

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA CRIOTERAPIA E DO ULTRASSOM
TERAPÊUTICO NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA APÓS LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA EM RATOS

Cassio Noronha Martins

Dissertação submetida como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, sob a orientação do Prof. Dr. Luis Ulisses Signori e coorientação do Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa, do Instituto de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luis Ulisses Signori
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa

RIO GRANDE
Agosto de 2014

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, professor Dr. Luis Ulisses Signori que acreditou em mim desde o momento do meu ingresso no programa de pós-graduação em ciências fisiológicas, assim como no meu potencial, aceitando a tarefa de me orientar e com a ajuda dele evolui academicamente e profissionalmente. Sem a sua paciência, dedicação, atenção e confiança, não teria chegado ao final dessa jornada acadêmica.

Agradeço ao meu coorientador professor Dr. Carlos Eduardo da Rosa que, com sua experiência profissional, acadêmica e laboratorial me acresceu em diversos aspectos e a ele devo muito, pois sem ele não conseguiria realizar essa jornada. Além disso, me fez buscar o raciocínio lógico e do porquê de cada análise, de cada reagente, reação e resultado.

Ao meu grupo de pesquisa que sempre me ajudou nas minhas coletas e análises, devo a eles muito mais e espero em breve retribuir com publicações. Agradeço também ao grupo da fluxometria que, além do espaço cedido, ajudaram nas coletas e análises dos dados.

Aos professores do programa de pós-graduação que com suas experiências e intelectualidades deram-me uma visão do que é fisiologia animal comparada e me ajudando a crescer intelectualmente. Agradeço também aos meus colegas e amigos pós-graduandos que de alguma forma direta ou indireta ajudaram a concluir mais uma etapa da minha vida.

A todos muito obrigado!

Lista de abreviaturas

LIPUS	Ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade
UST	Ultrassom terapêutico
CK	Creatina quinase
LDH	Lactato desidrogenase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
LPO	Lipoperoxidação
ACAP	Capacidade antioxidante contra o radical peroxil
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathiona peroxidase
TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
SPTA	<i>Spatial average temporal peak</i> - média espacial dos picos temporal
SATA	<i>Spatial average temporal average</i> - média espacial das médias temporal
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear Kappa Beta
I κ B	Proteína inibidoras da KB
IKK	I κ B kinase
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
NOHarginina	N ^w -Hidroxi-L-arginina
FMN	Flavilina mononucleotídeo
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
BH ₄	Tetra-hidrobiopterina
COX	Ciclooxigenase
PGE ₂	Prostaglandinas da família E
PTGS	Prostaglandina-endoperoxido sintase
PGI ₂	Prostaciclina
TXA ₂	Tromboxanos
LOX	Lipooxigenase
IGF-1	Fator de crescimento derivado da insulina 1

HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
β FGF	Fator de crescimento fibroblástico beta
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador beta 1
CG	Catepsina G
NE	Elastase de neutrófilos
PR3	Proteinase 3
INF- γ	Interferon-gama
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
IL	Interleucina
LT α	Linfotoxina alfa
LT β	Linfotoxina beta
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
ICAM	Molécula de adesão intercelular
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
ELAM	Molécula de adesão leucocitária endotelial
SAA	Soro amilóide A
HDL	Lipoproteína de alta densidade
c-IAP-1	Inibidor de apoptose celular protein-1
c-IAP-2	Inibidor de apoptose celular protein-2
c-MYC	Proto-oncogeneo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
AINEs	Drogas anti-inflamatórias não-esteróidais
HSP-70	Proteínas de choque térmico-70kDa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Lesão muscular esquelética.....	10
1.2 Estresse oxidativo	12
1.3 Modelos de lesão muscular experimentais.....	13
1.4 Crioterapia.....	15
1.5 Ultrassom Terapêutico (UST).....	16
2. OBJETIVO	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. ARTIGO	19
4. DISCUSSÃO GERAL	47
5. CONCLUSÃO	51
6. PERSPECTIVAS	51
7. BIBLIOGRAFIA GERAL.....	53

RESUMO

Introdução: As lesões musculoesqueléticas são comuns nas práticas de atividade física e/ou esportivas. A crioterapia e o ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade (LIPUS) são intervenções não farmacológicas utilizadas no tratamento dessas lesões. Na prática clínica estas terapias são usualmente combinadas, porém não existem evidências de que esta associação apresente benefícios adicionais à reabilitação.

Objetivo: Avaliar os efeitos isolados e associados da crioterapia e do ultrassom terapêutico sobre os parâmetros de estresse oxidativo, de dano muscular e resposta inflamatória após lesão musculoesquelética por contusão.

Metodologia: Com a aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/FURG nº P034/2012) foram utilizados no estudo sessenta ratos wistar machos, pesando mais de 300g, os quais foram randomizados e divididos homogeneamente em cinco grupos (n=12/grupo): controle, lesão sem tratamento, lesão tratