle strain in three categories according to their severity: 1) Mild (First Degree): in this case, the injury reaches few muscle fibers. There is a minimal loss of structural integrity in the musculotendinous unit, but tearing causes minor swelling and discomfort followed by minimal loss of strength and restriction of movement; 2) Moderate (Second Degree): in this case, there is greater muscle damage. There is an obvious partial tear that leads to a moderate amount of pain, followed by a clear loss of strength; 3) Severe (Third Degree): in this case, there is a tear extending across the whole muscle belly and musculotendinous unit, which results in a total loss of muscle function [Ali and Leland, 2012, Barr, 2007, Heiderscheit et al. , 2010, Jarvinen et al., 2000]. Strains may increase the risk of subsequent injuries; for example, if an individual suffers from a hamstring strain, they are 12 to 31% more likely to suffer from the injury again [Barr, 2007]. This may be caused by muscle fatigue, insufficient warm-up and muscle imbalances, and/or architectural changes to the myofibrils, especially after moderate to severe strains [Ali and Leland, 2012, Croisier, 2004].

The physiopathology resulting from muscle strain is characterized by the following: a breakdown in sarcolemma and sarcomere units, membrane damage, followed by the influx of extracellular calcium into the muscle cell resulting in the destruction of these structures, and the evolution of the typical inflammatory process [Banks et al., 2008, Brickson et al., 2001, Jarvinen et al., 2000, Stauber, 2004, Stauber and Willems, 2002]. However, not all strains initiate the inflammatory process [Stauber, 2004, Stauber and Willems, 2002]. In the case of contusion injuries, the structures that are most affected are the site-specific myofibrils, usually found in the muscle belly. The regeneration process depends on the intensity of the impact, of the hemorrhaging at the site of the injury, and the development of inflammation, as already described. However, strains usually affect the components of the myotendinous junction [Pratt et al., 2012, Smith et al. , 2007, Song et al., 2004], especially myofibrils and the proteins and

glycoproteins that play important roles in muscle stabilization and protection, as well as the transduction from mechanical to chemical signals [Bankset al., 2008, Boppart et al. , 2006, Burkholder, 2007, Wang et al. , 2008, Wang et al., 2009]. When strains regenerate, the myofibrils near the myotendinous junction are organized in concentric rings; these help prevent muscle necrosis and maintain muscle functions during stretches [Banks et al., 2008]. There are also strains in which the injury spreads along the epimysium, resulting in tears and the presence of hemorrhages between the fascia and muscle [Beltran et al., 2011]. In a study using a three-dimensional muscle model provided by magnetic resonance imaging, researchers observed that the fascia of the biceps femoris showed more morphological differences in the proximal region than the distal, promoting differences in the strength and stretch distribution, which are important aspects in determining an individual's susceptibility to muscle strain [Rehorn and Blemker, 2010]. Muscle regeneration that was affected by strain showed the presence of fibrosis, including increased membrane thickness and a reduction of contractile units, which may be irreversible in situations such as high-load, chronic strains [Stauber et al., 1996].

The literature shows several replication protocols of the strain injury in animals that can be divided into two major groups: those using electric muscle stimulation to simulate eccentric contractions with stretch application [Brickson et al., 2001, Butterfield and Herzog, 2006a, b, Drost et al. , 2003, Hammond et al. , 2009, Nakazato et al. , 2010, Pratt et al., 2012, Smith et al., 2007, Song et al., 2004, Stauber et al., 1996, Warren et al., 2007] and those that use the traction of the muscle tendon to cause injury [Carvalho et al. , 2010, Carvalho et al. , 2013, Chan et al. , 2005, Feng et al. , 2004, He et al. , 2008, Ramos et al. , 2012]. Most studies in the first group aim to replicate the muscle strain injury and may be subdivided into two groups according to the type of muscle contraction stimulation: one group uses electric stimulation to trigger the specific muscle nerve while the joint is moving and the muscle is lengthening (eccentric contraction) [Brickson et al., 2001, Butterfield and Herzog, 2006a, b, Drost et al., 2003, Hammond et al.,

2009, Pratt et al., 2012, Warren et al., 2007]; the other group uses electrodes placed on the skin or subcutaneous to electrically stimulate the muscle [Smith et al., 2007, Song et al., 2004, Stauber et al., 1996, Toumi et al., 2006]. Although both subgroups present common characteristics of muscle strain injury, the first group (that electrically stimulates the nerve) tends to be more effective in terms of activating specific muscles and their motor units. The effectiveness of electric muscle stimulation via the skin is limited by the skin and depends on the type of electric current, as well as the parameters used (such as frequency and voltage) [Ward, 2009]; taking these precautions does not guarantee the presence of maximal muscle activation, especially to the fibers and motor units most distant from the skin (a.k.a. the deep fibers). However, this model is less invasive and does not require surgery of any sort.

The strain model that uses muscle tendon traction is commonly achieved through surgery. A strain gauge wire is attached that pulls the tendon/muscle to a point according to predetermined elongation versus strain [Carvalho et al., 2010, Chan et al., 2005, Feng et al., 2004, He et al., 2008, Obremsky et al. , 1994]. A recent study using a similar injury model uses graduate weights attached to the foot corresponding to 150% of the animal's body weight to evaluate the treatment of the tibialis anterior strain [Ramos et al., 2012]. In this case, there was no muscle contraction, so the injury could not be characterized as a strain injury caused by eccentric contraction. Instead, it was due to forced stretching.

These strain injury models used on animals present some advantages when compared to human studies. First, because entire muscles can be removed for functional and morphological study, the parameters used in the experimental strain such as velocity, acceleration, and movement range can be precisely controlled. However, in animal models, the muscle injury is induced concomitantly with electrical stimulation with 100% of myofiber activation (until they reach tetany). This is very different from what normally happens in humans, where low load and

high repetition or when high loads are applied to motion lead to strain [Stauber, 2004, Toumi et al., 2006].

3.3 Laceration

Similar to contusion muscle injuries, lacerations also occur because of direct trauma [Hwang et al., 2006, Kragh et al. , 2005]; however, this kind of trauma happens when the tissue is exposed to a crushing force or to a sharp objects, leading to local destruction of tissue structures or even volumetric loss of muscle tissue [Menetrey et al., 1999, Turner et al., 2012]. Considering the muscle injuries that frequently occur in sports, lacerations are the most unusual of these traumas and their prevalence is more often associated with accidents such as collisions.

The pathophysiology of lacerations include a typical inflammatory process, with the myofibrils broken into two parts [Aarimaa et al. , 2004, Hwang et al., 2006, Kaariainen et al. , 1998, Kragh et al., 2005]. Especially in laceration injuries, there is a greater propensity for the involvement of muscular innervations compared to strain and contusion, which may cause tissue recovery to be difficult [Menetrey et al., 1999]. Another important factor for the development of the inflammatory process is the integrity or involvement of the muscle membranes. A study that involved laceration injuries given to animals evaluated the biomechanical properties of epimysium after muscle belly transection [Kragh et al., 2005]. This study showed that the group of muscles that had epimysium repair supported higher loads than the group without the epimysium repair. This seemed to prove that better repair of muscle membranes indicated better mechanical and functional properties of the muscle. An analysis of the biomechanical properties of the soleus muscle after complete tearing revealed that the tensile strength of the muscle increased gradually between five and 14 days post-injury, but did not reach the values of the control group (not injured) until the 56th day [Kaariainen et al., 1998]. Also, stretching the injured soleus muscles were lower and did not reach the control values at the end of the experiment, remaining at around 50-60% of the control values [Kaariainen et al., 1998].

Therefore, the time of recovery for functional parameters (biomechanics: strength and stretch) of laceration injuries appeared to present a longer period of recovery in comparison with that observed in the other mechanical traumas.

Models of human muscle lacerations, as shown in Table 3, are used to replicate these injuries in animals. These studies showed greater uniformity among laceration injury models as compared to the strain and contusion models. All studies with laceration models used the transection of the muscle belly, only varying in extent and depth of cut, as can be seen in Table3.

As in other models of mechanical injury (especially contusion), the hindlimb muscles of rodents were the main focus of the developmental studies. Curiously, a common point observed in studies that included laceration models was that more than half of them were aimed, direct or indirectly, at evaluating the development of scarring after injury [Aarimaa et al., 2004, Foster et al. , 2003, Hwang et al., 2013, Hwang et al., 2006, Kaar et al. , 2008, Li et al., 2004, Li and Huard, 2002, Negishi et al. , 2005, Park et al., 2012, Piedade et al. , 2008, Sato et al., 2003, Shen et al. , 2005]. This can be easily explained because tears totally destroy the muscle tissue (including the membrane, myofibrils, and innervations), requiring a greater regenerative process. The inflammatory process will be related to the severity of the injury and the amount of dysfunctional scar tissue between each part of the broken myofibrils [Vaittinen et al. , 2002]. The procedure that is commonly used in human muscle laceration is suturing; however, some studies have shown that this measure promotes muscle repair but does not preventing the formation of dense fibrotic scar tissue [Kragh et al., 2005, Menetrey et al., 1999]. Most importantly, the muscle does not regenerate efficiently across the scar tissue; the new myofibers do not cross the fibrous tissue and do not fuse to the remaining tissue, leading to incomplete muscle recovery [Hwang et al., 2006, Menetrey et al., 1999]. Thus, the laceration appears as the best model of mechanical injury which proposes to investigate alternatives to reduce the scar tissue in the muscle due to injury.

4 CONCLUDING REMARKS

- In general, treatments chosen for mechanical muscle injuries are based on the severity and not on the type of injury; nevertheless, there is evidence indicating that there are differences in the regenerative process due to the variability of the injury models;
- Contusion models are mainly used to evaluate the modalities of the treatments of muscle injuries;
- There are basically two models to experimentally replicate contusion injuries: crushing and blunt trauma with no penetration. The last one is the most common model; however, it is necessary to define the mass parameters, such as weight, height, shape, and area.
- Strain models use different forms to replicate the injury process, with the eccentric contraction being the most frequent method.
- Laceration models are mainly used to evaluate modalities of the treatment of muscle fibrosis and are more reproducible than the other injury processes (contusion and strain).

REFERENCES

Aarimaa V, Kaariainen M, Vaittinen S, Tanner J, Jarvinen T, Best T, Kalimo H. Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus. *Neuromuscul Disord*. 2004;14:421-8.

Akimau P, Yoshiya K, Hosotsubo H, Takakuwa T, Tanaka H, Sugimoto H. New experimental model of crush injury of the hindlimbs in rats. *J Trauma*. 2005;58:51-8.

Ali K, Leland JM. Hamstring strains and tears in the athlete. *Clin Sports Med*. 2012;31:263-72.

Almekinders LC. Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies. *Sports Med*. 1999;28:383-8.

Ambrosio F, Ferrari RJ, Distefano G, Plassmeyer JM, Carvell GE, Deasy BM, Boninger ML, Fitzgerald GK, Huard J. The synergistic effect of treadmill running on stem-cell transplantation to heal injured skeletal muscle. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:839-49.

Armfield DR, Kim DH, Towers JD, Bradley JP, Robertson DD. Sports-related muscle injury in the lower extremity. *Clin Sports Med*. 2006;25:803-42.

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204:1057-69.

Banks GB, Combs AC, Chamberlain JR, Chamberlain JS. Molecular and cellular adaptations to chronic myotendinous strain injury in mdx mice expressing a truncated dystrophin. *Hum Mol Genet*. 2008;17:3975-86.

Barr KP. Review of upper and lower extremity musculoskeletal pain problems. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2007;18:747-60, vi-vii.

Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:19-37.

Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem*. 1998;179:135-45.

Beltran L, Ghazikhanian V, Padron M, Beltran J. The proximal hamstring muscle-tendon-bone unit: A review of the normal anatomy, biomechanics, and pathophysiology. *Eur J Radiol*. 2011.

Boppart MD, Burkin DJ, Kaufman SJ. Alpha7beta1-integrin regulates mechanotransduction and prevents skeletal muscle injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C1660-5.

Brickson S, Hollander J, Corr DT, Ji LL, Best TM. Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:2010-5.

Brunelli S, Rovere-Querini P. The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol Res.* 2008;58:117-21.

Burkholder TJ. Mechanotransduction in skeletal muscle. *Front Biosci.* 2007;12:174-91.

Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *J Athl Train.* 2006;41:457-65.

Butterfield TA, Herzog W. Effect of altering starting length and activation timing of muscle on fiber strain and muscle damage. *J Appl Physiol.* 2006a;100:1489-98.

Butterfield TA, Herzog W. The magnitude of muscle strain does not influence serial sarcomere number adaptations following eccentric exercise. *Pflugers Arch.* 2006b;451:688-700.

Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musaro A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev.* 2011;10:35-42.

Carvalho N, Puntel G, Correa P, Gubert P, Amaral G, Morais J, Royes L, da Rocha J, Soares F. Protective effects of therapeutic cold and heat against the oxidative damage induced by a muscle strain injury in rats. *J Sports Sci.* 2010;28:923-35.

Carvalho RLdP, Leal-Junior ECP, Petrellis MC, Marcos RL, Carvalho MHCd, Nucci GD, Lopes-Martins RAB. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) and Diclofenac (Topical and Intramuscular) as Single and Combined Therapy in Experimental Model of Controlled Muscle Strain in Rats. *Photochemistry and Photobiology.* 2013;89:508–12.

Chan YS, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *Am J Sports Med.* 2005;33:43-51.

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

Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, Lafuste P, Chretien F. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev.* 2009;37:18-22.

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003;163:1133-43.

Crisco JJ, Hentel KD, Jackson WO, Goehner K, Jokl P. Maximal contraction lessens impact response in a muscle contusion model. *J Biomech.* 1996;29:1291-6.

Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med.* 1994;22:702-10.

Croisier JL. Factors associated with recurrent hamstring injuries. *Sports Med.* 2004;34:681-95.

Drost MR, Maenhout M, Willems PJ, Oomens CW, Baaijens FP, Hesselink MK. Spatial and temporal heterogeneity of superficial muscle strain during in situ fixed-end contractions. *J Biomech.* 2003;36:1055-63.

Dumke BR, Lees SJ. Age-related impairment of T cell-induced skeletal muscle precursor cell function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;300:C1226-33.

Fan YY, Ye GH, Lin KZ, Yu LS, Wu SZ, Dong MW, Han JG, Feng XP, Li XB. Time-dependent expression and distribution of Egr-1 during skeletal muscle wound healing in rats. *J Mol Histol.* 2013;44:75-81.

Feng X, Li GZ, Wang S. Effects of estrogen on gastrocnemius muscle strain injury and regeneration in female rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25:1489-94.

Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide.* 2011;24:43-9.

Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide.* 2009;21:157-63.

Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *J Orthop Res.* 2003;21:798-804.

Friden J, Lieber RL. Serum creatine kinase level is a poor predictor of muscle function after injury. *Scand J Med Sci Sports.* 2001;11:126-7.

Ghaly A, Marsh DR. Aging-associated oxidative stress modulates the acute inflammatory response in skeletal muscle after contusion injury. *Exp Gerontol.* 2010;45:381-8.

Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 2007;16:857-68.

Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med.* 2009;37:1135-42.

He L, Li G, Feng X, Shi H, Chang D, Ye K, Wang S. Effect of energy compound on skeletal muscle strain injury and regeneration in rats. *Ind Health.* 2008;46:506-12.

Heiderscheit BC, Sherry MA, Silder A, Chumanov ES, Thelen DG. Hamstring strain injuries: recommendations for diagnosis, rehabilitation, and injury prevention. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2010;40:67-81.

Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A:822-32.

Hwang JH, Kim IG, Piao S, Jung AR, Lee JY, Park KD. Combination therapy of human adipose-derived stem cells and basic fibroblast growth factor hydrogel in muscle regeneration. *Biomaterials.* 2013;in press.

Hwang JH, Ra YJ, Lee KM, Lee JY, Ghil SH. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. *Arch Phys Med Rehabil.* 2006;87:20-6.

Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Aarimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007;21:317-31.

Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33:745-64.

Jarvinen TA, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12:155-61.

Kaar JL, Li Y, Blair HC, Asche G, Koepsel RR, Huard J, Russell AJ. Matrix metalloproteinase-1 treatment of muscle fibrosis. *Acta Biomater.* 2008;4:1411-20.

Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10:332-7.

Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Sievanen H, Kalimo H, Jarvinen M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. *J Orthop Res.* 1998;16:197-206.

Kami K, Senba E. In vivo activation of STAT3 signaling in satellite cells and myofibers in regenerating rat skeletal muscles. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:1579-89.

Kary JM. Diagnosis and management of quadriceps strains and contusions. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2010;3:26-31.

Kawiak J, Brzoska E, Grabowska I, Hoser G, Streminska W, Wasilewska D, Machaj EK, Pojda Z, Moraczewski J. Contribution of stem cells to skeletal muscle regeneration. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44:75-9.

Khattak MJ, Ahmad T, Rehman R, Umer M, Hasan SH, Ahmed M. Muscle healing and nerve regeneration in a muscle contusion model in the rat. *J Bone Joint Surg Br.* 2010;92:894-9.

Kragh JF, Jr., Svoboda SJ, Wenke JC, Brooks DE, Bice TG, Walters TJ. The role of epimysium in suturing skeletal muscle lacerations. *J Am Coll Surg.* 2005;200:38-44.

Lefaucheur JP, Sebillé A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscul Disord.* 1995;5:501-9.

Li HY, Zhang QG, Chen JW, Chen SQ, Chen SY. The Fibrotic Role of Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt Pathway in Injured Skeletal Muscle after Acute Contusion. *Int J Sports Med.* 2013.

Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol.* 2004;164:1007-19.

Li Y, Huard J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol.* 2002;161:895-907.

Li ZB, Kollias HD, Wagner KR. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem.* 2008;283:19371-8.

Luo L, Sun Z, Zhang L, Li X, Dong Y, Liu TC. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF-beta1 in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2012.

Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL, Munoz-Canoves P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle.* 2011;1:21.

Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005;86:1304-10.

Marsh DR, Criswell DS, Carson JA, Booth FW. Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats. *J Appl Physiol.* 1997;83:1270-5.

McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ, Devor ST, Merrick MA. Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007;88:936-40.

McBrier NM, Neuberger T, Okita N, Webb A, Sharkey N. Reliability and validity of a novel muscle contusion device. *J Athl Train.* 2009;44:275-8.

McLennan IS. Resident macrophages (ED2- and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres. *Cell Tissue Res.* 1993;272:193-6.

Mehallo CJ, Drezner JA, Bytowski JR. Practical management: nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) use in athletic injuries. *Clin J Sport Med.* 2006;16:170-4.

Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. *Am J Sports Med.* 1999;27:222-9.

Minamoto VB, Bunho SR, Salvini TF. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34:1447-52.

Minamoto VB, Grazziano CR, Salvini TF. Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. *Anat Rec.* 1999;254:281-7.

Monda M, Vicidomini C, Viggiano A, Sampaolo S, Di Iorio G, Viggiano E, De Luca B. Inhibition of prostaglandin synthesis reduces the induction of MyoD expression in rat soleus muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2009;30:139-44.

Nakazato K, Ochi E, Waga T. Dietary apple polyphenols have preventive effects against lengthening contraction-induced muscle injuries. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54:364-72.

Negishi S, Li Y, Usas A, Fu FH, Huard J. The effect of relaxin treatment on skeletal muscle injuries. *Am J Sports Med.* 2005;33:1816-24.

Nozaki M, Li Y, Zhu J, Ambrosio F, Uehara K, Fu FH, Huard J. Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitory effect of suramin on myostatin, a negative regulator of muscle growth. *Am J Sports Med.* 2008;36:2354-62.

Obremsky WT, Seaber AV, Ribbeck BM, Garrett WE, Jr. Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. *Am J Sports Med.* 1994;22:558-61.

Ota S, Uehara K, Nozaki M, Kobayashi T, Terada S, Tobita K, Fu FH, Huard J. Intramuscular transplantation of muscle-derived stem cells accelerates skeletal muscle healing after contusion injury via enhancement of angiogenesis. *Am J Sports Med.* 2011;39:1912-22.

Park JK, Ki MR, Lee EM, Kim AY, You SY, Han SY, Lee EJ, Hong IH, Kwon SH, Kim SJ, Rando TA, Jeong KS. Losartan Improves Adipose Tissue-Derived Stem Cell Niche by Inhibiting Transforming Growth Factor-beta and Fibrosis in Skeletal Muscle Injury. *Cell Transplant.* 2012;21:2407-24.

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;48:403-11.

Pratt SJ, Lawlor MW, Shah SB, Lovering RM. An in vivo rodent model of contraction-induced injury in the quadriceps muscle. *Injury*. 2012;43:788-93.

Pull MR, Ranson C. Eccentric muscle actions: Implications for injury prevention and rehabilitation. *Physical Therapy in Sport*. 2007;8:88-97.

Puntel GO, Carvalho NR, Amaral GP, Lobato LD, Silveira SO, Daubermann MF, Barbosa NV, Rocha JB, Soares FA. Therapeutic cold: An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. *Free Radic Res*. 2011;45:125-38.

Quintero AJ, Wright VJ, Fu FH, Huard J. Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury. *Clin Sports Med*. 2009;28:1-11.

Ramos L, Leal Junior EC, Pallotta RC, Frigo L, Marcos RL, de Carvalho MH, Bjordal JM, Lopes-Martins RA. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in experimental model of strain-induced skeletal muscle injury in rats: effects on functional outcomes. *Photochem Photobiol*. 2012;88:154-60.

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;27:54-9.

Rehorn MR, Blemker SS. The effects of aponeurosis geometry on strain injury susceptibility explored with a 3D muscle model. *J Biomech*. 2010;43:2574-81.

Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Correa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med*. 2006;38:704-13.

Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve*. 2003;28:365-72.

Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am J Pathol*. 2005;167:1105-17.

Shen W, Li Y, Zhu J, Schwendener R, Huard J. Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. *J Cell Physiol*. 2008;214:405-12.

Shu B, Yang Z, Li X, Zhang LQ. Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion. *Cell Biochem Biophys*. 2012;62:329-36.

Silveira PC, 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 Med Biol*. 2010;36:44-50.

Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med*. 2008;38:947-69.

Smith CA, Stauber F, Waters C, Alway SE, Stauber WT. Transforming growth factor-beta following skeletal muscle strain injury in rats. *J Appl Physiol*. 2007;102:755-61.

Song H, Nakazato K, Nakajima H. Effect of increased excursion of the ankle on the severity of acute eccentric contraction-induced strain injury in the gastrocnemius: an in vivo rat study. *Am J Sports Med*. 2004;32:1263-9.

Stauber WT. Factors involved in strain-induced injury in skeletal muscles and outcomes of prolonged exposures. *J Electromyogr Kinesiol*. 2004;14:61-70.

Stauber WT, Knack KK, Miller GR, Grimmatt JG. Fibrosis and intercellular collagen connections from four weeks of muscle strains. *Muscle Nerve*. 1996;19:423-30.

Stauber WT, Willems ME. Prevention of histopathologic changes from 30 repeated stretches of active rat skeletal muscles by long inter-stretch rest times. *Eur J Appl Physiol*. 2002;88:94-9.

Takagi R, Fujita N, Arakawa T, Kawada S, Ishii N, Miki A. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J Appl Physiol*. 2011;110:382-8.

Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *Am J Sports Med*. 1998;26:172-6.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:R345-53.

Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R1173-87.

Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med*. 2003;37:284-6.

Toumi H, F'Guyer S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J Anat*. 2006;208:459-70.

Turner NJ, Badylak JS, Weber DJ, Badylak SF. Biologic Scaffold Remodelling in a Dog Model of Complex Musculoskeletal Injury. *Journal of Surgical Research*. 2012;In press:1-13.

Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, Yamaguchi M, Ogawa R, Matev MM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Tsuchida K, Yamamoto H, Fukada S. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 2011;124:3654-64.

Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H. Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. *Neuromuscul Disord.* 2002;12:584-7.

Wang HV, Chang LW, Brixius K, Wickstrom SA, Montanez E, Thievensen I, Schwander M, Muller U, Bloch W, Mayer U, Fassler R. Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J Cell Biol.* 2008;180:1037-49.

Wang LC, Kernell D. Proximo-distal organization and fibre type regionalization in rat hindlimb muscles. *J Muscle Res Cell Motil.* 2000;21:587-98.

Wang W, Pan H, Murray K, Jefferson BS, Li Y. Matrix metalloproteinase-1 promotes muscle cell migration and differentiation. *Am J Pathol.* 2009;174:541-9.

Ward AR. Electrical stimulation using kilohertz-frequency alternating current. *Phys Ther.* 2009;89:181-90.

Warren GL, Summan M, Gao X, Chapman R, Hulderman T, Simeonova PP. Mechanisms of skeletal muscle injury and repair revealed by gene expression studies in mouse models. *J Physiol.* 2007;582:825-41.

Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med.* 2004;25:73-7.

Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, Stoltenburg-Didinger G, Perka C, Duda GN, Tohtz SV. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma. *Acta Orthop.* 2011;82:102-11.

Yablonka-Reuveni Z, Day K, Vine A, Shefer G. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J Anim Sci.* 2008;86:E207-16.

Zimowska M, Duchesnay A, Dragun P, Oberbek A, Moraczewski J, Martelly I. Immunoneutralization of TGF β 1 Improves Skeletal Muscle Regeneration: Effects on Myoblast Differentiation and Glycosaminoglycan Content. *International Journal of Cell Biology.* 2009.

Table 1 - Contusion injury model

Model	Muscle	Rereferences
Crush	Gastrocnemius	Thorsson et al (1998); Rantanen et al (1999);
	Tibialis anterior	Ghaly and Marsh (2010)
	Extensor digitorum longus	Bassaglia and Gautron (1995); Zimouwska et al (2009); Takagi et al (2011)
	Soleus	Bassaglia and Gautron (1995); Zimouwska et al (2009); Winkler et al (2011)
Blunt non-penetrating impact	Gastrocnemius	Crisco et al (1994); Crisco et al (1996); Kami and Senba (2002); Wilkin et al (2004); Markert et al (2005); Rizzi et al (2006); McBrier et al (2007); McBrier et al (2009); Khattak et al (2010); Silveira et al (2010); Phillipin et al (2011); Puntel et al (2011)
	Tibialis anterior	Minamoto et al (2001); Nozaki et al (2008); Ambrosio et al (2010); Ota et al (2011)
	Uninformed	Fan et al (2013)
	Soleus	Minamoto et al (1999)

Table 2 - Contusion Injury for blunt not penetration impact

Animals	Muscle injured	Mass Weight (g)	Mass Height (cm)	Impact Kinetic energy*(J)	References
Rat Wistar adults	Soleus	204.00	16	0.32	Minamoto et al (1999)
		171.00	102	1.71	Crisco et al (1994)
		171.00	101	1.69	Crisco et al (1996)
	Gastrocnemius	640.00	25	1.59	Kami and Senba (2002)
		171.00	110	1.84	Wilkin et al (2004)
		459.00	18	0.81	Rizzi et al (2006)
		220,00	110	2.37	McBrier et al (2007)
		267.00	40, 50, 60 and 70	1.05, 1.31, 1.57 and 1.83	McBrier et al (2009)
		459.0	18	0.81	Silveira et al (2010)
		100	100	0.98	Fillipin et al (2011)
Tibialis anterior	200.00	37	0.73	Puntel et al (2011)	
Rat Wistar old adults	Gastrocnemius	171.00	100	1.68	Minamoto et al (2001)
Mice	Tibialis anterior	16.2	100	0.16	Markert et al (2005)
					Nozaki et al (2008)
	Gastrocnemius	16.2	100	0.16	Ambrosio et al (2010)
Rat Sprague-Dawley	Gastrocnemius	55.0	135	0.73	Ota et al (2011)
		330	81	2.62	Li et al (2013)
		220	110	2.37	Khattak et al (2010)
		220	110	2.37	Luo et al (2012)
					Shu et al (2012)

*Estimated by calculating the impact kinetic energy (Ek) through the data of weight (m = mass - in kilogram) and height (h = in meters) of the load studies detailed in the papers. $g = \text{gravity force } (9.8 \text{ m/s}^2)$. $Ek = m \cdot g \cdot h$

Table 3 - Laceration injury model

Types of laceration	Animals	Muscle	References
Completely transection	Mice	Gastrocnemius	Sato et al (2003); Pereira et al (2012)
	Sprague-Dawley Rats	Soleus	Kaariainen et al (1998); Vaittinen et al (2002); Aarimaa et al (2004)
Partially transection	Mice	Tibialis anterior	Negishi et al (2005)
		Gastrocnemius	Menetrey et al (1999); Menetrey et al (2000); Li and Huard (2002); Li et al (2004); Shen et al (2005); Kaar et al (2008); Chan et al (2010); Park et al (2012); Hwang et al (2013)
	Sprague-Dawley Rats	Gastrocnemius	Foster et al (2003); Hwang et al (2006); Freitas et al (2007)
	Wistar Rats	Gastrocnemius	Piedade et al (2008)
	Dog	Quadriceps	Turner et al (2012)

CAPÍTULO II

Effect of Phonophoresis on the skin permeation of commercial anti-inflammatory gels:
sodium diclofenac and ketoprofen.

Artigo publicado na revista *Journal in Medicine an Biology*.



● *Original Contribution*

EFFECT OF PHONOPHORESIS ON SKIN PERMEATION OF COMMERCIAL ANTI-INFLAMMATORY GELS: SODIUM DICLOFENAC AND KETOPROFEN

JAQUELINE SOUZA,^{*†} ALIANISE MEIRA,[‡] NADIA MARIA VOLPATO,[‡] PAULO MAYORGA,[‡]
and CARMEM GOTTFRIED^{*}

^{*}Department of Biochemistry, Institute of Health's Basic Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; [†]Faculty of Physiotherapy, Federal University of Pampa, Uruguai, RS, Brazil; and [‡]Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

(Received 18 July 2012; revised 15 February 2013; in final form 16 February 2013)

Abstract—This study evaluated the use of ultrasound in combination with the commercial anti-inflammatory drugs ketoprofen and sodium diclofenac, according to the parameters used in physiotherapy. Ketoprofen and sodium diclofenac were used in the Franz diffusion cell model adapted to an ultrasound transducer in three conditions: no ultrasound, one application of ultrasound and two applications of ultrasound. High-performance liquid chromatography was used to quantify the total amount of drug permeating skin per unit area, as well as flux and latency. The results showed that for ketoprofen, the amount of drug permeating skin and flux increased with two ultrasound applications. Permeation of sodium diclofenac decreased in the presence of ultrasound. Ultrasound parameters and drug properties must be considered in the use of phonophoresis. (E-mail: jaquelinesz@yahoo.com.br) © 2013 World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology.

Key Words: Ultrasound, Phonophoresis, Ketoprofen, Sodium diclofenac, Permeation.

INTRODUCTION

The major limitation when using a transdermal or dermatological medication is passage through the skin surface, in particular the layer known as *stratum corneum*, which is composed of condensed and ordered structures of cells known as keratinocytes. These lie within an intercellular lipid matrix that functions as a protective barrier for the body (Benson 2005; Park et al. 2007; Trommer and Neubert 2006). Different vehicles using liposomes and chemical enhancers and physical penetration methods such as ultrasound have been developed to facilitate drug transport through the skin (Benson 2005; Lavon and Kost 2004; Park et al. 2007; Trommer and Neubert 2006).

Use of ultrasound to facilitate the delivery of transdermal or dermatological drugs is known as phonophoresis and is a scientifically proven clinical practice (Koeke et al. 2005; Silveira et al. 2010; Yang et al. 2005). However, the

results in the literature related to the use of phonophoresis are highly variable and dependent on wave characteristics (frequency, mode, intensity) (Machet and Boucaud 2002).

It is generally accepted that there are at least three ways to promote skin permeation: (1) convection (acoustic streaming and resulting boundary layer reduction) (Brucks et al. 1989; Mitragotri et al. 1996; Simonin 1995); (2) cavitation (Mitragotri et al. 1996; Polat et al. 2011; Tezel and Mitragotri 2003) and (3) thermal effects (Polat et al. 2011; Simonin 1995). The most common cause of skin permeation is acoustic cavitation, defined as the process by which gas bubbles interact at acoustic pressure and oscillate around an equilibrium radius (non-inertial cavitation or stable), eventually leading to their collapse (inertial cavitation or transient) (Dalecki 2004; Polat et al. 2011; Tezel and Mitragotri 2003). The effects of cavitation are inversely related to the frequency and directly related to the intensity of the acoustic wave (Dalecki 2004; Escobar-Chavez et al. 2009; Humphrey 2007; Machet and Boucaud 2002; O'Brien 2007; Somaglino et al. 2011). The literature indicates that cavitation (inertial and non-inertial) can induce the skin to be permeable to the drug being applied (Smith 2007; Sundaram et al. 2003; Tezel et al. 2002). At low ultrasound frequency, it is primarily inertial cavitation that is responsible for the

Address correspondence to: Jaqueline Souza, Postgraduate Program of Biochemistry, Department of Biochemistry, Basic Health Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: jaquelinesz@yahoo.com.br

skin's permeability to drugs (Tang et al. 2002a, 2002b; Tezel et al. 2002), whereas at high frequency, such as 1 MHz, primarily non-inertial cavitation is responsible (O'Brien 2007; Silveira et al. 2010).

The effectiveness of ultrasound in facilitating delivery of several drugs such as corticoids (triamcinolone acetonide), anesthetics (lidocaine), immunosuppressive agents (cyclosporine), hormones (insulin) and anti-inflammatory agents (diclofenac, dimethylsulfoxide) has been investigated (Kim et al. 2007; Liu et al. 2006; Miyatake 2008; Park et al. 2007; Silveira et al. 2010; Yang et al. 2005). Anti-inflammatory drugs promote reversible inhibition of cyclooxygenases 1 and 2, which reduces formation of prostaglandin precursors (inflammatory mediators), but their oral administration causes gastrointestinal side effects such as abdominal pain, ulceration and irritation of the gastric mucosa, rendering these drugs more suitable for transdermal application (Herwadkar et al. 2012; Maestrelli et al. 2006; Rahusen et al. 2004). Because of the need to increase local access to anti-inflammatory drugs, there has been increased interest in studying the transdermal mechanisms influenced by ultrasound.

In the present study, we investigated the effect of ultrasound in facilitating delivery of anti-inflammatory

drugs similar to those used in clinical practice. We used pulsed ultrasound at a frequency of 1 MHz together with the commercial drugs ketoprofen and sodium diclofenac. In addition, in contrast to traditional phonophoresis studies, in which ultrasound is applied immediately after drug application, we used ultrasound at two points: at the time of drug application and 3 h afterward.

METHODS

Chemicals

The two non-steroidal anti-inflammatory drugs sodium diclofenac (gel formulation, 10 mg/g, EMS, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil) and ketoprofen (gel formulation, 25 mg/g, Medley, Campinas, São Paulo, Brazil) were applied with and without ultrasound. Transdermal sodium diclofenac was composed of isopropyl alcohol, cetomacrogol, liquid petrolatum, caprylic capric triglyceride, carbopol, sodium sulfite, diethylamine, methyl paraben, propyl paraben, disodium edentate, quality essence, propylene glycol and purified water. Ketoprofen contained ethyl alcohol, carbomer, essence of Venice, propylene glycol, trolamida and de-ionized water. All chemicals used were of either analytical or pharmaceutical grade. The standard materials sodium diclofenac salt and ketoprofen were obtained from Pharma Nostra (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; imported from origin India/Germany). Acetonitrile and methanol were acquired from Tedia (Fairfield,

CA, USA), and phosphoric acid was from Merck (Darmstadt, Bundesland, Germany).

Sodium diclofenac ($C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$), molecular weight 318.13, is hygroscopic and poorly soluble in water ($\log P$ [partition coefficient] = 4.4, pK_a = 3.78) (Martindale 2009; Su et al. 2003; U.S.P. U.S. Pharmacopeial Convention 2007). Ketoprofen ($C_{16}H_{14}O_3$), molecular weight 254.28, is not hygroscopic, is considered a weak acid, is practically insoluble in water ($\log P$ = 0.97, pK_a = 4.5) and is freely soluble in alcohol (Beetge et al. 2000; Martindale 2009; U.S.P. U.S. Pharmacopeial Convention 2007).

Permeation experiments and ultrasound parameters

Permeation experiments with Franz diffusion cells were carried out using a circulating water bath with magnetic stirring (DIST Indústria Comércio e Serviços, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil); porcine ear skin was used as a membrane, as previously described (Garcia et al. 2006; Argemi et al. 2011), with modifications to adapt the ultrasound transducer. This model is a common method used to evaluate skin permeation *in vitro* (Argemi et al. 2011). Pig ears were donated by a local slaughterhouse (Pig Production Cooperative of Superior

Caí, Harmonia, Rio Grande do Sul, Brazil) and cleaned under cold running water; the hair, subcutaneous fat tissue and whole skin membranes were removed from the underlying cartilage within 48 h of death. The membranes were stored wrapped in aluminum foil at -20°C until further use, but for no longer than 3 mo. On the day of experiments, skins were stored at room temperature and were then mounted on the glass Franz diffusion cell, which consists of a donor chamber and a receptor chamber, as illustrated in Figure 1. The skin membranes were mounted with the stratum corneum toward the donor chamber, leaving an available diffusion area of 1.75 cm^2 . The two cell compartments were held

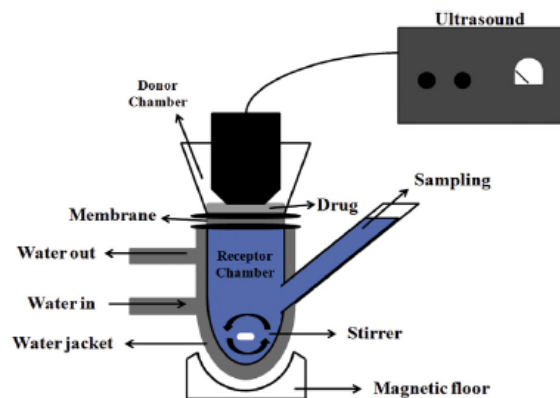


Fig. 1. Schematic of the diffusion cell.

together with a clamp. The receptor chamber had a volume of 10 mL and was filled with the receptor solution specific to the drug: phosphate buffer, pH 6.5, for sodium diclofenac and phosphate buffer, pH 2.5, for ketoprofen. The fluid in the receiver chamber was maintained at 32°C by circulating water and continuously stirred at 650 rpm using a floor magnetic stirrer.

At time zero, 1 mL of the gel (diclofenac or ketoprofen) was applied to the donor compartment with a syringe. The ultrasound transducer was coupled to the donor chamber after drug application. Receptor solution samples, 1.0-mL aliquots, were withdrawn through the sampling port of the receptor chamber at specific intervals (3, 4, 5 and 6 h), filtered through a membrane filter (MF-Milipore membrane, 0.45 μm , 13 mm in diameter; purchased from Millex, Billerica, MA, USA), poured into vials and analyzed immediately by high-performance liquid chromatography (HPLC). The cells were refilled with receptor solution to keep the volume constant during the experiment (Caon *et al.* 2010). The Sonopulse ultrasound generator, which was supplied by Ibramed (Amparo, São Paulo, Brazil) with its transducer (frontal surface area of 1 cm^2), was turned on for 15 min. The manufacturer recommends 1 min/cm^2 area without exceeding 15 min.

Ultrasound was employed in the pulsed mode (50%

at a frequency of 1 MHz and 0.8 W/cm^2 , as previously described (Meidan *et al.* 1998; Signori *et al.* 2011), at a distance of approximately 2 mm from the skin (Machet *et al.* 1998).

To determine the specificity of the experimental tests in excluding endogenous components of the skin, secondary analyses were performed by measuring a blank skin sample in each independent experiment. The retention times of compounds in the matrix were compared with the values obtained for diclofenac and ketoprofen.

There were four groups of tests: (1) no ultrasound or passive group; (2) ultrasound at the time of drug application (time zero); (3) two ultrasound applications, at the time of drug application (time zero) and 3 h afterward; (4) ultrasound 3 h after drug application. The second ultrasound application was chosen in accordance with the initial steady state (start of the flux) described previously in the permeation kinetics of the drugs (Klimes *et al.* 2001; Ceschel *et al.* 2002). Each group of tests was performed in six independent cells.

HPLC analysis

Data were acquired on a computer with integrated software (Class VP, Shimadzu, Japan) connected to a high-performance liquid chromatograph (Class VP, Shimadzu, Japan) with a standard auto sampler SIL-10ADVP and a diode array detector SPD-10AUP), which was used to quantify the drugs in the prepared samples. In the HPLC analysis of both diclofenac and ke-

toprofen, a reversed-phase C_{18} column (250 \times 4.6 mm i.d., 5- μm particle size; Thermo Scientific) was used with a Shim pack G-ODS C_{18} guard column (4.0 mm i.d., 10 mm long, 5- μm particle size; Shimadzu). The mobile phase for analysis of diclofenac consisted of a mixture of phosphate buffer (0.01 M) and methanol in the ratio 30:70 (v/v) at pH 6.5; the flow rate was 1.1 mL/min with each 20 μL sample injected into the column in duplicate. The eluant was monitored with a wavelength of 240 nm; the retention time was 5 min (Klimes *et al.* 2001; Gaudiano *et al.* 2003). For analysis of ketoprofen, a previously described method was used (de Jalon *et al.* 2000; U.S.P. U.S. Pharmacopeial Convention 2007) with few modifications. In summary, the mobile phase consisted of a mixture of phosphate buffer (0.01 M) and acetonitrile in the ratio 35:65 (v/v) at pH 2.5, with the same flow rate used for diclofenac. The wavelength used was 260 nm, and the retention time was 7.3 min.

Determination of permeation parameters

Three concentrations of diclofenac and ketoprofen (5, 10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used in the calibration curves obtained by square linear regression analysis. The parameters evaluated were: total amount of drug permeating the skin per unit area ($\mu\text{g cm}^{-2}$) versus time (h), flux and

latency. Flux (J) through the skin ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) was obtained at steady state from the linear portion of the curve for amount of drug permeating skin per unit area versus time (Ceschel *et al.* 2002; El-Kattan *et al.* 2000). Latency, T_{lag} (h), was calculated by extrapolating the steady state from the linear portion with the axis of abscissa, which represents the time required for the drug that initially diffused through the skin to reach steady-state flux (Ceschel *et al.* 2002; El-Kattan *et al.* 2000).

Statistics

Data were analyzed using SPSS 18.0 software for Windows. The values are reported as a means (standard errors) ($n = 6$). Drug permeation of the skin was analyzed with a repeated-measures analysis of variance followed by the Student–Newman–Keuls *post hoc* test. To evaluate differences in flow and latency measures between groups, one-way ANOVA was used followed by the Student–Newman–Keuls *post hoc* test. Interaction analysis or synergism analysis (by two-way ANOVA) was used to evaluate the effect of ultrasound treatment on the biological response (Slinker 1998). Results were considered statistically different at $p < 0.05$.

RESULTS

Figure 2 shows the influence of ultrasound on *in vitro* percutaneous delivery of ketoprofen. There was a statistically significant difference with respect to time

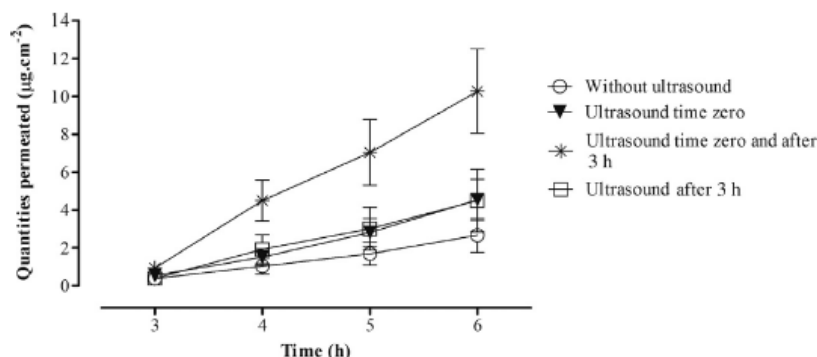


Fig. 2. Effect of ultrasound on ketoprofen permeation. Group 1: no ultrasound; group 2: ultrasound at time zero (time of drug application); group 3: ultrasound at time zero and at 3 h; group 4: ultrasound at 3 h.

and group ($F[9,60] = 4.63, p = 0.0001$), both influencing the amount of drug that permeated the skin. Analysis of differences between groups revealed a significant ($p < 0.05$) increase in permeation of ketoprofen in group 3 (ultrasound applied at time zero and 3 h afterward) in the samples collected at 4 h ($F[3,20] = 4.46, p = 0.015$), 5 h ($F[3,20] = 4.24, p = 0.018$) and 6 h ($F[3,20] = 4.51, p = 0.014$). No differences were observed between groups 1 and 2.

The next question was whether the ultrasound

applied at 3 h could be responsible for the increase in drug permeation observed in group 3. To answer this question, results for a fourth group (a single ultrasound application at 3 h) were compared with results for other groups. There was no increase in the amount of drug that permeated in group 4 as compared with groups 1 (no ultrasound) and 2 (single application at time zero).

Synergism analysis of the effects of the ketoprofen–ultrasound interaction in groups 2–4 revealed that there was no effect (Slinker 1998) ($F[1,20] = 1.568, p = 0.225$), indicating that the amount of drug that permeated after two ultrasound applications (group 3) was equivalent to the amount that permeated in groups 2 and 4 (single application of ultrasound).

As shown in Table 1, only group 3 showed a significant difference in ketoprofen flux ($F[3,20] = 4.30, p = 0.017$) when compared with the other groups. The rate at which ketoprofen permeated skin increased through

Table 1. Flux and latency of ketoprofen permeation

Group	Flux ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)*	Latency (h)*
1. No ultrasound	0.81 (0.25)	2.9 (0.39)
2. Ultrasound at time zero	1.52 (0.35)	3.07 (0.16)
3. Ultrasound at time zero and 3 h afterward	2.88 (0.57) [†]	2.52 (0.10)
4. Ultrasound 3 h after drug application	1.29 (0.47)	2.58 (0.19)

* Mean (standard error of mean).

[†] Statistically significant difference between groups.

both applications of ultrasound; that is, ketoprofen flux in group 3 was 3.5 times greater than that in group 1.

Latency did not differ between groups ($F[3,20] = 1.19, p = 0.339$), indicating that ultrasound had no effect on ketoprofen latency once the diffusion of the drug had reached the steady state.

Within groups, the amounts of drug delivered with time did not differ after application of ultrasound ($F[6,45] = 0.363, p = 0.898$). However, there were significant ($F[2,15] = 10.32, p = 0.002$) differences between

group 1 (no ultrasound) and groups 2–4 (one and two applications of ultrasound). In groups 2–4, the amounts of drug that permeated skin were decreased at 3 h ($F[2,15] = 16.795, p = 0.0001$), 4 h ($F[2,15] = 8.187, p = 0.004$), and 5 h ($F[2,15] = 6.902, p = 0.007$) when compared with group 1. However, at 6 h ($F[2,15] = 2.128, p = 0.1540$), there were no significant differences among the groups (Fig. 3).

Table 2 summarizes flux and latency results for sodium diclofenac. Ultrasound influenced neither flux nor latency for sodium diclofenac.

DISCUSSION

In the present study, ultrasound was applied at two different times with the aim of improving drug permeation. No significant difference was observed in drug permeation between ketoprofen groups 1 (without ultrasound) and 2 (ultrasound at time zero), over the course of the test (3–6 h), indicating that ultrasound did not improve permeation of the drug through the skin. These results differ from those of another study in which phonophoresis was reported to increase transdermal permeation of ketoprofen (Herwadkar et al. 2012). There are two important methodological differences between that study and our work that may explain the opposite effects observed. First, Herwadkar et al. (2011) used low-frequency ultrasound (~20 kHz), which is better in facilitating drug skin permeation through skin than

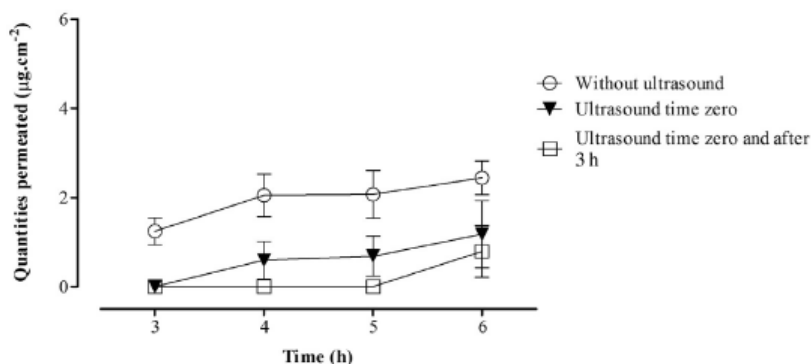


Fig. 3. Effect of ultrasound on sodium diclofenac permeation. Group 1: no ultrasound; group 2: ultrasound at time zero (time of drug application); group 3: ultrasound at time zero and at 3 h.

high-frequency ultrasound (Mitragotri *et al.* 1996; Tezel and Mitragotri 2003; ter Haar 2007; Ogura *et al.* 2008). Second, Herwadkar *et al.* used rat skin, which is more permeable than pig skin (Yamashita *et al.* 1997; Schmook *et al.* 2001). Porcine skin is regarded as a good model for permeation studies because of its similarities to human skin (Schmook *et al.* 2001; Barbero and Frasch 2009).

Two applications of ultrasound (group 3) signifi-

cantly increased ketoprofen permeation over the time course (at 4, 5 and 6 h) compared with no ultrasound (group 1) or one application (group 2). It is well known that the most common route for drug permeation through trans-epidermal skin is the inter-cellular route, within the lipid domain, where the permeate overcomes the stratum corneum, bypassing the corneocytes (Benson 2005; Trommer and Neubert 2006; Yamashita and Hashida 2003). In this way, the reapplication of ultrasound at 3 h could facilitate passage of ketoprofen through the inter-cellular route when the drug reaches the steady state. This increases the lipid matrix, interaction and disorder (Lavon and Kost 2004), facilitating the diffusion of hydrophilic drugs (partition coefficient near zero) such as ketoprofen (Beetge *et al.* 2000). Interestingly, comparison of ketoprofen permeation in group 4 (a single ultrasound application 3 h after drug application, during steady state) with that in group 2 (a single ultrasound application at time zero) reveals no significant difference.

Table 2. Flux and latency of sodium diclofenac permeation

Group	Flux ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)*	Latency (h)*
1. No ultrasound (1)	0.21 (0.51)	9.62 (9.88)
2. Ultrasound at time zero	0.29 (1.02)	4.33 (5.31)
3. Ultrasound at time zero and 3 h afterward	0.40 (0.71)	1.44 (2.24)

* Mean (standard error mean).

These data indicate that the steady state of the drug (reached at 3 h) is not fundamental to facilitation of drug permeation with a single ultrasound application. However, permeation was higher in group 3 (two ultrasound applications) than in groups 2 and 4, suggesting that reapplication of ultrasound is necessary to improve drug permeation. Synergism analysis showed that there was no effect of interaction, indicating that the amount of drug that permeated after two ultrasound applications

(group 3) was equivalent to the sum of the amounts for groups 2 and 4 (single application of ultrasound).

A possible explanation for the better results after two ultrasound applications is the effect of ultrasound on the skin, that is, non-inertial cavitation (Mitragotri *et al.* 1997; O'Brien 2007; Silveira *et al.* 2010) and its thermal effects (Machet *et al.* 1998; Smith 2007). Our hypothesis is that these effects occur during ultrasound application and decrease or cease as the application ends. The influence of temperature and cavitation was not the focus of the present study and deserves further investigation. In agreement with our work, a study investigating the effect of ultrasound (1 MHz, continuous) on permeation of human skin by ibuprofen applied during two 30-min periods over the course of 7 h reported that ultrasound increased flux when it was applied (Brucks *et al.* 1989). These data indicate that the influence of ultrasound on drug permeation is dependent on the number of ultrasound exposures.

Ketoprofen flux in group 3 (two ultrasound applications) also significantly differed from that in the other groups, indicating that permeation is enhanced after more than one ultrasound application. According to the literature (Lavon and Kost 2004), ultrasound operates similarly to some chemical transdermal enhancers, which act by disordering lipids, increasing the amount of drug entering the skin and thereby increasing permeation. In a study in which ultrasound (800 kHz) was applied to cellulose membranes, two applications were performed

(at the time of drug application and 1 h afterward); the drugs tested were ibuprofen, piroxicam and sodium diclofenac. There was an increase in drug flux at the time of ultrasound application but not during the ultrasound pause (Meshali et al. 2008), in agreement with the aforementioned hypothesis that reapplication of ultrasound might influence the amount and flux of ketoprofen permeation.

Neither one nor two ultrasound applications influenced the latency to ketoprofen permeation taken for steady state. According to the literature, latency is dependent on skin composition; drug properties, particularly drug diffusion coefficients and vehicle (Meidan et al. 1998; Barbero and Frasc 2009). A theoretical and experimental analysis of the effects of ultrasound (1 MHz) on the diffusion coefficients of different solutes permeating human skin revealed a significant increase (improvement) in latency to solute permeation (Mitragotri 2001). The diffusion coefficient of a solute represents the degree to which a solute diffuses in a certain medium, which is also related to physicochemical characteristics such as mass of the solute (drug or vehicle), viscosity, pressure and temperature (Pellanda 2006). Mitragotri's (2001) hypothesized influence of ultrasound on drug diffusion coefficients and, consequently, latency may be due to

the increasing temperature promoted by ultrasound, as he used a continuous wave of 2 W/cm², which promotes a significant increase in local skin temperature (Meidan et al. 1998; Meshali et al. 2008). A study in which the effect of ultrasound (continuous, 1 MHz, 1.5 W/cm², in 20 min) on three different drugs was evaluated using a cooling thermostat to suppress the thermal effect on rat and human skin showed no differences in drug permeation, indicating, in this case, that the main effect on skin of ultrasound-enhanced drug delivery is heating (Machet et al. 1998). Unlike these studies, we did not observe differences in latency between the groups. This may be related to the ultrasound parameters we chose; we used pulsed ultrasound at 0.8 W/cm² over 15 min, which promoted less heating than continuous wave ultrasound (Cambier et al. 2001).

The amounts of sodium diclofenac permeation differed significantly between the groups in which ultrasound was applied (groups 2 and 3) and the no ultrasound group (group 1) at 3, 4 and 5 h. However, by 6 h, no differences were observed. Ultrasound appeared to hamper or delay drug permeation. In addition, flux and latency did not differ among the groups. This is not in agreement with previously obtained results for ultrasound-enhanced sodium diclofenac permeation of rabbit skin and cellulose membranes (Meshali et al. 2008). The latter authors found that ultrasound application increased the permeation of this anti-inflammatory drug. Another study also showed that ultrasound improved human transdermal

permeation of sodium diclofenac (Rosim et al. 2005). However, Meshali et al. (2008) employed low-frequency ultrasound, which promoted an increase in permeation, as mentioned previously, and both Rosim et al. (2005) and Meshali et al. (2008) used ultrasound in the continuous mode, which has more thermal effects than the pulsed mode (Cambier et al. 2001) used in our study. An important aspect to consider is the fact that the thermal effect enhances the heating of the medium, which increases skin permeability, probably through an increased diffusion coefficient in the lipid bilayer (Lavon and Kost 2004; Mitragotri 2001; Polat et al. 2011), and this may have favored the aforementioned studies. When ultrasound is used in the pulsed mode, the thermal effect is reduced or absent (Cambier et al. 2001; Johns 2002), and in turn, the most important effects of ultrasound may be non-inertial cavitation and acoustic streaming (Polat et al. 2011; Tezel and Mitragotri 2003). As in our study, we did not observe differences in diclofenac permeation. These effects do not seem to be relevant in this case.

Another possible explanation for the lower permeability of sodium diclofenac is its lower pK_a (3.78), which favors presence of higher quantities of the drug in the ionized form in the skin (Meshali et al. 2008). This may

decrease the drug's capacity to permeate the skin and, consequently, decrease its concentration in the receptor chamber. In a recent study using pulsed ultrasound to facilitate delivery of sodium diclofenac-loaded alginate microcapsules, improvement in drug permeation was observed (Wang et al. 2012). This kind of microcapsule might be a possible option for ultrasound-enhanced delivery of sodium diclofenac.

Differences in permeation of ketoprofen and sodium diclofenac after phonophoresis should be related to the physicochemical properties of the drugs and/or compounds in their formulations and do not reflect a problem in the efficacy of phonophoresis (Kaushik et al. 2010; Mitragotri et al. 1997). The drug properties important in transdermal delivery are molecular mass, pK and partition coefficient (Beetge et al. 2000). According to the literature, the partition coefficient is the best predictor of skin permeation (Beetge et al. 2000; Benson 2005; Mitragotri et al. 1997). As the pK_a values of ketoprofen (4.5) and sodium diclofenac (3.78) are similar, pK_a should not have influenced the results in our study. However, ketoprofen has a physicochemical advantage over sodium diclofenac, because it has a better partition coefficient. $\log P$ is the lipophilicity/hydrophilicity ratio of a substance in an octanol/buffer system. For ketoprofen, $\log P = 0.97$, and for sodium diclofenac, $\log P = 4.4$, and drugs with $\log P$ values ≤ 2 are considered better candidates for transdermal delivery (Beetge et al. 2000). The effect of ultrasound on the partition and diffusion

coefficients in the stratum corneum was evaluated in a previous study that showed that the primary effect was on the diffusion coefficient and not on the partition coefficient (Mitragotri 2001). From this, drug permeation through skin (especially stratum corneum) in association with ultrasound (phonophoresis) is related to the intrinsic properties of the drugs and their formulations (physico-chemical properties), as well as the effects of ultrasound on skin and on the properties of the chosen drug.

CONCLUSIONS

Transdermal delivery of anti-inflammatory drugs is a potential alternative to oral delivery that helps to avoid gastrointestinal side effects. Phonophoresis is a physical option for increasing permeation and thereby facilitating transdermal drug delivery, as was shown in this study, in the enhancement of ketoprofen permeation with two applications of ultrasound. The results for phonophoresis obtained in this study differed between ketoprofen and sodium diclofenac; this may be related to the different properties of the drugs tested, such as partition coefficient, and to the effects of ultrasound parameters on skin and drug permeability.

Acknowledgments—This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and INCT-EN National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection. The authors thank the Cooperative of Superior Caí, RS, Brazil, for donating pig ears.

REFERENCES

- Argemi A, Domingo C, de Sousa AR, Duarte CM, Garcia-Gonzalez CA, Saurina J. Characterization of new topical ketoprofen formulations prepared by drug entrapment in solid lipid matrices. *J Pharm Sci* 2011;100:4783–4789.
- Barbero AM, Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicol In Vitro* 2009;23:1–13.
- Beetge E, du Plessis J, Muller DG, Goosen C, van Rensburg FJ. The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAIDs on their transdermal absorption. *Int J Pharm* 2000;193:261–264.
- Benson HA. Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv* 2005;2:23–33.
- Brucks R, Nanavaty M, Jung D, Siegel F. The effect of ultrasound on the in vitro penetration of ibuprofen through human epidermis. *Pharm Res* 1989;6:697–701.
- Cambier D, D'Herde K, Witvrouw E, Beck M, Soenens S, Vanderstraeten G. Therapeutic ultrasound: Temperature increase at different depths by different modes in a human cadaver. *J Rehabil Med* 2001;33:212–215.
- Caon T, Costa AC, de Oliveira MA, Mücke GA, Simoes CM. Evaluation of the transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. *Int J Pharm* 2010;391:1–6.
- Ceschel GC, Maffei P, Lombardi Borgia S. Correlation between the transdermal permeation of ketoprofen and its solubility in mixtures of a pH 6.5 phosphate buffer and various solvents. *Drug Deliv* 2002;9:39–45.
- Dalecki D. Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng* 2004;6:229–248.
- De Jalon EG, Josa M, Campanero MA, Santoyo S, Ygartua P. Determination by high-performance liquid chromatography of ketoprofen in vitro in rat skin permeation samples. *J Chromatogr A* 2000;870:143–149.
- El-Kattan AF, Asbill CS, Kim N, Michniak BB. Effect of formulation variables on the percutaneous permeation of ketoprofen from gel formulations. *Drug Deliv* 2000;7:147–153.
- Escobar-Chavez JJ, Bonilla-Martinez D, Villegas-Gonzalez MA, Rodriguez-Cruz IM, Dominguez-Delgado CL. The use of sonophoresis in the administration of drugs throughout the skin. *J Pharm Pharm Sci* 2009;12:88–115.
- Garcia MT, da Silva CH, de Oliveira DC, Braga EC, Thomazini JA, Bentley MV. Transdermal delivery of ketoprofen: The influence of drug–diolethylphosphatidylcholine interactions. *Pharm Res* 2006;23:1776–1785.
- Gaudiano MC, Valvo L, Bertocchi P, Manna L. RP-HPLC study of the degradation of diclofenac and piroxicam in the presence of hydroxyl radicals. *J Pharm Biomed Anal* 2003;32:151–158.
- Herwadkar A, Sachdeva V, Taylor LF, Silver H, Banga AK. Low frequency sonophoresis mediated transdermal and intradermal delivery of ketoprofen. *Int J Pharm* 2012;423:289–296.
- Humphrey VF. Ultrasound and matter: Physical interactions. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;93:195–211.
- Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. *J Athl Train* 2002;37:293–299.
- Kaushik D, Costache A, Michniak-Kohn B. Percutaneous penetration modifiers and formulation effects. *Int J Pharm* 2010;386:42–51.
- Kim TY, Jung DI, Kim YI, Yang JH, Shin SC. Anesthetic effects of lidocaine hydrochloride gel using low frequency ultrasound of 0.5 MHz. *J Pharm Pharm Sci* 2007;10:1–8.
- Klimes J, Sochor J, Dolezal P, Korner J. HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations. *Int J Pharm* 2001;217:153–160.
- Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Salate AC. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound Med Biol* 2005;31:345–350.
- Lavon I, Kost J. Ultrasound and transdermal drug delivery. *Drug Discov Today* 2004;9:670–676.
- Liu H, Li S, Pan W, Wang Y, Han F, Yao H. Investigation into the potential of low-frequency ultrasound facilitated topical delivery of cyclosporin A. *Int J Pharm* 2006;326:32–38.
- Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: Efficiency, mechanisms and skin tolerance. *Int J Pharm* 2002;243:1–15.
- Machet L, Cochelin N, Patat F, Arbeille B, Machet MC, Lorette G, Vaillant L. In vitro phonophoresis of mannitol, oestradiol and hydrocortisone across human and hairless mouse skin. *Int J Pharm* 1998;165:169–174.
- Maestrelli F, Gonzalez-Rodriguez ML, Rabasco AM, Mura P. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *Int J Pharm* 2006;312:53–60.
- Martindale W. *Martindale: The complete drug reference*. London: Pharmaceutical Press; 2009.
- Meidan VM, Docker MF, Walmsley AD, Irwin WJ. Phonophoresis of hydrocortisone with enhancers: An acoustically defined model. *Int J Pharm* 1998;170:157–168.
- Meshali MM, Abdel-Aleem HM, Sakr FM, Nazzal S, El-Malah Y. In vitro phonophoresis: Effect of ultrasound intensity and mode at high frequency on NSAIDs transport across cellulose and rabbit skin membranes. *Pharmazie* 2008;63:49–53.
- Mitragotri S. Effect of therapeutic ultrasound on partition and diffusion coefficients in human stratum corneum. *J Control Release* 2001;71:23–29.
- Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharm Res* 1996;13:411–420.
- Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. An explanation for the variation of the sonophoretic transdermal transport enhancement from drug to drug. *J Pharm Sci* 1997;86:1190–1192.
- Miyatake SI. H.; Kondo, E.; Yasuda, K. Randomized clinical comparisons of diclofenac concentration in the soft tissues and blood plasma between topical and oral applications. *Br J Clin Pharmacol* 2008;67:125–129.

- O'Brien WD Jr. Ultrasound–biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;93:212–255.
- Ogura M, Paliwal S, Mitragotri S. Low-frequency sonophoresis: Current status and future prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1218–1223.
- Park EJ, Werner J, Smith NB. Ultrasound mediated transdermal insulin delivery in pigs using a lightweight transducer. *Pharm Res* 2007;24:1396–1401.
- Pellanda CL. Topical bioavailability of glucocorticosteroids: Dermatopharmacokinetic and dermatopharmacodynamic of topically applied triamcinolone acetonide in humans. Thesis, University of Basel; 2006:185.
- Polat BE, Hart D, Langer R, Blankschtein D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: mechanisms, scope, and emerging trends. *J Control Release* 2011;152:330–348.
- Rahusen FT, Weinhold PS, Almekinders LC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury. *Am J Sports Med* 2004;32:1856–1859.
- Rosim GC, Barbieri CH, Lancas FM, Mazzer N. Diclofenac phonophoresis in human volunteers. *Ultrasound Med Biol* 2005;31:337–343.
- Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm* 2001;215:51–56.
- Signori LU, Costa ST, Neto AF, Pizzolotto RM, Beck C, Sbruzzi G, Silva AM, Plentz RD. Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. *Physiotherapy* 2011;97:163–169.
- Silveira PC, 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 Med Biol* 2010;36:44–50.
- Simonin JP. On the mechanisms of in vitro and in vivo phonophoresis. *Jo Control Release* 1995;33:125–141.
- Slinker BK. The statistics of synergism. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:723–731.
- Smith NB. Perspectives on transdermal ultrasound mediated drug delivery. *Int J Nanomed* 2007;2:585–594.
- Somaglino L, Bouchoux G, Mestas JL, Lafon C. Validation of an acoustic cavitation dose with hydroxyl radical production generated by inertial cavitation in pulsed mode: Application to in vitro drug release from liposomes. *Ultrason Sonochem* 2011;18:577–588.
- Su SF, Chou CH, Kung CF, Huang JD. In vitro and in vivo comparison of two diclofenac sodium sustained release oral formulations. *Int J Pharm* 2003;260:39–46.
- Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophys J* 2003;84:3087–3101.
- Tang H, Blankschtein D, Langer R. Effects of low-frequency ultrasound on the transdermal permeation of mannitol: Comparative studies with in vivo and in vitro skin. *J Pharm Sci* 2002a;91:1776–1794.
- Tang H, Wang CC, Blankschtein D, Langer R. An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasound-mediated transdermal drug transport. *Pharm Res* 2002b;19:1160–1169.
- Ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;93:111–129.
- Tezel A, Mitragotri S. Interactions of inertial cavitation bubbles with stratum corneum lipid bilayers during low-frequency sonophoresis. *Biophys J* 2003;85:3502–3512.
- Tezel A, Sens A, Mitragotri S. Investigations of the role of cavitation in low-frequency sonophoresis using acoustic spectroscopy. *J Pharm Sci* 2002;91:444–453.
- Trommer H, Neubert RH. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* 2006;19:106–121.
- U.S.P. U.S. Pharmacopeial Convention. USP 30–NF 25. U.S. Pharmacopeial Convention; 2007. 2439 Available at: <http://www.usp.org>.
- Wang CY, Yang CH, Lin YS, Chen CH, Huang KS. Anti-inflammatory effect with high intensity focused ultrasound-mediated pulsatile delivery of diclofenac. *Biomaterials* 2012;33:1547–1553.
- Yamashita F, Hashida M. Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1185–1199.
- Yamashita N, Tachibana K, Ogawa K, Tsujita N, Tomita A. Scanning electron microscopic evaluation of the skin surface after ultrasound exposure. *Anat Rec* 1997;247:455–461.
- Yang JH, Kim DK, Kim TY, Kim GY, Shin SC. Anti-inflammatory effects by transdermal application of triamcinolone acetonide gel using phonophoresis in rats. *Int J Pharm* 2005;302:39–46.

CAPÍTULO III

Muscle contusion: effect of ultrasound and phonophoresis

Artigo em preparação.

Observação: A parte introdutória referente a este artigo em preparação encontra-se na “Introdução” desta tese (pag. 6 - 21) e a discussão deste artigo encontra-se na secção “Discussão” (pag. 85 - 101) desta tese.

Muscle contusion: effect of Ultrasound and Phonophoresis.

Jaqueline de Souza^{1,2}; Núbia Broetto Cunha¹; Carlos Eduardo Schnorr¹; Caren Luciane Bernardi¹; Caroline Zanotto¹; Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete¹; Ana Carolina Tramontina¹; José Cláudio Fonseca Moreira¹; Carlos Alberto Gonçalves¹; Rodrigo Rodrigues de Barros³; Herbert Martins Gomes³; Carmem Gottfried¹

¹Department of Biochemistry, Institute of Health's Basic Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

²Faculty of Physiotherapy, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil;

³Department of Mechanical Engineering, Applied Mechanics Group Laboratory, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

***CORRESPONDENCE ADDRESS:**

MsC. Jaqueline de Souza

Postgraduate Program of Biochemistry

Department of Biochemistry

Basic Health Sciences Institute

Federal University of Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo

90035 -003 - Porto Alegre, RS - BRAZIL

Fax: +55 51 3308 5540 Phone: +55 51 3308 5551

E-mail: jaquelinesz@yahoo.com.br

Since previous studies in animal models and randomized clinical trials have shown differences in the effect of ultrasound and its combination with topical medications (phonophoresis) on muscle regeneration, both therapeutic modalities require further investigation. The present study investigated the effect of ultrasound and phonophoresis (with nonsteroidal anti-inflammatory) on acute inflammatory process of muscle contusion.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental groups

Adult male Wistar rats (330 to 395 g) were used in this study. The animals kept in cages with four rats, in a room with control cycle of 12 h light/dark and temperature around 22°C. The rats had free access of food and water. The present study was approved (number: 2008190) by Committee on Care and Use of Experimental Animal of Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

The animals were randomly distributed in five groups (n = 5): control (uninjured and no treatment), injured (no treatment), ketoprofen (injured and treated with topic Ketoprofen), ultrasound (injured and treated with ultrasound) and phonophoresis (injured and treated with ketoprofen and ultrasound).

To aim validate the contusion muscle injury, two groups (control and injured; n = 5) was performed and sacrificed 24h, after the injury. These animals were not subjected to any treatment.

Muscle Injury

The animals of all the groups were previously anesthetized with ketamine and xylazine (75 and 10 mg/Kg, i.p.) and the pelage removed of hind limb through trichotomy.

A contusion model (Crisco et al., 1996, McBrier et al., 2009) was used to cause injury in gastrocnemius muscle belly with a single impact blunt trauma of both hind limbs. This contusion model consists in a metallic mass (500 g, cylinder shape with 3cm diameter) that fall through a

vertical guide tube 30 cm from the base, with kinetic energy to 1.47 J, in the posterior region of the hind limb over of gastrocnemius muscle. The animals were placed in a prone position on the apparatus injury, with the hind limb extended and ankle in plantar flexion.

Therapeutic treatment

The treatment was applied three times, only in the acute phase, starting three hours after the contusion, after 24 hour and 48 hours.

The treatment of ultrasound and phonophoresis groups was applied with pulsed ultrasound (1MHz, effective radiating area [ERA] 1cm², 50% duty cycle, 0.8W/cm²) (Silveira et al., 2010b) (Sonopulse, Ibramed – Amparo, São Paulo, Brazil) during four minutes, with circular movement of the transducer on the skin. The first group used 1g of conductive gel [*Mercur*, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil (composition: TEA, PPG, vinyl polymer and preservative)], and the phonophoresis group used 1g topic ketoprofen gel (25 mg/g, *Medley*, Campinas, São Paulo, Brazil) to apply the ultrasound.

For the application of medicament on ketoprofen group was used the transducer ultrasound off, with the same duration of the other groups. After the treatment, both hind limb were cleaned with water and dried to avoid animal's ingestion of gel. The controls and injured groups were handled by similar to the treated groups.

Sacrifice and Tissue preparation

After 72 hours of muscle contusion, the animals were anesthetized, blood sample was obtained through cardiac puncture and the gastrocnemius was surgically removed and divided into proximal and distal portion. The distal portion was immediately aliquoted, frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C. The proximal portion was included in resin (Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound) frozen and stored at -80°C. The animals were killed by decapitation.

The blood samples were centrifuged (3000 RPM for 10 min) and plasma aliquots were stored at -20°C for posterior creatine kinase activity measurement.

Biochemical Analysis

Enzyme activity Creatine Kinase (CK)

Measurement enzyme activity CK in the plasma has been used as index of the damage caused by skeletal muscle trauma (Friden and Lieber, 2001, Brancaccio et al., 2007, Puntel et al., 2011, Shu et al., 2012). CK activity was determined spectrophotometrically in plasma samples, using diagnostic kits (CK-NAC, ref BT 1100200, *Biotécnica*, Varginha, Minas Gerais, Brazil).

Redox profile in muscle

Muscle samples were homogenized in KPB (potassium phosphate buffer 50 mM, pH 7.4) with an electrical homogenizer. After, the homogenates were centrifuged at 4°C for 10 min at 3000 rpm to remove cellular debris. The supernatants were collected and used for biochemical assays: activity antioxidant enzymes Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT), total reactive antioxidant potential (TRAP), total antioxidant reactivity (TAR), lipid peroxidation (Thiobarbituric acid reactive substances [TBARS]) and protein carbonyl content. All the results were normalized by protein content (Lowry et al., 1951) using bovine serum albumin as standard.

Lipid Peroxidation - Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels

TBARS method was used to determine the index lipoperoxidation in the tissue, through measurement of lipid redox state, as previously described (Draper and Hadley, 1990). We used 600ul of 10% trichloroacetic acid (TCA) mixed with 300ul of samples and centrifuged (10000xg per 10min). Supernatant was collected, mixed with 0.5 mL of 0.67% thiobarbituric acid, heated in water bath for 25 min and read by the absorbance in the spectrophotometer at 532 nm.

Protein Carbonylation

The oxidative damage to protein was measurement through determination of the carbonyl content groups. This method is based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described by (Levine et al., 1990). Proteins were precipitated by addition of 20% trichloroacetic acid, redissolved in DNPH and the absorbance was read in spectrophotometer at 370 nm.

Activity antioxidant enzymes

The enzymes CAT and SOD were evaluated operating in sequence to reduce the superoxide anion into water. CAT activity was measured by the rate of decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) absorbance in spectrophotometer at 240 nm (Aebi, 1984). SOD activity was assayed by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation, with absorbance at 480 nm, as previously described (Misra and Fridovich, 1972).

Nonenzymatic antioxidant potential

TRAP was used as an index of the nonenzymatic antioxidant capacity. This method is based in the reaction mixture contained 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) 10mM, a source of peroxy radical, and luminol (4 mM) in glycine buffer (0.1 M, pH 8.6). After samples addition, the luminescence decreases proportionately to potential antioxidant. This assay was performed according Lissi et al (1992). TRAP results were calculated using GraphPad Prism-5 software and expressed as AUC (area under curve) (Dresch et al., 2009). TAR was also evaluated following the same principle of the technique of TRAP. The TAR values were calculated as the ratio " I_0/I ", where I_0 is the chemiluminescence in the absence of additives, and " I " is the chemiluminescence after sample addition (Lissi et al., 1992).

Immunoassays for cytokine – TNF- α

Aliquots of muscle were homogenized in lysis buffer followed by centrifugation at 4°C 1000g for 5 min. This assay was carried out in 100 μ L of supernatant as instructed for Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit for rat (eBioscience, Ref. 88-7340, San Diego, USA).

Imunoblotting for COX-2

Muscle samples were homogenized in 4% SDS, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8. Samples were boiled in sample buffer [62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% bmercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.002% (w/v) bromophenolblue]. The samples, with equal amount of protein (40ug) were submitted to electrophoresis in 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel. The separated proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane. Equal loading of each sample was confirmed with Ponceau S staining (Sigma). Anti-Cox-2 (Santa Cruz Biotechnology) was incubated at a dilution 1:1000, overnight. After, the membranes were washed and incubated with peroxidase-conjugated anti-goat immunoglobulin (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:2000 for 1 h. The chemiluminescence signal was detected using an ECL (Biorad, Amersham), after the films were scanned and bands were quantified using the Scion Image software. β -actin was used as a loading control.

Histological analyses

The skeletal muscle was analyzed with aim to investigate change in the tissue structure. Five samples of belly was used per group, sectioned transversally and serially at 10 μ m in cryostat and stained with hematoxylin and eosin. The images were captured at 10x, using a microscope (Eclipse E-600; Nikon, Japan) coupled to a high performance camera (DXM1200C, Nikon, Japan) and analyzed in Image pro plus software 6.0 (Media Cybernetics, Silver Springs, USA) by two independents researchers with no prior knowledge of the animal groups. Morphometric measurements of the gastrocnemius included number of fibers (NF) and total area occupied by muscle fiber (TAF). The value of area was calculated with a point-counting technique using grids, with the following equation: $A = \Sigma p \cdot a/p$, where A is area, Σp the total of counted area/point, and a/p the area/point value (257,08 μ m²) (Ilha et al., 2008). The total area occupied by muscle fiber was estimated by the sum of the whole area of muscle fiber (Malysz et al., 2011).

Statistics

The comparisons between two groups were made by an unpaired Student's t-test and, analyses of multiple groups were performed by one way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test. The significance was accepted at a level of $p < 0.05$. For all statistics tests was made in the statistical package SPSS 18.0 software for windows. The results are expressed as mean values (standard error).

RESULTS

In order to characterize the muscle injury, serum creatine kinase levels were analyzed between injured and the control group after 24 h of muscle contusion, and statistically significant difference [$F_{8,75.5} = 20.79$, $p = 0.005$] were found, provided evidential of presence of muscle trauma (Figure 1A). After 72 h of the injury the enzyme CK showed differences among the groups ($F_{4,23} = 2,856$, $p = 0,052$). The *post hoc* test indicated difference only between ultrasound and phonophoresis groups, other groups did not differ (Figure 1B). This result suggests that the injury persisted in ultrasound group after 72 hours, although it has not deferred of the control group.

Data presented in the Table 1 showed measures of oxidative damage on muscle tissue, after 72 hours of injury. Two parameters evaluated lipid peroxidation and protein carbonylation, did not show statistical difference among the groups (respectively: $F_{4,36} = 1.643$, $p = 0.188$; $F_{4,31} = 2.271$, $p = 0.9186$; $F_{4,36} = 1.195$, $p = 0.332$), suggesting that in three days after muscle contusion there was not oxidative damage in lipids and protein in any of the evaluated groups.

Potential antioxidant was evaluated through of activity antioxidant enzymes CAT and SOD (Figure 2 A-B) and nonenzymatic antioxidant capacity (TRAP and TAR) (Figure 3 A-B). CAT and SOD activity did not show differences between injured and control groups after 72 h of muscle trauma, even among of the treated groups (ketoprofen, ultrasound and phonophoresis) (CAT $F_{4,48} = 1.342$, $p = 0.270$; SOD $F_{4,49} = 1.013$, $p = 0.411$). These results indicate that, after

three days of the muscle trauma, the enzymes not showed differences in activity between control and injured with or without treatments.

Content total antioxidant nonenzymatic (TRAP) (Figure 3-A) and TAR (Figure 3-B) presented similar results, with statistically significant differences (TRAP $F_{4,38} = 5.707$, $p = 0.001$; TAR $F_{4,36} = 6.662$, $p = 0.001$) among the groups injured, ketoprofen and phonophoresis compared to control. For both measure parameters (TRAP and TAR) the ultrasound group did not show difference from control, presenting content measures antioxidant defense equal to the control group. However, ultrasound group did not differ significantly of the other groups.

No statistical difference was find in TNF- α cytokine content (Figure 4), as evaluated by ELISA, in muscle of injured and treated rats ($F_{4,38} = 1.539$, $p = 0.2130$). This result indicates that after 72 hours the cytokine did not present increase neither after muscle contusion, nor in proposed treatments.

COX-2 content was not altered by muscle injury or by the treatments tested, after 72 hours of the trauma ($F_{4,25} = 0.643$, $p = 0.638$) (Figure 5). The COX-2 levels show that, in these conditions, its content was not influenced by ketoprofen or phonophoresis.

Three days after the contusion, the histological analysis (Figure 6) allowed us to evaluate and quantify the area of the injury which was characterized by inflammatory infiltrate, localized sites of cellular necrosis and degeneration nucleus. The measurement of number of muscle fiber (NF) showed differences among the groups ($F_{4,26} = 2.534$, $p = 0.048$) (Figure 6), with post hoc indicating differences only between ultrasound and control group. The total area occupied by muscle fiber (TAF) presented statistically significant differences among the groups ($F_{4,26} = 2,994$, $p = 0,041$). Control group showed largest TAF compared with injured group, ultrasound and phonophoresis groups, however, the ketoprofen group did not present significant differences of control (Figure 7). The treatments not showed differences in the TAF when compared with injured no treated group. The morphometrics measurements results suggested that the ketoprofen

may to have preserved muscle fiber, while the ultrasound group may to have induced major degeneration of muscle fibers.

REFERENCES

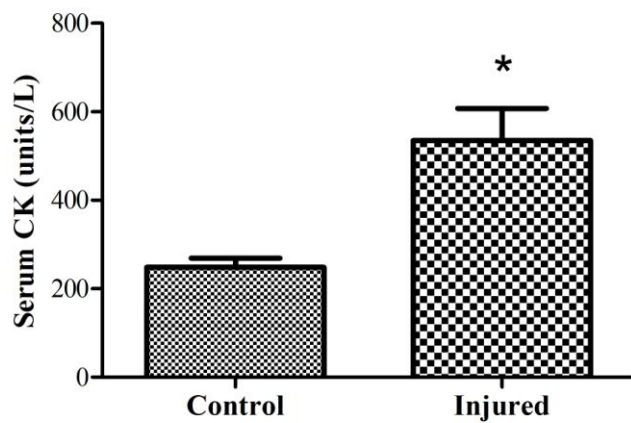
- Aebi H (Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.1984).
- Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM (Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull* 81-82:209-230.2007).
- Crisco JJ, Hentel KD, Jackson WO, Goehner K, Jokl P (Maximal contraction lessens impact response in a muscle contusion model. *J Biomech* 29:1291-1296.1996).
- Draper HH, Hadley M (Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-431.1990).
- Dresch MT, Rossato SB, Kappel VD, Biegelmeier R, Hoff ML, Mayorga P, Zuanazzi JA, Henriques AT, Moreira JC (Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal Biochem* 385:107-114.2009).
- Friden J, Lieber RL (Serum creatine kinase level is a poor predictor of muscle function after injury. *Scand J Med Sci Sports* 11:126-127.2001).
- Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EE, Rigon P, Xavier LL, Achaval M (Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 22:355-366.2008).
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478.1990).
- Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD (Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 17:299-311.1992).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.1951).
- Malysz T, Ilha J, Severo do Nascimento P, Faccioni-Heuser MC, De Angelis K, D'Agord Schaan B, Achaval M (Exercise training improves the soleus muscle morphology in experimental diabetic nerve regeneration. *Muscle Nerve* 44:571-582.2011).
- McBrier NM, Neuberger T, Okita N, Webb A, Sharkey N (Reliability and validity of a novel muscle contusion device. *J Athl Train* 44:275-278.2009).
- Misra HP, Fridovich I (The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175.1972).

Puntel GO, Carvalho NR, Amaral GP, Lobato LD, Silveira SO, Daubermann MF, Barbosa NV, Rocha JB, Soares FA (Therapeutic cold: An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. *Free Radic Res* 45:125-138.2011).

Shu B, Yang Z, Li X, Zhang LQ (Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion. *Cell Biochem Biophys* 62:329-336.2012).

Silveira PC, 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 Med Biol* 36:44-50.2010).

A



B

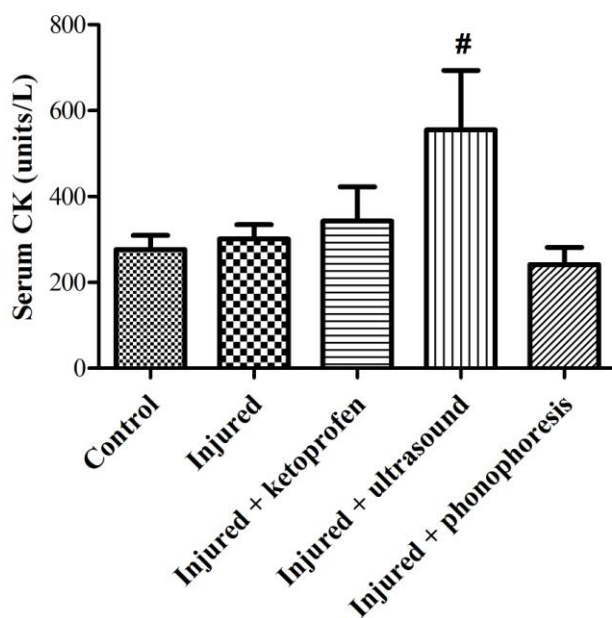


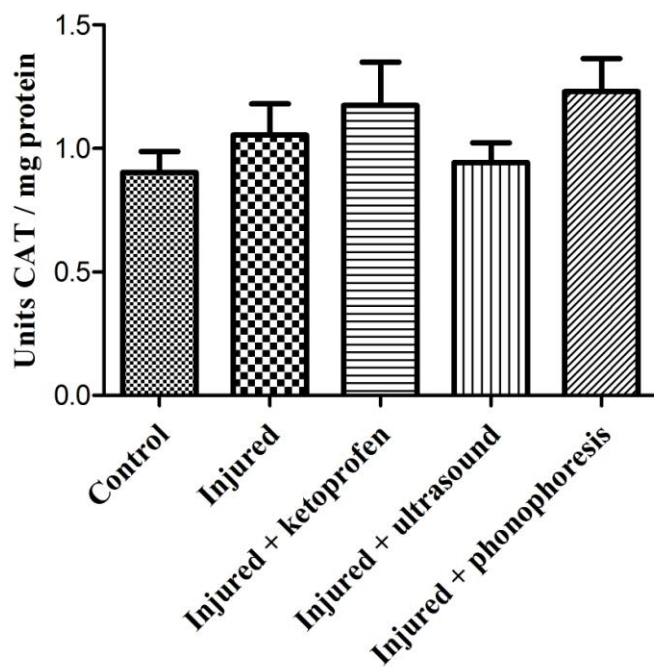
Fig. 1. Activity of creatine kinase. Measurement in serum after 24 hours muscle injury (A). Measurement in serum after 74 hours muscle injury (B). * control differences, $p < 0.01$; # phonophoresis differences, $p = 0.05$

Table 1 - Measurement TBARS and Carbonyl

	Lipid peroxidation nmol TBARS/mg protein	Protein carbonylation nmol Carbonil/mg protein
Control (n = 8)	0.978 (0.13)	0.460 (0.13)
Injured (n = 5)	0.858 (0.10)	0.499 (0.11)
Injured + Ketoprofen (n = 5)	0.531 (0.15)	0.388 (0.14)
Injured + Ultrasound (n = 8)	0.875 (0.14)	0.404 (0.06)
Injured + Phonophoresis (n = 6)	0.766 (0.09)	0.357 (0.11)

Data are presented as mean \pm S.E.M. Statistics: $p > 0.05$.

A



B

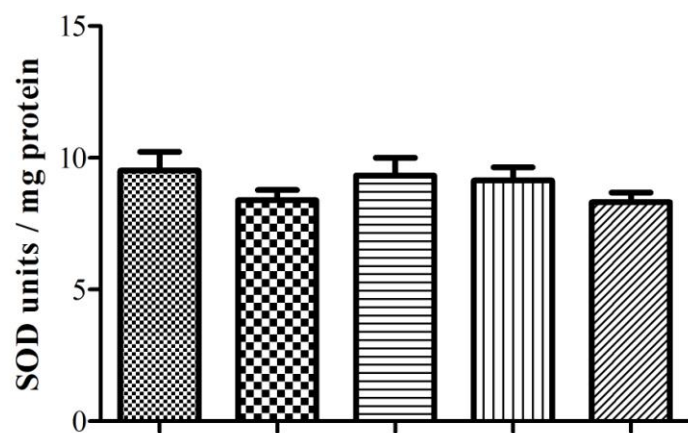
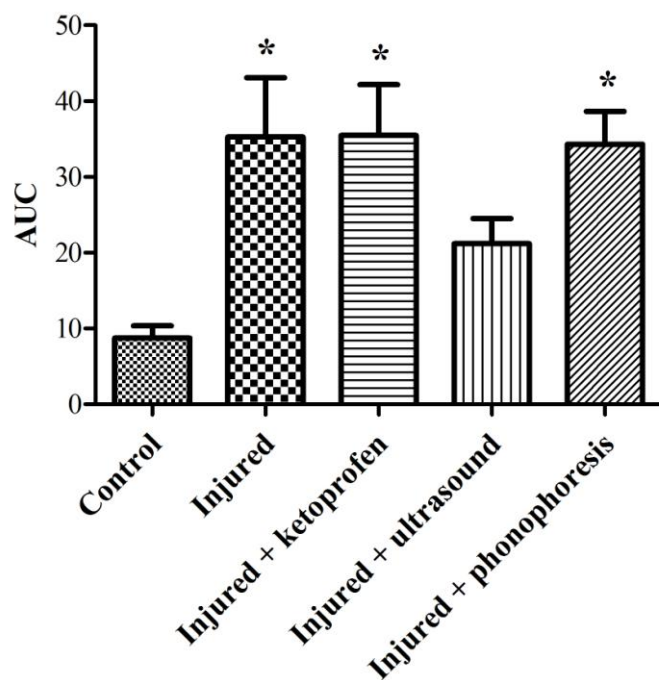


Fig. 2. Activity antioxidant enzyme: measurement of Catalase (CAT) (A) and Superoxide (SOD) (B); $p > 0.05$.

A



B

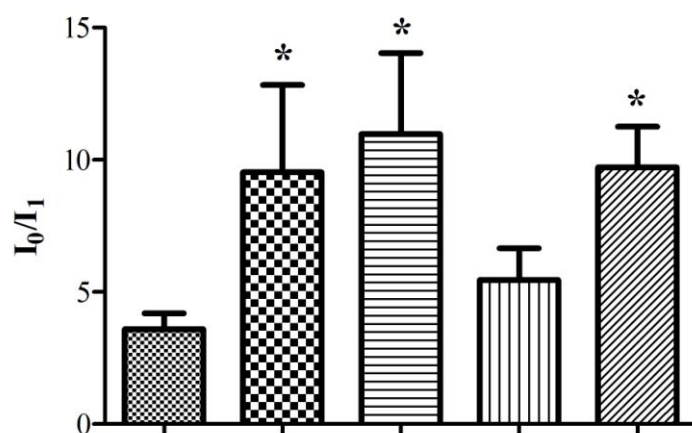


Fig. 3. Measurement of non-enzymatic antioxidant. TRAP (A) and TAR (B). AUC (area under the curve). *control differences, $p < 0.01$.

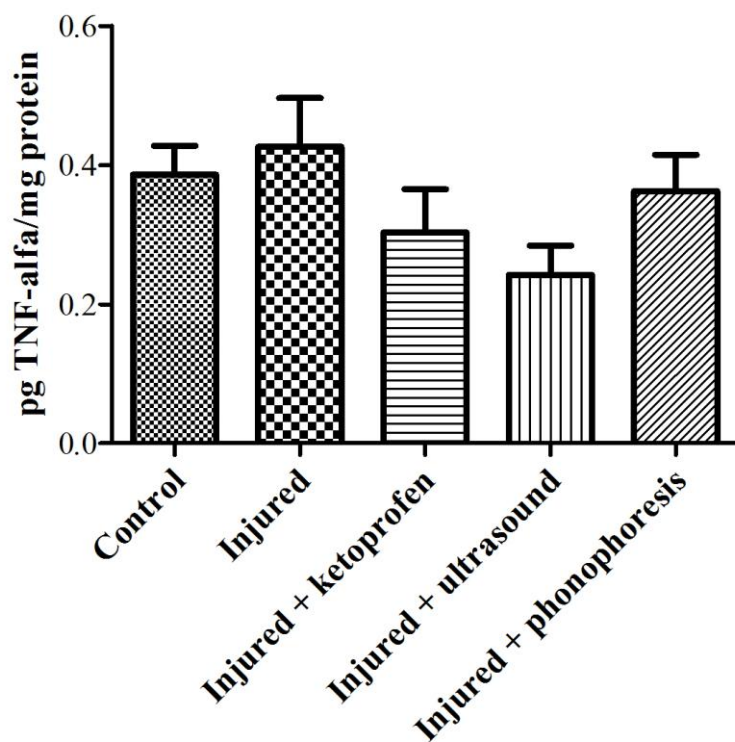


Fig. 4. TNF- α measurement; $p > 0.05$.

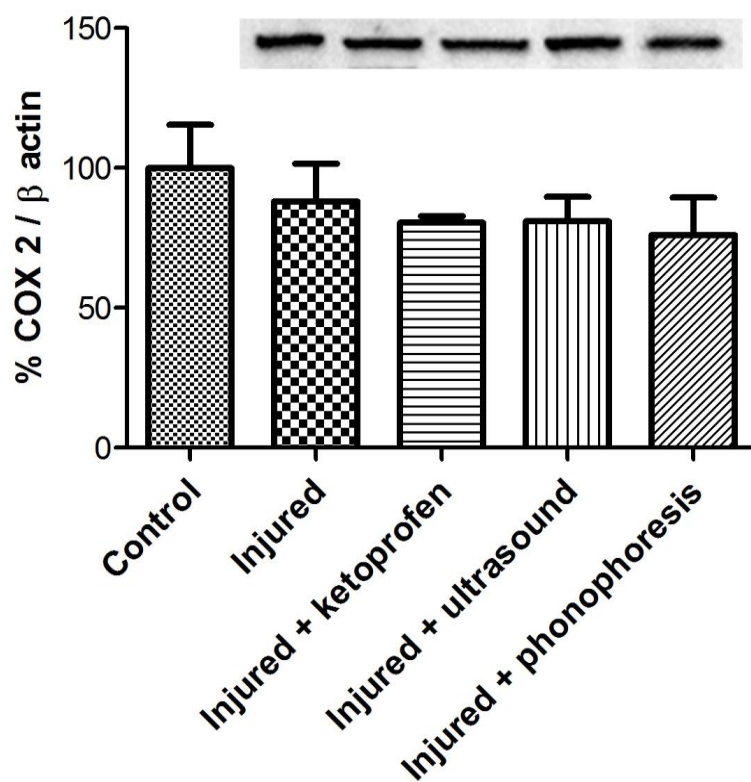


Fig. 5. Amount of cyclooxygenase enzyme; $p > 0.05$.

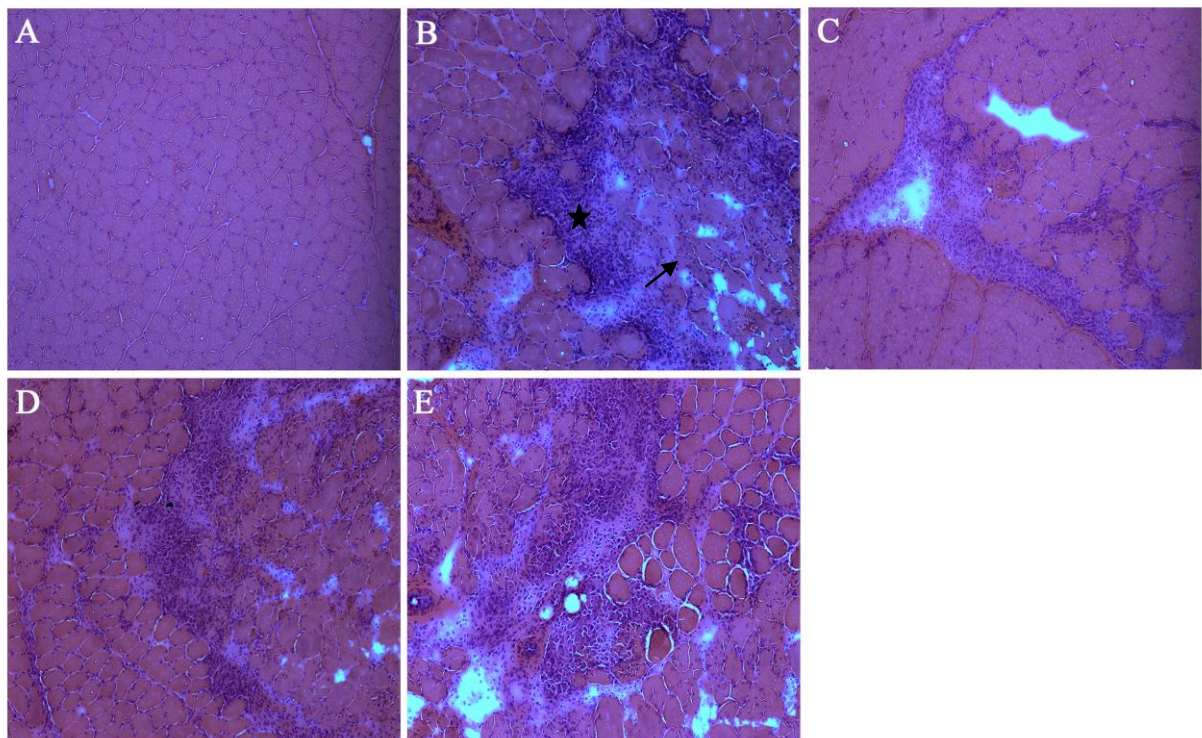


Fig. 6. Image of muscle stained with H.E. Groups: control (A), Injury (B), Ketoprofen (C), Ultrasound (D) and Phonophoresis (E). Note the presence of muscle fiber destroyed (arrow) and with increase of connective tissue space and cellular infiltrate (star) in injured groups (B, C, D and E).

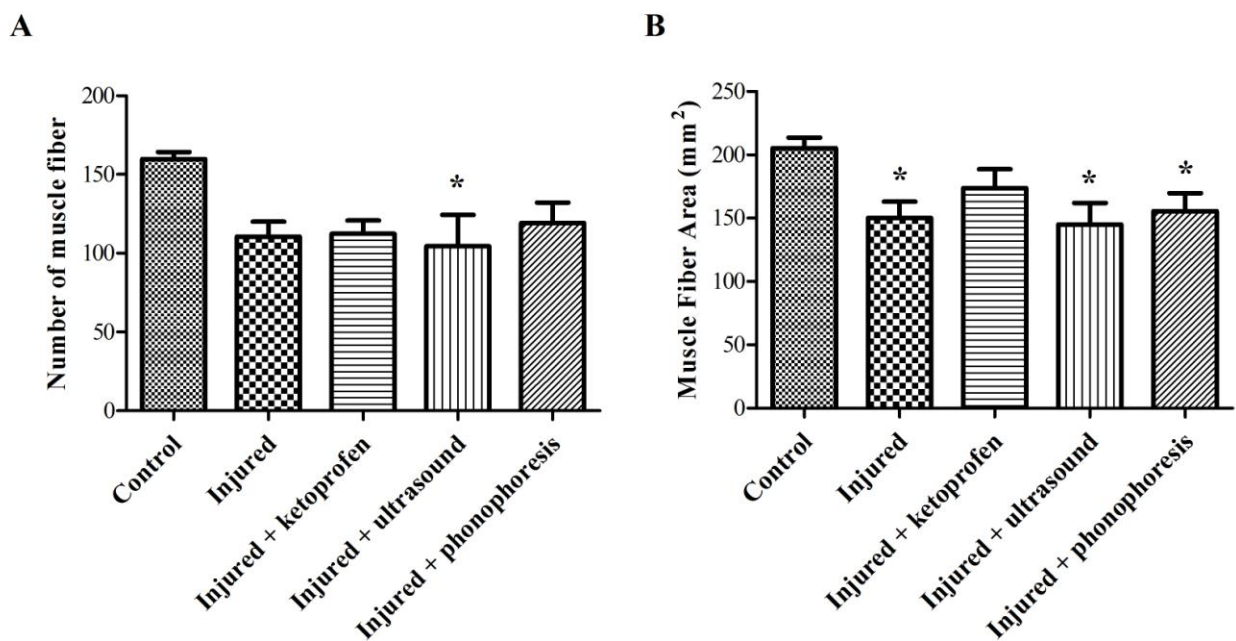


Fig. 7. Measurement of muscle stained H.E. * differences of control group, $p < 0.05$.

PARTE III

3 Discussão

Inicialmente, foi realizado um estudo de revisão de literatura sobre os principais modelos de lesão muscular em animais, utilizados para reproduzir a lesão de humanos. Paralelamente, avaliamos *in vitro* o uso do US como potencializador da passagem cutânea de AINEs tópicos, afim de selecionarmos a melhor combinação para a avaliação das modalidades terapêuticas no processo inflamatório agudo *in vivo*.

Em nosso estudo de revisão observamos que a maioria dos trabalhos que descrevem os modelos de lesão muscular esquelética (distensão, contusão e laceração) (Jarvinen et al., 2000, Jarvinen et al., 2005, Smith et al., 2008), replicadas em modelos animais, possuem principalmente como objetivos avaliar/descrever o processo regenerativo muscular e métodos de tratamento para acelerar a recuperação do tecido. Entretanto, observou-se que estes modelos de estudo nem sempre reproduzem o mecanismo de trauma como do tecido humano, sendo portanto necessário fazer uso de métodos mais reprodutíveis.

O modelo de lesões por contusão é o mais utilizado dentre a literatura revisada. Uma possível justificativa para a sua escolha é sua alta incidência entre as lesões musculares de origem mecânica (Khattak et al., 2010) e a similaridade com o mecanismo de trauma descrito em humanos (Almekinders, 1999, Jarvinen et al., 2007). A contusão em animais é replicada basicamente de duas formas: por meio de uma carga que impacta o ventre muscular (porção com maior massa muscular) ou por meio do esmagamento do tecido (*crush*). Os modelos de lesões por esmagamento são comumente realizados a partir da exposição cirúrgica do ventre muscular que é prensado com pinça por alguns instantes. A contusão por carga ocorre a partir da liberação de uma massa metálica a uma determinada altura sobre a região do ventre muscular.

Dentre os dois modelos de contusão, o trauma produzido com carga assemelha-se mais com a lesão por contusão humana (Smith et al., 2008). Todavia, as pesquisas utilizando contusão

por carga mostram uma grande variabilidade de energia de impacto, conforme observado na Tabela 2 do capítulo I, onde, para a mesma espécie de animal e idade, a variação de energia cinética de impacto pode dobrar entre os trabalhos analisados (Wilkin et al., 2004, McBrier et al., 2007, Silveira et al., 2010b). Além disto, alguns estudos não informam o formato e a área da massa metálica utilizada na lesão, podendo assim apresentar um trauma mais severo devido a concentração de energia estar sendo aplicada em uma pequena área do músculo (Smith et al., 2008). A variabilidade observada entre os modelos de contusão podem dificultar a comparação entre os resultados observados nos estudos.

Fundamentados na revisão de literatura sobre os modelos de lesão muscular, buscamos desenvolver um instrumento que replicasse a contusão semelhantemente aos achados prévios e ao trauma descrito em humanos. O instrumento foi confeccionado em parceria com o Laboratório Grupo de Mecânica Aplicada, do Departamento de Engenharia Mecânica da UFRGS e, as características e descrições do instrumento, encontram-se no Apêndice I.

Os métodos terapêuticos utilizados para o tratamento das lesões musculares, tais como a contusão, variam conforme sinais e sintomas apresentados pelo paciente, todavia a fisioterapia comumente é indicada, em especial nas lesões nos esportes (Rodas et al., 2009). Entre as modalidades terapêuticas da fisioterapia, o US e a sua combinação com medicamentos tópicos (fonoforese), principalmente de AINEs, estão entre os recursos utilizados (Watson, 2000, Warden and McMeeken, 2002).

Vários estudos têm apresentado resultados divergentes considerando o efeito do US sobre o tecido muscular durante a regeneração, conforme descrito previamente (seção Introdução). Neste contexto, embora a indicação do US como modalidade terapêutica seja prevalente (Watson, 2000, Warden and McMeeken, 2002, ter Haar, 2007, Rodas et al., 2009), os efeitos biológicos sobre o tecido muscular, especialmente no processo agudo de recuperação, necessita de maiores investigações.

A combinação do US com medicamentos de uso tópico tem sido utilizada para favorecer o transporte transdérmico do fármaco. A maior limitação das medicações tópicas é a passagem pela superfície da pele (Benson, 2005, Park et al., 2007). De acordo com a literatura, o US, a partir dos seus efeitos físicos térmicos e não-térmicos poderia favorecer a desestabilização da matriz lipídica, o movimento de moléculas de baixo peso molecular, o aumento da atividade celular, etc (Johns, 2002, Lavon and Kost, 2004, Mitragotri, 2005). Em virtude de grande prescrição de anti-inflamatórios no processo agudo da lesão muscular (Almekinders, 1999, Mehallo et al., 2006), nosso estudo deteve-se em avaliar os benefícios da combinação de um representante deste grupo de medicamentos com o US terapêutico sobre a recuperação muscular. Previamente, foi realizado experimentos *in vitro*, para determinar o AINE seria mais adequado para o aplicação da fonoforese.

3.1 Fonoforese: diclofenaco de sódio ou cetoprofeno?

Os resultados das quantidades de cetoprofeno permeadas entre os grupos 1 (apenas medicamento, sem US) e 2 (US aplicado no tempo zero, ou juntamente com o medicamento) não diferiram significativamente, indicando que o US não melhorou as quantidades permeadas. Um trabalho prévio, diferentemente mostrou que a fonoforese aumenta a permeação do cetoprofeno, todavia duas diferenças importantes podem justificar os resultados contrários aos nossos (Herwadkar et al., 2012). Os autores utilizaram uma frequência de onda sonora (20 KHz) bem abaixo da empregada por nós (1 MHz). Vários pesquisadores têm mostrado que frequências baixas de US apresentam maiores vantagens e resultados sobre a permeação de substâncias sobre a pele (Mitragotri et al., 1996, Tezel and Mitragotri, 2003, ter Haar, 2007, Ogura et al., 2008). Além disso, o trabalho em questão utilizou pele de ratos, que tem sido apontada como mais permeável que a pele de porco (Schmook et al., 2001), utilizada em nosso estudo. A pele de orelha de porco tem sido referenciada como modelo adequado para permeação devido às suas

similaridades com a pele humana (Schmook et al., 2001, Barbero and Frasc, 2009) e, por isso, foi eleita para os nossos experimentos.

Quando o US foi utilizado em dois tempos distintos (grupo 3 – US aplicado no tempo zero e reaplicado após 3 h) observamos um aumento significativo nas quantidades permeadas em 4, 5 e 6 h, quando comparado aos grupos 1 e 2. Após 3 h, o período em que o fármaco estaria próximo ao seu *steady state* – (melhor constância no fluxo de permeação), leva-nos a considerar a hipótese de que o US aumentaria interação e desordem da matrix lipídica dentro da *estrato córnea* (Lavon and Kost, 2004), facilitando a difusão de fármacos hidrofílicos, tal como o cetoprofeno (Beetge et al., 2000). Para avaliar se a melhora no desempenho das quantidades permeadas do cetoprofeno foram decorrentes da aplicação no *steady state* do fármaco, o grupo 4 (uma única aplicação de US após 3 h) foi comparado com o 2 (US tempo zero) e 3 (US tempo zero e reaplicação em 3 h). Os resultados mostraram que apenas o grupo 3 diferia significativamente do 2 e 4. Estes dados indicam que a aplicação do US próximo ao *steady state* do cetoprofeno não é fundamental para facilitar as quantidades permeadas do medicamento. Entretanto, o aumento na permeação parece relacionar-se com a quantidade de aplicações do US. Corroborando nossos achados, um estudo *in vitro* utilizando US (1 MHz, modo contínuo) combinado com ibuprofeno (AINE) em pele humana com onda sonora aplicada em tempos diferentes, demonstrou um aumento no fluxo permeado do fármaco (Brucks et al., 1989). Em nosso estudo, a análise de sinergismo, que avaliou o efeito do momento da aplicação do fármaco e o resultado sobre a permeação mostrou ausência de interação, ou seja, a quantidade de cetoprofeno permeado após duas aplicações de US (grupo 3) é equivalente a adição dos resultados de ambos os grupo 2 e 4 (tratado com uma única dose de US). Estes dados em conjunto indicam que a influência do US sobre a permeação de fármacos seja dependente do número de exposições à onda sonora.

Uma explicação para a relação entre permeação e a quantidade de exposição ao US, encontra-se no seu efeito provocado sobre a pele. Nossa hipótese é de que os efeitos térmicos, fluxo acústico e cavitação (Mitragotri et al., 1997, Machet et al., 1998, O'Brien, 2007) ocorrem durante a aplicação do US, cessando ou reduzindo logo após a sua finalização.

Quando analisado o fluxo do cetoprofeno, foi verificado que o US aumentou significativamente quando aplicado duas vezes (grupo 3) em relação ao grupo sem US, indicando que o número de exposições também melhora este parâmetro de permeação. Confirmando tal resultado, um estudo aplicando US (800 KHz) combinado a AINE sobre membrana de celulose verificou aumento no fluxo dos medicamentos durante a aplicação do US e, não observando o mesmo efeito quando nos períodos de pausa do mesmo (Meshali et al., 2008).

A aplicação de um ou dois tempos de US não influenciou o tempo de latência do cetoprofeno. Segundo a literatura, o tempo de latência é dependente da composição da pele, das características do veículo e do fármaco, e principalmente do coeficiente de difusão do medicamento (Meidan et al., 1998, Barbero and Frasch, 2009). Um estudo teórico e experimental utilizando o US (1MHz) sobre o coeficiente de difusão em diferentes solutos através da pele humana mostrou um aumento significativo na melhora do tempo de latência e quantidade permeada (Mitragotri, 2001). O coeficiente de difusão, depende das características físico-químicas do soluto (fármaco e veículo) tais como: massa, viscosidade, pressão e temperatura (Pellanda, 2006). A hipótese sobre os mecanismos que influenciaram o coeficiente de difusão e consequentemente o tempo de latência no estudo de Mitragotri (2001) podem estar relacionados com o aumento da temperatura promovida pelo US, uma vez que eles utilizaram um onda contínua com intensidade de $2\text{W}/\text{cm}^2$, que promoveu um aumento significativo na temperatura local da pele (Meidan et al., 1998, Meshali et al., 2008). Em nosso estudo, nós não observamos diferenças no tempo de latência com o uso do US e, esses resultados podem estar relacionados

com os parâmetros utilizados do US (modo pulsado e $8\text{W}/\text{cm}^2$), que promovem menor aquecimento que a onda contínua (Cambier et al., 2001).

Os resultados da permeação do diclofenaco de sódio apresentaram diferenças significativas na quantidade do fármaco permeado entre os grupos (2 e 3) e o grupo passivo (sem US) nos tempos de 3, 4 e 5 h, sendo o passivo mais eficiente na passagem do diclofenaco. Em 6h após a permeação, os grupos não diferiram entre si. O US pareceu dificultar e atrasar a permeação do fármaco. As medidas de fluxo e tempo de latência não diferiram entre os grupos. Por outro lado, estudos prévios tem obtido sucesso com a combinação do diclofenaco de sódio e US sobre a permeação do fármaco (Rosim et al., 2005, Meshali et al., 2008). Entretanto, alguns fatores podem ter favorecido os resultados obtidos pelos pesquisadores, como a baixa frequência de onda utilizada, que promove um aumento da permeação comparativamente a frequências altas e, o modo de onda contínua, conhecida por produzir os efeitos mecânicos, também encontrados no modo pulsado e, efeitos térmicos que são reduzidos ou negligenciáveis no pulsado (Cambier et al., 2001, Johns, 2002). Um importante aspecto a considerar é o fato de que os efeitos térmicos potencializam o aquecimento do meio e a permeabilidade, provavelmente, através do aumento no coeficiente de difusão da bicamada lipídica da pele (Mitragotri, 2001, Lavon and Kost, 2004, Polat et al., 2011). Como em nosso estudo não foram observadas diferenças nos parâmetros gerais de permeação, os efeitos promovidos pelo US pulsado (fluxo acústico e cavitação) mostram-se irrelevantes neste caso.

Diferenças na permeação dos medicamento testados após a fonoforese poderiam estar relacionados às propriedades físico-químicas dos fármacos e/ou componentes da formulação e, não necessariamente, refletem um problema na eficácia da fonoforese (Mitragotri et al., 1997, Kaushik et al., 2010). As principais propriedades para liberação transdérmica de um soluto estão relacionados com a sua massa molecular, pKa e coeficiente de partição (Beetge et al., 2000). De acordo com a literatura, o coeficiente de partição é o melhor preditor para a permeação da pele

(Mitragotri et al., 1997, Beetge et al., 2000, Benson, 2005). Comparando as características dos medicamento testados por nós, verificamos que o pKa do diclofenaco de sódio (3,78) é semelhante ao cetoprofeno (4.5), possivelmente este fator não influencia os resultados obtidos. Porém, o cetoprofeno apresenta vantagem sobre o diclofenaco em relação ao coeficiente de partição (logP) (cetoprofeno: 0,97; diclofenaco: 4,4), onde fármacos com $\log P \leq 2$ são considerados melhores candidatos para a liberação transdérmica (Beetge et al., 2000). O efeito do US sobre os coeficientes de partição e difusão na estrato córnea foi analisado em estudo prévio, onde mostrou que o efeito primário da onda sonora foi sobre o coeficiente de difusão e não sobre o coeficiente de partição (Mitragotri, 2001). Neste contexto, a permeação de fármacos sobre a pele, em especial sobre a camada estrato córnea, associada a fonoforese, está relacionada com fatores intrínsecos do fármaco e formulação (propriedades físico-químicas), assim como aos efeitos do US sobre a pele e características do medicamento escolhido.

Um fator importante a considerar na difusão cutânea de fármacos é a condição da pele, pois características como hidratação (conteúdo de água), espessura e possivelmente a idade, são fatores muito influentes (Barja and Veloso, 2010, Silveira et al., 2010a). Estudos em humanos utilizando a fonoforese tem mostrado resultados contraditórios (Darrow et al., 1999, Cagnie et al., 2003, Kuntz et al., 2006, Ebrahimi et al., 2012). Nestas divergências, pouco é referido ou explorado sobre a avaliação das condições cutânea dos participantes, ou influencia da idade e região exposta ao tratamento.

O US pode ser utilizado como um potencializador na passagem transdérmica de fármacos, entretanto, possivelmente a sua combinação com potencializadores químicos poderiam promover melhores resultados ou necessidade de menores doses do medicamento e, desta forma, a combinação poderia aumentar a sua segurança e eficácia (Prausnitz et al., 2004). Todavia, assim como foi verificado que potencializadores químicos podem se comportar como retardantes sobre a permeação da pele, dependendo da sua interação com o veículo utilizado (Kaushik et al.,

2010), talvez US também apresente essa característica dúbia, estando sujeito aos componentes da fórmula e suas interações. Estudo recente mostrou que a transmissão acústica varia de acordo com a base da formulação tópica (Cage et al., 2013). Agentes tópicos suspensos em gel aquoso, foram mais efetivos que os mesmos agentes em base creme (Cage et al., 2013). Neste contexto, o ideal seria que formulações específicas fossem desenvolvidas especificamente para o uso com o US.

Para concluir, os nossos resultados com o experimento de permeação e fonoforese apontam para a necessidade de uma avaliação prévia a cerca das características físico-químicas dos fármacos, da adequação dos componentes da formulação ao US, bem como do comportamento dos mesmos mediante os efeitos sonoros.

3.2 Efeitos do Ultrassom e da Fonoforese após contusão muscular em modelo animal

Para avaliar o efeito terapêutico do US e da fonoforese (com cetoprofeno - AINE) no processo inflamatório agudo muscular, utilizamos o modelo de contusão. Para comprovar a efetividade da lesão foi utilizado a medida da atividade enzimática da creatina quinase no sangue dos animais. Esta enzima está envolvida com o metabolismo energético da célula, sendo uma fonte rápida de regeneração de ATP, localizada no citoplasma e mitocôndria de tecidos com grande demanda energética como o músculo (Wallimann et al., 1992). Mediante ruptura da estrutura celular do músculo, a enzima CK pode ser encontrada no espaço extracelular (Brancaccio et al., 2007). Vários estudos têm utilizado a CK como um marcador de lesão muscular (Friden and Lieber, 2001, Akimau et al., 2005, Silveira et al., 2010b, Puntel et al., 2011, Shu et al., 2012). No presente trabalho, a medida 24 h após a contusão mostrou diferença da atividade da enzima CK entre o grupo lesionado e controle, atestando o processo lesivo no tecido e corroborando os achados da literatura (Puntel et al., 2011, Shu et al., 2012, Victor et al., 2012).

Quando analisada a atividade da CK três dias após a contusão, o grupo lesionado havia retornado aos níveis do controle. Possivelmente, em até 3 dias ocorre a remissão da enzima no sangue e uma melhora da lesão, não havendo mais liberação da CK para o ambiente extracelular. Shu et al (2012) também utilizaram o modelo de contusão (energia de 2,37J) em ratos e constataram que o maior pico da CK no sangue ocorreu em 2 h pós trauma. Em 24 h a medida da enzima apresentou uma redução drástica, mas ainda permaneceu acima dos valores prévios à lesão (Shu et al., 2012). Possivelmente, em 72 h, como foi avaliada no presente estudo, os valores da CK retornaram aos níveis normais. A medida da CK nos grupos lesionados e tratados (grupo 3 e 5) também já haviam retornado a valores dos animais controles. Todavia, o grupo tratado com US apresentou nível alto da enzima no sangue, que diferiu significativamente do grupo fonoforese, porém não apresentou diferença significativa do controle. Essa diferença pode ter sido pela redução da média da CK um pouco abaixo da média do controle para o grupo tratado com fonoforese.

Embora as contusões musculares apresentem bom potencial de cura, a recuperação funcional pode ser incompleta (Ota et al., 2011) e/ou, complicações podem surgir, tais como: miosite ossificante e síndrome compartimental (Trojian, 2013). A eficácia da regeneração muscular está relacionada com a magnitude do processo inflamatório (Engelmann et al., 2012). Quando ocorre uma excessiva resposta inflamatória há um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, que podem acarretar em dano oxidativo ao tecido saudável em volta do sítio da lesão (Supinski and Callahan, 2007). Um trabalho com modelo de contusão muscular (0,98J) em ratos, mostrou altos níveis de produção de peróxido e dano a lipídios no tecido muscular e sanguíneo, sugerindo excessiva produção de espécies reativas de oxigênio, capazes de causarem alterações estruturais e na função do sistema de defesa antioxidante (Puntel et al., 2011).

3.2.1 Efeito do ultrassom e fonoforese sobre medidas de estresse oxidativo após a contusão muscular

Para analisar a presença de dano oxidativo no nosso modelo de lesão muscular, nós investigamos níveis de peroxidação lipídica no tecido, por meio da avaliação dos níveis de MDA (malondialdeído) utilizando o teste de TBARS e, não verificamos diferenças entre o grupo lesão e o controle após 72 h da contusão. Do mesmo modo, medidas de dano oxidativo à proteínas, por meio da determinação de proteínas carboniladas, não diferiram entre grupo controle e lesão. Em conjunto, os resultados apontam para a ausência de dano oxidativo a lipídios e proteínas no terceiro dia após a contusão muscular, considerando os parâmetros estudados.

Estudos recentes com modelo de lesão muscular por contusão que avaliaram danos oxidativo ao tecido, em 5 (Silveira et al., 2010b) e 7 dias (Luo et al., 2012, Victor et al., 2012) pós trauma, demonstram alterações nos marcadores de dano por meio de técnicas de TBARS e carbonil. Outro estudo mostrou valores compatíveis com dano oxidativo em 24h após contusão muscular, entretanto, após 3 e 7 dias da lesão não apresentou peroxidação lipídica (medida de TBARS) no músculo (Filippin et al., 2011). Ghaly e Marsh (2010), após lesão muscular por esmagamento, verificaram diferença nos níveis de TBARS entre controle e lesionado apenas no grupo jovem, mas não para os grupos de ratos adultos e idosos (Ghaly and Marsh, 2010). Brickson et al (2001) após lesão muscular (estiramento) avaliou a produção de oxidante (medida de diclorofluoresceína – DCF) no intervalo entre 0 e 75 h pós trauma e, verificou que a maior produção ocorreu entre as primeiras 48 h pós trauma, não diferindo os grupos em 75 h pós lesão (Brickson et al., 2001). Embora o nosso estudo não tenha avaliado a produção de oxidante (DCF), os dados sobre dano oxidativo aos tecidos corroboram os achados previamente citados e, assim, possivelmente após 72 h da lesão muscular, o dano oxidativo não esteja presente no tecido.

Em relação ao efeito dos tratamentos (US e fonoforese) sob as medidas de dano oxidativo à proteínas e lipídios no tecido muscular, o nosso trabalho não mostrou diferenças destes grupos em relação ao lesionado e controle. A literatura tem mostrado resultados divergentes a respeito das modalidades terapêuticas avaliadas. Enquanto Silveira et al (2010) verificou diferenças significativas entre o grupo lesão e tratado com US pulsado com redução dos valores de peroxidação lipídica após 5 dias da lesão, Victor et al (2012) não apresentou diferenças significativas entre os mesmos grupos após 7 dias da contusão. Comparando as medidas de dano oxidativo às proteínas, os resultados entre os dois estudos foi exatamente o contrário. A fonoforese nos estudos de Silveira et al (2010) e Victor et al (2012) mostraram bons resultados com redução significativa da lipoperoxidação e carbonilação de proteínas do tecido muscular lesionado. Todavia, ambos os estudos utilizaram géis com potencial antioxidante (DMSO e nanopartículas de ouro) que atuam diretamente no equilíbrio e reversão do processo oxidativo e, que possivelmente influenciaram os resultados.

Em relação aos parâmetros antioxidantes enzimáticos, a avaliação da CAT e SOD não mostrou diferenças entre os grupos lesão e controle, ou grupos tratados. Puntel et al (2011) quando avaliou a atividade enzimática da SOD, não verificou diferenças entre grupo lesado e controle 24 h após a contusão, entretanto a CAT mostrou atividade enzimática aumentada que, segundo o autor, pode ter ocorrido como mecanismo compensatório em resposta ao insulto oxidativo 24 h antes. Embora Silveira et al (2010) tenha encontrado diferenças entre grupo lesão e controle após 5 dias da contusão, as medidas de CAT e SOD não diferiram quando no tratamento por US pulsado. Entretanto, a fonoforese com DMSO mostrou-se efetiva na redução dos valores de SOD em relação ao grupo lesão. Para Victor et al (2012) a atividade da enzima SOD reduziu com o tratamento do US pulsado após 7 dias da lesão. Em contra partida, a CAT não foi alterada com o US pulsado. Os melhores resultados com níveis enzimáticos antioxidantes próximo ao grupo controle saudável, foi com o grupo fonoforese que combinou o US pulsado

com dois tipos de antioxidantes externos (DMSO e nanopartículas de ouro), que podem ter contribuído para seu melhor resultado (Victor et al., 2012). Nesse sentido, estudo recente tem mostrado que a administração de antioxidante (via oral – polifenol) pode influenciar positivamente na recuperação muscular após contusão em ratos (Myburgh et al., 2012), explicação que pode ter contribuído para os resultados de Silveira et al (2010) e Victor et al (2012).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, existem fontes não enzimáticas, tais como: carotenóides (precursores da vitamina A), vitamina E, vitamina C, glutathiona entre outros. Estas fontes atuam como *scavenger* do radical peroxil, transformando-os em produtos não reativos. Em nosso estudo, a capacidade antioxidante total não enzimática (medida de TRAP) e, a reatividade antioxidante (medida de TAR) no músculo após lesão foi significativamente reduzida no grupo lesão comparado ao controle, sugerindo menor capacidade antioxidante não enzimática e com menor reatividade e potencial de modular o dano oxidativo.

Os grupos tratados pós lesão, cetoprofeno e fonoforese mantiveram conteúdo de defesa antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total semelhante ao grupo lesionado, com valores significativamente diferentes do grupo controle. O grupo ultrassom apresentou medidas de TRAP e TAR inferiores aos demais grupos (lesionado, cetoprofeno e fonoforese), aproximando-se da média do grupo controle, do qual não diferiu estatisticamente. Todavia, as medidas do grupo US não mostraram diferenças significativas em relação ao grupo lesão. Uma hipótese para os resultados do TRAP e TAR no grupo tratado com US pode estar relacionada com os efeitos da onda sonora sobre o tecido muscular. O fluxo acústico (*streaming acoustic*) e o efeito cavitacional tem sido sugeridos como possíveis ativadores de “movimentos” de íons, moléculas de baixo peso molecular e organelas na célula, próximo a membrana celular (Nyborg, 1982, Johns, 2002). Hipoteticamente, o “movimento” intracelular poderia favorecer as trocas e reações bioquímicas na célula, como por exemplo, dos antioxidantes não enzimáticos ligando-se

a metais de transição livres, provenientes da morte e rupturas de membranas (Gillani et al., 2012), e prevenindo a ocorrência de reações de Fenton e de Haber-Weiss, geradoras de espécies reativas. Todavia, este possível efeito terapêutico não foi constatado no grupo fonoforese. Talvez, mediante associação do AINE ao US (fonoforese) a onda sonora não exerça seus efeitos físicos e biológicos como na utilização apenas com o gel condutor.

3.2.2 Efeito da lesão e tratamentos sobre a inflamação muscular

O processo de lesão e reparo muscular é influenciado pela formação de espécies reativas e ativação do processo inflamatório (Pierce et al., 2007). Durante a inflamação ocorre a ativação da via da enzima ciclooxigenase, responsável pela formação de prostaciclina, prostaglandinas e tromboxanos, que atuam na ativação da cascata da inflamação e dor (Mendes et al., 2012). Com o intuito de reduzir o processo inflamatório via inibição/redução dos níveis de COX, utilizamos o cetoprofeno, um AINE, aplicado por via tópica e com o US (fonoforese). Os resultados quantitativos da COX-2 não mostraram diferenças significativas com o uso do medicamento isolado ou com US em relação aos grupo sem tratamento (lesionado e controle). Assim, possivelmente a lesão e os tratamentos propostos não interferiram quantitativamente no conteúdo da enzima, no período determinado de 3 dias após a contusão. Todavia, a atividade enzimática da COX possa ter apresentado interferências dos tratamento no período avaliado, entretanto, estas medidas não foram realizadas, mas serão efetuadas *a posteriori*.

As principais células responsáveis pelo processo inicial da inflamação são os neutrófilos, seguidos por macrófagos. Estas células produzem citocinas, como o TNF- α , capazes de induzir, manter e ampliar a inflamação (Cannon and St Pierre, 1998), principalmente por meio estimulação de outros neutrófilos para produção de radicais superóxido (Brickson et al., 2001). O TNF- α é a maior citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos (Victor et al., 2012), que atua como indutor da proteólise no tecido muscular, possivelmente por meio do sistema

ubiquitina (Cannon and St Pierre, 1998, Li et al., 2005). No presente estudo, as medidas de TNF- α no tecido muscular após 72 h da lesão não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados. Nossos resultados divergem da literatura, que utilizando modelo de contusão (0,811J) em ratos, mostraram diferenças entre os níveis de citocinas nos músculos do grupo lesionado e dos grupos tratados com fonoforese (antioxidantes) (Engelmann et al., 2012, Victor et al., 2012). Ambos os estudos analisaram a mensuração da citocina em períodos diferentes de tempo, Engelmann et al (2012) avaliou em apenas 48 h pós lesão e Victor et al (2012) após 7 dias. Talvez um fator que possa ter contribuído para as diferenças observadas entre os nossos resultados e a literatura, tenha sido a técnica de dosagem, Victor et al (2012) e Engelmann et al (2012) mensuraram o conteúdo de TNF- α via *eletroforese e imunodeteção*, enquanto nosso trabalho foi feito utilizando o teste imunoenzimático (ELISA).

Segundo a análise histológica, após 3 dias da contusão, o grupo lesionado não reduziu o número de fibras em relação ao controle, porém, apresentou uma área total de fibras musculares (TAF) inferior, indicando possível perda de área muscular decorrentes da lesão. Além disso, foi possível visualizar intenso infiltrado celular e presença de fibras musculares em degeneração no grupo contundido, corroborando achados de estudos prévios que utilizaram o mesmo modelo de contusão muscular em animais (Minamoto et al., 1999, Myburgh et al., 2012, Pertille et al., 2012, Shu et al., 2012). Os grupos tratados, em sua maioria, também apresentaram redução na TAF em relação ao controle. A exceção foi o grupo cetoprofeno, que mostrou não diferir do controle, indicando possível melhora nas condições do tecido muscular em relação aos demais grupos tratados. Estudo prévio mostrou resultados semelhantes ao nosso, por meio da avaliação do efeito do uso de AINE, via oral, sobre a regeneração muscular após contusão (Rahusen et al., 2004). Histologicamente a recuperação do tecido após 2, 5 e 7 dias da lesão apresentou poucas diferenças significativas entre o placebo e os animais tratados com AINE, todavia, os parâmetros da marcha mostraram melhores escores no grupo tratado com AINE. Os autores sugerem que o

AINE, administrado logo após a lesão, pode proporcionar melhora, entretanto, muito sutis na recuperação muscular (Rahusen et al., 2004).

Dentre os grupos tratados após a contusão, apenas o US mostrou uma redução significativa no número de fibras comparado ao controle, indicando possível destruição celular. Em relação a TAF, os grupos US e a fonoforese apresentaram uma redução significativa na área total de fibras em relação ao controle no terceiro dia pós lesão. Estes resultados sugerem que ambos os mecanismos de tratamento não foram capazes de amenizar o processo de destruição tecidual inicial provocado pela lesão, conforme o esperado.

O efeito do US sobre a regeneração muscular avaliado pela morfometria tem mostrado resultados muito divergentes. Wilkin et al (2004) avaliou o potencial do US pulsado para facilitar a recuperação muscular após contusão. O tratamento iniciou 6 h pós trauma e foi utilizado diariamente até o sétimo dia. Os tecidos foram avaliados entre o 1º a 40º dia pós lesão. Diferenças foram observadas apenas no 3º dia, onde o grupo não tratado mostrou área de secção transversa da fibra e número de mionúcleos significativamente maior comparado ao grupo tratado com US. Segundo os pesquisadores, o US não acelerou o processo de regeneração muscular (Wilkin et al., 2004). Com objetivo semelhante, Shu et al (2012) verificou por meio de análise qualitativa do tecido muscular (4, 7 e 14 dias após contusão), que o tratamento com US foi efetivo na redução do infiltrado inflamatório e promoção da proliferação de células satélites (Shu et al., 2012).

Uma possível explicação para essas divergências entre outros estudos e os nossos resultados, pode estar relacionada com as intensidades do US aplicadas e, com a gravidade da lesão muscular. Shu et al (2012) utilizou intensidades inferiores (0.25, 0.5 e 0.75W/cm²) em relação a Wilkin et al (2004) (1W/cm²), e maior intensidade de energia cinética na contusão (2,37 J e 1,84 J, respectivamente) e em relação ao nosso estudo. É conhecido que quanto maior a intensidade da onda sonora, maior a possibilidade de efeito térmico sobre o tecido (Fisher et al.,

2003, Dalecki, 2004, Lavon and Kost, 2004). O aquecimento durante processo inflamatório agudo provoca aumento da vasodilatação e favorece o movimento de células pró-inflamatórias ao local da lesão, podendo provocar exacerbação deste processo (Plentz et al., 2008). Em relação a lesão, supomos que em lesões leves, com menores repercussões teciduais, os efeitos não térmicos do US mostre-se menos efetivo para favorecer a recuperação muscular, do que nos traumas mais severos com maior dano tecidual e riscos de complicações.

A média da área de fibras musculares do grupo fonoforese mostrou-se diferente do controle, assim entendemos que o tratamento não foi capaz de amenizar o processo inflamatório e consequente degeneração tecidual. Embora não seja constatado diferenças significativas entre os grupos tratados sobre a TAF, o desempenho sobre a preservação das fibras musculares da fonoforese parece transcorrer semelhante ao grupo US.

3.2.3 Considerações gerais sobre o tratamento com Ultrassom e Fonoforese

Em conjunto, os nossos resultados demonstram poucas ou nenhuma evidência da eficácia dos tratamentos, considerando os parâmetros propostos, em reduzir o processo inflamatório muscular agudo. Nós conjecturamos possíveis influências metodológicas que podem ter afetado os resultados. Primeiramente, o modelo de lesão muscular em animais tem apresentado grande variabilidade, conforme discutimos no capítulo I. Nós procuramos desenvolver o modelo (impacto sobre o ventre muscular) mais próximo ao que acontece no respectivo trauma humano, com uma energia cinética próxima a média referenciada na literatura. Entretanto, conforme previamente descrito, a lesão por contusão em ratos apresenta variação no padrão de lesão entre animais (Minamoto et al., 1999), o que pode ter influenciado o resultado de algumas medidas do nosso trabalho.

Outro fator metodológico importante diz respeito a aliquotagem das amostras musculares. É possível que ao não determinarmos a região lesionada do gastrocnêmio, possamos

ter pego músculo saudável na mesma amostra da alíquota, conforme sugere McBrier et al (2007), ao analisar a influência do US sobre fatores de crescimento no músculo contundido com resultados negativos e com grande variabilidade.

Sobre as divergências entre os resultados do ultrassom e fonoforese comparativamente a literatura, um possível fator contribuidor pode estar relacionado ao aparelho de US. Estudos tem registrado diferenças no aumento da temperatura muscular quando utilizado aparelhos de US de diferentes marcas (Holcomb and Joyce, 2003, Merrick et al., 2003). A variação chegou a 61% da sua capacidade de aquecer o tecido. Straub et al (2008) mostrou que existe uma grande variabilidade de intensidades média espacial (SAI – *spatial average intensity*) entre marcas de aparelhos e, que isso se deve em grande parte a falta de acurácia dos fabricantes nas medidas de área efetiva de radiação (Straub et al., 2008). Um estudo avaliou a intensidade acústica em modelos de aparelhos de US brasileiros e verificou que algumas marcas apresentavam erros superiores a 30% em mais de uma intensidade avaliada (Guirro and Britshcy Dos Santos, 2002). Acreditamos que as limitações no estabelecimento de respostas biológicas a doses de US (Robertson, 2002), bem como discrepâncias entre resultados de estudos na literatura, também possam estar vinculada às diferenças nos parâmetros encontrados entre os aparelhos de US.

Conclusões

O presente trabalho objetivou analisar o efeito dos métodos terapêuticos, ultrassom e fonoforese, no tratamento da lesão muscular aguda. Inicialmente, foi desenvolvido um estudo de revisão de literatura para analisar os modelos de lesão muscular de origem mecânica em animais, descrito no Capítulo I desta tese. A análise apresentou três modelos distintos e, nos levou a concluir que a contusão muscular é a mais utilizada e com maiores semelhanças ao respectivo trauma em humano. A partir disso, foi possível desenvolver em parceria com o Laboratório Grupo de Mecânica Aplicada da UFRGS um instrumento para replicação da lesão por contusão em animais.

No intuito de avaliar o efeito da fonoforese sobre a fase aguda do processo inflamatório de lesões musculares, optou-se pelo uso de medicamento anti-inflamatório tópico. A escolha do AINE foi baseado nos parâmetros de permeação *in vitro* que apresentou melhores resultados associado com o US, conforme descritos no Capítulo II. A partir desse trabalho concluiu-se que o cetoprofeno apresentou-se como a melhor opção em relação ao diclofenaco de sódio, em quantidades permeadas e fluxo, quando utilizado com o US pulsado.

Para verificar o efeito do US e fonoforese sobre o processo inflamatório muscular (Capítulo III), foi desenvolvido um estudo *in vivo* para análise de parâmetros de estresse oxidativo, bem como marcadores de inflamação celular e tecidual. Segundo os resultados, o US pulsado tem uma tendência a melhorar os níveis de defesa antioxidante não enzimática logo após período inflamatório da lesão, uma vez que origina valores semelhantes ao grupo controle sem entretanto diferir estatisticamente do grupo lesionado. Além disso, também não diferiu em valores obtidos com marcadores de inflamação e aspectos morfológicos de regeneração muscular. A fonoforese por sua vez, não apresentou efeito significativo sobre os parâmetros de estresse oxidativo e marcadores inflamatório. O tratamento de AINE mostrou-se mais efetivo quando analisado os aspectos morfológicos do tecido muscular após 72 h da lesão.

Em síntese, a partir dos parâmetros utilizados neste estudo, concluímos que o US e a fonoforese não foram capazes de influenciar o processo inflamatório ou o estado redox da célula, sugerindo que o processo inflamatório transcorreu espontaneamente. Todavia, para efeitos de regeneração tecidual completa, é necessário a avaliação das etapas de reparo e remodelamento tecidual, que não foram contempladas neste estudo.

4 Perspectivas

- Avaliação das medidas de prostaglandinas para estimar indiretamente a atividade da COX-2.
- Reavaliação do modelo de lesão por contusão, utilizando outros marcadores de lesão, além da enzima creatina quinase e, com variações na gravidade da lesão.
- Avaliação do efeito do tratamento com US utilizado em dois tempos, semelhante ao aplicado no estudo *in vitro*.
- Avaliação do efeito dos tratamentos propostos nas etapas do reparo e remodelamento muscular após o trauma por contusão.
- Avaliação do efeito dos tratamentos propostos sobre a função e/ou parâmetros biomecânicos após regeneração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams S (Phonophoresis of non-steroidal drugs: a review of the clinical evidence. *International Musculoskeletal Medicine* 30:37-41.2008).
- Aebi H (Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.1984).
- Akimau P, Yoshiya K, Hosotsubo H, Takakuwa T, Tanaka H, Sugimoto H (New experimental model of crush injury of the hindlimbs in rats. *J Trauma* 58:51-58.2005).
- Alderton JM, Steinhardt RA (How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med* 10:268-272.2000).
- Ali K, Leland JM (Hamstring strains and tears in the athlete. *Clin Sports Med* 31:263-272.2012).
- Almekinders LC (Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies. *Sports Med* 28:383-388.1999).
- Ay S, Dogan SK, Evcik D, Baser OC (Comparison the efficacy of phonophoresis and ultrasound therapy in myofascial pain syndrome. *Rheumatol Int* 31:1203-1208.2011).
- Baoge L, Steen EVD, Rimbaut S, Philips N, E.Witvrouw, Almqvist KF, Vanderstraeten G, VandenBossche LC (Treatment of SkeletalMuscle Injury: A Review. *ISRN Orthopedics*.2012).
- Barbero AM, Frasch HF (Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol In Vitro* 23:1-13.2009).
- Barja PR, Veloso DJDV (Photoacoustic study of the penetration kinetics of nimesulid into human skin. *Journal of Physics: Conference Series* 214.2010).
- Barr KP (Review of upper and lower extremity musculoskeletal pain problems. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 18:747-760, vi-vii.2007).
- Bassel-Duby R, Olson EN (Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75:19-37.2006).
- Beetge E, du Plessis J, Muller DG, Goosen C, van Rensburg FJ (The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAID's on their transdermal absorption. *Int J Pharm* 193:261-264.2000).
- Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA (Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem* 179:135-145.1998).

- Beltran L, Ghazikhanian V, Padron M, Beltran J (The proximal hamstring muscle-tendon-bone unit: A review of the normal anatomy, biomechanics, and pathophysiology. *Eur J Radiol*.2011).
- Benson HA (Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv* 2:23-33.2005).
- Best TM, Hunter KD (Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 11:251-266.2000).
- Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM (Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull* 81-82:209-230.2007).
- Brickson S, Hollander J, Corr DT, Ji LL, Best TM (Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 33:2010-2015.2001).
- Brucks R, Nanavaty M, Jung D, Siegel F (The effect of ultrasound on the in vitro penetration of ibuprofen through human epidermis. *Pharm Res* 6:697-701.1989).
- Brunelli S, Rovere-Querini P (The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol Res* 58:117-121.2008).
- Butterfield TA, Best TM, Merrick MA (The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *J Athl Train* 41:457-465.2006).
- Cage SA, Rupp KA, Castel JC, Saliba EN, Hertel J, Saliba SA (Relative Acoustic Transmission of Topical Preparations Used With Therapeutic Ultrasound. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* In Press.2013).
- Cagnie B, Vinck E, Rimbaut S, Vanderstraeten G (Phonophoresis versus topical application of ketoprofen: comparison between tissue and plasma levels. *Phys Ther* 83:707-712.2003).
- Cambier D, D'Herde K, Witvrouw E, Beck M, Soenens S, Vanderstraeten G (Therapeutic ultrasound: temperature increase at different depths by different modes in a human cadaver. *J Rehabil Med* 33:212-215.2001).
- Cannon JG, St Pierre BA (Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem* 179:159-167.1998).
- Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, Reid MB, Li YP (Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1179-1187.2005).
- Crisco JJ, Hentel KD, Jackson WO, Goehner K, Jokl P (Maximal contraction lessens impact response in a muscle contusion model. *J Biomech* 29:1291-1296.1996).

- D'Vaz AP, Ostor AJ, Speed CA, Jenner JR, Bradley M, Prevost AT, Hazleman BL (Pulsed low-intensity ultrasound therapy for chronic lateral epicondylitis: a randomized controlled trial. *Rheumatology (Oxford)* 45:566-570.2006).
- Dalecki D (Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng* 6:229-248.2004).
- Darrow H, Schulthies S, Draper D, Ricard M, Measom GJ (Serum dexamethasone levels after decadron phonophoresis. *J Athl Train* 34:338-341.1999).
- Draper DO, Castel JC, Castel D (Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther* 22:142-150.1995a).
- Draper DO, Schulthies S, Sorvisto P, Hautala AM (Temperature changes in deep muscles of humans during ice and ultrasound therapies: an in vivo study. *J Orthop Sports Phys Ther* 21:153-157.1995b).
- Draper HH, Hadley M (Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-431.1990).
- Dresch MT, Rossato SB, Kappel VD, Biegelmeier R, Hoff ML, Mayorga P, Zuanazzi JA, Henriques AT, Moreira JC (Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal Biochem* 385:107-114.2009).
- Dumont NA, Frenette J (Macrophage Colony-Stimulating Factor-Induced Macrophage Differentiation Promotes Regrowth in Atrophied Skeletal Muscles and C2C12 Myotubes. *The American Journal of Pathology* 182:505-515.2013).
- Durmus D, Alayli G, Goktepe AS, Taskaynatan MA, Bilgici A, Kuru O (Is phonophoresis effective in the treatment of chronic low back pain? A single-blind randomized controlled trial. *Rheumatol Int* 33:1737-1744.2013).
- Ebrahimi S, Abbasnia K, Motealleh A, Kooroshfard N, Kamali F, Ghaffarinezhad F (Effect of lidocaine phonophoresis on sensory blockade: pulsed or continuous mode of therapeutic ultrasound? *Physiotherapy* 98 57-63.2012).
- Ehrhardt J, Morgan J (Regenerative capacity of skeletal muscle. *Curr Opin Neurol* 18:548-553.2005).
- Ekstrand J, Hagglund M, Walden M (Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). *Am J Sports Med* 39:1226-1232.2011).
- Engelmann J, Vitto MF, Cesconetto PA, Silveira PC, Possato JC, Pinho RA, Paula MM, Victor EG, De Souza CT (Pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide gel treatment reduces the expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *Ultrasound Med Biol* 38:1470-1475.2012).

- Escobar-Chavez JJ, Bonilla-Martinez D, Villegas-Gonzalez MA, Rodriguez-Cruz IM, Dominguez-Delgado CL (The use of sonophoresis in the administration of drugs throughout the skin. *J Pharm Pharm Sci* 12:88-115.2009).
- Feucht CL, Patel DR (Analgesics and anti-inflammatory medications in sports: use and abuse. *Pediatr Clin North Am* 57:751-774.2010).
- Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM (Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide* 24:43-49.2011).
- Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM (Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide* 21:157-163.2009).
- Fisher BD, Hiller CM, Rennie SGA (A comparison of continuous ultrasound and pulsed ultrasound on soft tissue injury markers in the rat. *J Phys Ther Sci* 15:65-70.2003).
- Friden J, Lieber RL (Serum creatine kinase level is a poor predictor of muscle function after injury. *Scand J Med Sci Sports* 11:126-127.2001).
- Ghaly A, Marsh DR (Aging-associated oxidative stress modulates the acute inflammatory response in skeletal muscle after contusion injury. *Exp Gerontol* 45:381-388.2010).
- Gharaibeh B, Chun-Lansinger Y, Hagen T, Ingham SJM, Wright V, Fu F, Huard J (Biological Approaches to Improve Skeletal Muscle Healing after Injury and Disease. *Birth Defects Research (Parte C)* 96:82-94.2012).
- Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ (The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury* 43:670-675.2012).
- Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW (Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev* 16:857-868.2007).
- Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW (Model for muscle regeneration around fibrotic lesions in recurrent strain injuries. *Med Sci Sports Exerc* 42:813-819.2010).
- Guirro R, Britshcy Dos Santos SC (Evaluation of the acoustic intensity of new ultrasound therapy equipment. *Ultrasonics* 39:553-557.2002).
- Heiderscheit BC, Sherry MA, Silder A, Chumanov ES, Thelen DG (Hamstring strain injuries: recommendations for diagnosis, rehabilitation, and injury prevention. *J Orthop Sports Phys Ther* 40:67-81.2010).
- Heijden GJMGvd, Leffers P, Wolters PJMC, Verheijden JJD, Mameren Hv, Houben JP, Bouter LM, Knipschild PG (No effect of bipolar interferential electrotherapy and pulsed

- ultrasound for soft tissue shoulder disorders: a randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 58:530-540.1999).
- Herwadkar A, Sachdeva V, Taylor LF, Silver H, Banga AK (Low frequency sonophoresis mediated transdermal and intradermal delivery of ketoprofen. *International Journal of Pharmaceutics* 423:289-296.2012).
- Holcomb WR, Joyce CJ (A Comparison of Temperature Increases Produced by 2 Commonly Used Ultrasound Units. *J Athl Train* 38:24-27.2003).
- Hoogland R (ed.) (1989) *Ultrasound Therapy*. Delft, the Netherlands: Enraf-Nonius.
- Huard J, Li Y, Fu FH (Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 84-A:822-832.2002).
- Humphrey VF (Ultrasound and matter--physical interactions. *Prog Biophys Mol Biol* 93:195-211.2007).
- Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EE, Rigon P, Xavier LL, Achaval M (Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 22:355-366.2008).
- Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Aarimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Jarvinen M (Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21:317-331.2007).
- Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M (Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 33:745-764.2005).
- Jarvinen TA, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H (Muscle strain injuries. *Curr Opin Rheumatol* 12:155-161.2000).
- Johns LD (Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train* 37:293-299.2002).
- Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H (Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports* 10:332-337.2000).
- Kaushik D, Costache A, Michniak-Kohn B (Percutaneous penetration modifiers and formulation effects. *Int J Pharm* 386:42-51.2010).
- Khattak MJ, Ahmad T, Rehman R, Umer M, Hasan SH, Ahmed M (Muscle healing and nerve regeneration in a muscle contusion model in the rat. *J Bone Joint Surg Br* 92:894-899.2010).

- Klaiman MD, Shrader JA, Danoff JV, Hicks JE, Pesce WJ, Ferland J (Phonophoresis versus ultrasound in the treatment of common musculoskeletal conditions. *Med Sci Sports Exerc* 30:1349-1355.1998).
- Kragh JF, Jr., Svoboda SJ, Wenke JC, Brooks DE, Bice TG, Walters TJ (The role of epimysium in suturing skeletal muscle lacerations. *J Am Coll Surg* 200:38-44.2005).
- Kummer CL, Coelho TCRB (Anti-inflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 52:498 - 512.2002).
- Kuntz AR, Griffiths CM, Rankin JM, Armstrong CW, McLoughlin TJ (Cortisol concentrations in human skeletal muscle tissue after phonophoresis with 10% hydrocortisone gel. *J Athl Train* 41:321-324.2006).
- Lavon I, Kost J (Ultrasound and transdermal drug delivery. *Drug Discov Today* 9:670-676.2004).
- Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, de Almeida P, Ramos L, Iversen VV, Bjordal JM (Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *Eur J Appl Physiol* 108:1083-1088.2010).
- Lefaucheur JP, Sebillé A (The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscul Disord* 5:501-509.1995).
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478.1990).
- Li HY, Zhang QG, Chen JW, Chen SQ, Chen SY (The Fibrotic Role of Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt Pathway in Injured Skeletal Muscle after Acute Contusion. *Int J Sports Med*.2013).
- Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J (Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol* 164:1007-1019.2004).
- Li Y, Huard J (Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol* 161:895-907.2002).
- Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB (TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 19:362-370.2005).

- Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD (Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 17:299-311.1992).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.1951).
- Luo L, Sun Z, Zhang L, Li X, Dong Y, Liu TC (Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF-beta1 in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.*2012).
- Machet L, Boucaud A (Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. *Int J Pharm* 243:1-15.2002).
- Machet L, Cochelin N, Patat F, Arbeille B, Machet MC, Lorette G, Vaillant L (In vitro phonophoresis of mannitol, oestradiol and hydrocortisone across human and hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics* 165:169-174.1998).
- Mackey AL, Kjaer M, Dandanell S, Mikkelsen KH, Holm L, Dossing S, Kadi F, Koskinen SO, Jensen CH, Schroder HD, Langberg H (The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell responses in humans. *J Appl Physiol* 103:425-431.2007).
- Maestrelli F, Gonzalez-Rodriguez ML, Rabasco AM, Mura P (Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *Int J Pharm* 312:53-60.2006).
- Malysz T, Ilha J, Severo do Nascimento P, Faccioni-Heuser MC, De Angelis K, D'Agord Schaan B, Achaval M (Exercise training improves the soleus muscle morphology in experimental diabetic nerve regeneration. *Muscle Nerve* 44:571-582.2011).
- Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST (Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil* 86:1304-1310.2005).
- Mathes AL, Lafyatis R (Role for Toll-like receptor 3 in muscle regeneration after cardiotoxin injury. *Muscle Nerve* 43:733-740.2011).
- Maxwell L (Therapeutic Ultrasound: Its Effects on the Cellular and Molecular Mechanisms of Inflammation and Repair. *Physiotherapy* 78:421-426.1992).
- McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ, Devor ST, Merrick MA (Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. *Arch Phys Med Rehabil* 88:936-940.2007).
- McBrier NM, Neuberger T, Okita N, Webb A, Sharkey N (Reliability and validity of a novel muscle contusion device. *J Athl Train* 44:275-278.2009).

- Mehallo CJ, Drezner JA, Bytomski JR (Practical management: nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) use in athletic injuries. *Clin J Sport Med* 16:170-174.2006).
- Meidan VM, Docker MF, Walmsley AD, Irwin WJ (Phonophoresis of hydrocortisone with enhancers: an acoustically defined model. *International Journal of Pharmaceutics* 170:157-168.1998).
- Meidan VM, Walmsley AD, Irwin WJ (Phonophoresis - is it reality? *International Journal of Pharmaceutics* 118:129-149.1995).
- Mendes RT, Stanczyk CP, Sordi R, Otuki MF, dos Santos FA, Fernandes D (Selective inhibition of cyclooxygenase-2: risks and benefits. *Rev Bras Reumatol* 52:767-782.2012).
- Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, Moreland MS, Huard J (Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. *Am J Sports Med* 27:222-229.1999).
- Merrick MA, Bernard KD, Devor ST, Williams MJ (Identical 3-MHz ultrasound treatments with different devices produce different intramuscular temperatures. *J Orthop Sports Phys Ther* 33:379-385.2003).
- Meshali MM, Abdel-Aleem HM, Sakr FM, Nazzal S, El-Malah Y (In vitro phonophoresis: effect of ultrasound intensity and mode at high frequency on NSAIDs transport across cellulose and rabbit skin membranes. *Pharmazie* 63:49-53.2008).
- Mikkelsen UR, Schjerling P, Helmark IC, Reitelsheder S, Holm L, Skovgaard D, Langberg H, Kjaer M, Heinemeier KM (Local NSAID infusion does not affect protein synthesis and gene expression in human muscle after eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports* 21:630-644.2011).
- Minamoto VB, Grazziano CR, Salvini TF (Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. *Anat Rec* 254:281-287.1999).
- Misra HP, Fridovich I (The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175.1972).
- Mitragotri S (Effect of therapeutic ultrasound on partition and diffusion coefficients in human stratum corneum. *J Control Release* 71:23-29.2001).
- Mitragotri S (Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 4:255-260.2005).
- Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R (Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharm Res* 13:411-420.1996).

- Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R (An explanation for the variation of the sonophoretic transdermal transport enhancement from drug to drug. *J Pharm Sci* 86:1190-1192.1997).
- Mizrahi N, Seliktar D, Kimmel E (Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells. *Ultrasound Med Biol* 33:1818-1829.2007).
- Monda M, Vicidomini C, Viggiano A, Sampaolo S, Di Iorio G, Viggiano E, De Luca B (Inhibition of prostaglandin synthesis reduces the induction of MyoD expression in rat soleus muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 30:139-144.2009).
- Myburgh KH, Kruger MJ, Smith C (Accelerated skeletal muscle recovery after in vivo polyphenol administration. *J Nutr Biochem* 23:1072-1079.2012).
- Nguyen HX, Lusic AJ, Tidball JG (Null mutation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and in vivo. *J Physiol* 565:403-413.2005).
- Noble JG, Lee V, Griffith-Noble F (Therapeutic ultrasound: the effects upon cutaneous blood flow in humans. *Ultrasound Med Biol* 33:279-285.2007).
- Nyborg WL (Ultrasonic microstreaming and related phenomena. *Br J Cancer Suppl* 5:156-160.1982).
- Nyborg WL (Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: general review. *Ultrasound Med Biol* 27:301-333.2001).
- O'Brien WD, Jr. (Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 93:212-255.2007).
- Obremsky WT, Seaber AV, Ribbeck BM, Garrett WE, Jr. (Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. *Am J Sports Med* 22:558-561.1994).
- Ogura M, Paliwal S, Mitragotri S (Low-frequency sonophoresis: current status and future prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1218-1223.2008).
- Ota S, Uehara K, Nozaki M, Kobayashi T, Terada S, Tobita K, Fu FH, Huard J (Intramuscular transplantation of muscle-derived stem cells accelerates skeletal muscle healing after contusion injury via enhancement of angiogenesis. *Am J Sports Med* 39:1912-1922.2011).
- Parizotto NA, Koeke PU, Moreno BGD, Lourencin FTC (UTILIZAÇÃO DA FONOFORESE EM DESORDENS MÚSCULO-ESQUELÉTICAS: UMA META-ANÁLISE. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 7:49-55.2003).
- Park EJ, Werner J, Smith NB (Ultrasound mediated transdermal insulin delivery in pigs using a lightweight transducer. *Pharm Res* 24:1396-1401.2007).

- Pellanda CL (Topical bioavailability of glucocorticosteroids. Dermatopharmacokinetic and dermatopharmacodynamic of topically applied triamcinolone acetonide in humans. Thesis - University of Basel 185.2006).
- Pertille A, Macedo AB, Oliveira CP (Evaluation of muscle regeneration in aged animals after treatment with low-level laser therapy. *Rev Bras Fisioter* 16:495-501.2012).
- Pierce AP, de Waal E, McManus LM, Shireman PK, Chaudhuri AR (Oxidation and structural perturbation of redox-sensitive enzymes in injured skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 43:1584-1593.2007).
- Plentz RDM, Stoffel P, Kolling G, Costa S, Beck C, Signori L (Hematological changes produced by 1MHz continuous ultrasound, applied during the acute phase of iatrogenic muscle injury in rats. *Brasilian Journal of Physical Therapy* 12:488-494.2008).
- Polat BE, Hart D, Langer R, Blankschtein D (Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: mechanisms, scope, and emerging trends. *J Control Release* 152:330-348.2011).
- Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R (Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 3:115-124.2004).
- Puntel GO, Carvalho NR, Amaral GP, Lobato LD, Silveira SO, Daubermann MF, Barbosa NV, Rocha JB, Soares FA (Therapeutic cold: An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. *Free Radic Res* 45:125-138.2011).
- Quintero AJ, Wright VJ, Fu FH, Huard J (Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury. *Clin Sports Med* 28:1-11.2009).
- Rahusen FT, Weinhold PS, Almekinders LC (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury. *Am J Sports Med* 32:1856-1859.2004).
- Rigamonti E, Touvier T, Clementi E, Manfredi AA, Brunelli S, Rovere-Querini P (Requirement of Inducible Nitric Oxide Synthase for Skeletal Muscle Regeneration after Acute Damage. *The Journal of Immunology* 190:1767-1777.2013).
- Robertson VJ (Dosage and treatment response in randomized clinical trials of therapeutic ultrasound. *Physical Therapy in Sport* 3:124-133.2002).
- Rodas G, Pruna R, Til L, Martín C (Clinical Practice Guide for muscular injuries. Epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. *Apunts Med Esport* 164:179-203.2009).
- Rosim GC, Barbieri CH, Lancas FM, Mazzer N (Diclofenac phonophoresis in human volunteers. *Ultrasound Med Biol* 31:337-343.2005).

- Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J (Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve* 28:365-372.2003).
- Schmook FP, Meingassner JG, Billich A (Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm* 215:51-56.2001).
- Shatwell KP, Segal AW (NADPH oxidase. *Int J Biochem Cell Biol* 28:1191-1195.1996).
- Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J (NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am J Pathol* 167:1105-1117.2005).
- Shu B, Yang Z, Li X, Zhang LQ (Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion. *Cell Biochem Biophys* 62:329-336.2012).
- Signori LU, Costa ST, Neto AF, Pizzolotto RM, Beck C, Sbruzzi G, Silva AM, Plentz RD (Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. *Physiotherapy* 97:163-169.2011).
- Silva CMD, Pinto MVdM, Barbosa LG, Filho SDDS, Rocha LLV, Gonçalves RV (Effect of ultrasound and hyaluronidase on gynoid lipodystrophy type II – An ultrasonography study. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy* Feb.2013).
- Silveira F, Barja P, Acosta-Avalos D (Photoacoustic evaluation of the penetration of piroxicam gel applied with phonophoresis into human skin. *Journal of Physics: Conference Series* 214.2010a).
- Silveira PC, 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 Med Biol* 36:44-50.2010b).
- Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH (The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med* 38:947-969.2008).
- Somaglino L, Bouchoux G, Mestas JL, Lafon C (Validation of an acoustic cavitation dose with hydroxyl radical production generated by inertial cavitation in pulsed mode: application to in vitro drug release from liposomes. *Ultrason Sonochem* 18:577-588.2011).
- St Pierre BA, Tidball JG (Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 77:290-297.1994).
- Straub SJ, Johns LD, Howard SM (Variability in effective radiating area at 1 MHz affects ultrasound treatment intensity. *Phys Ther* 88:50-57.2008).

- Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S (An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophys J* 84:3087-3101.2003).
- Supinski GS, Callahan LA (Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J Appl Physiol* 102:2056-2063.2007).
- Tang H, Blankschtein D, Langer R (Effects of low-frequency ultrasound on the transdermal permeation of mannitol: comparative studies with in vivo and in vitro skin. *J Pharm Sci* 91:1776-1794.2002a).
- Tang H, Wang CC, Blankschtein D, Langer R (An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasound-mediated transdermal drug transport. *Pharm Res* 19:1160-1169.2002b).
- Taylor RF, Schultz JS (eds.) (1996) *Handbook of Chemical and Biological Sensors.*: IOP Publishing Ltd.
- ter Haar G (Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol* 93:111-129.2007).
- Tezel A, Mitragotri S (Interactions of inertial cavitation bubbles with stratum corneum lipid bilayers during low-frequency sonophoresis. *Biophys J* 85:3502-3512.2003).
- Tezel A, Sens A, Mitragotri S (Investigations of the role of cavitation in low-frequency sonophoresis using acoustic spectroscopy. *J Pharm Sci* 91:444-453.2002).
- Tezel A, Sens A, Tuchscherer J, Mitragotri S (Frequency dependence of sonophoresis. *Pharm Res* 18:1694-1700.2001).
- Toumi H, F'Guyer S, Best TM (The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J Anat* 208:459-470.2006).
- Trappe TA, Carroll CC, Dickinson JM, LeMoine JK, Haus JM, Sullivan BE, Lee JD, Jemiolo B, Weinheimer EM, Hollon CJ (Influence of acetaminophen and ibuprofen on skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R655-662.2011).
- Trappe TA, Standley RA, Jemiolo B, Carroll CC, Trappe SW (Prostaglandin and myokine involvement in the cyclooxygenase-inhibiting drug enhancement of skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304:198-205.2013).
- Trojian TH (Muscle contusion (thigh). *Clin Sports Med* 32:317-324.2013).
- Trommer H, Neubert RH (Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* 19:106-121.2006).

- Turner NJ, Badylak JS, Weber DJ, Badylak SF (Biologic Scaffold Remodelling in a Dog Model of Complex Musculoskeletal Injury. *Journal of Surgical Research* In press:1-13.2012).
- Urso ML (Anti-Inflammatory Interventions and Skeletal Muscle Injury: Benefit or Detriment? *J Appl Physiol* 28.2013).
- Urso ML, Szelenyi ER, Warren GL, Barnes BR (Matrix metalloprotease-3 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 mRNA and protein levels are altered in response to traumatic skeletal muscle injury. *Eur J Appl Physiol* 109:963-972.2010).
- van der Windt DA, van der Heijden GJ, van den Berg SG, ter Riet G, de Winter AF, Bouter LM (Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: a systematic review. *Pain* 81:257-271.1999).
- VanBavel E (Effects of shear stress on endothelial cells: possible relevance for ultrasound applications. *Prog Biophys Mol Biol* 93:374-383.2007).
- Victor EG, Silveira PC, Possato JC, da Rosa GL, Munari UB, de Souza CT, Pinho RA, da Silva L, Streck EL, Paula MM (Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *J Nanobiotechnology* 10:11.2012).
- Vlak T ([Comparative study of the efficacy of ultrasound and sonophoresis in the treatment of painful shouder syndrome]. *Reumatizam* 46:5-11.1999).
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281 (Pt 1):21-40.1992).
- Warden SJ, McMeecken JM (Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound Med Biol* 28:1075-1080.2002).
- Warren GL, Summan M, Gao X, Chapman R, Hulderman T, Simeonova PP (Mechanisms of skeletal muscle injury and repair revealed by gene expression studies in mouse models. *J Physiol* 582:825-841.2007).
- Watson T (The role of electrotherapy in contemporary physiotherapy practice. *Man Ther* 5:132-141.2000).
- Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST (Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 25:73-77.2004).

Yildiz N, Atalay NS, Gungen GO, Sanal E, Akkaya N, Topuz O (Comparison of ultrasound and ketoprofen phonophoresis in the treatment of carpal tunnel syndrome. *J Back Musculoskelet Rehabil* 24:39-47.2011).

ANEXO I

Date: Jul 16, 2013
To: "Jaqueline de Souza" jaquelinesz@yahoo.com.br
cc: francesco.felici@uniroma4.it
From: Francesco Felici francesco.felici@uniroma4.it
Subject: Decision on your submission - JEK-D-13-00033R1
Ms. Ref. No.: JEK-D-13-00033R1
Title: MUSCLE INJURY: REVIEW OF EXPERIMENTAL MODELS
Journal of Electromyography and Kinesiology

Dear Jaqueline,

I am pleased to confirm that your paper is accepted and forwarded to the Publisher.

The Production Department will contact you shortly regarding the proof of your article.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to Journal of Electromyography and Kinesiology.

Yours sincerely,

Moshe Solomonow, PhD, MD (hon)
Editor in Chief
Journal of Electromyography and Kinesiology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

APÊNDICE I

Prensa Lesionadora.

Tendo em vista a necessidade de causar lesões controladas em cobaias, foi projetado um dispositivo chamado Prensa Lesionadora. O equipamento foi concebido tendo como base de referência prensas já existentes no mercado, sendo que esse foi projetado e fabricado visando o menor custo e adequação às atuais necessidades de pesquisa.

O Instrumento foi desenvolvido segundo modelos descritos na literatura: Crisco et al (1996), Minamoto et al (1999), McBrier et al (2009). O projeto foi realizado no Laboratório Grupo de Mecânica Aplicada, do Departamento de Engenharia Mecânica da UFRGS.

Para a execução do projeto foram observados alguns itens como material empregado, manuseio e utilização do equipamento. A prensa pode acumular energia de até 1,5 Joules, dependendo da combinação de massas a serem utilizadas e de acordo com a escala de altura. Na execução e durante os testes não foi necessário o uso de acelerômetros, pois os corpos de prova influenciariam nos resultados, realizamos cálculos simples tendo como referência a base de metal (mesa) e altura em que as massas serão “soltas”.

A prensa lesionadora apresenta capacidade de energia e de lesão a tecidos moles (em especial, ao músculo) semelhante ao descrito na literatura e equivalente àquelas disponíveis no mercado.

Os materiais utilizados foram:

- Chapa de Nylon;
- Barra de Alumínio 10mm;
- Chapa de Acrílico transparente;
- Parafusos fenda M3, Allen M4, Borboleta M5;
- Cola Epoxi;
- Botoeira;
- Massas aço e bronze;

Segue abaixo foto ilustrativa do equipamento e o desenho com vista explodida:



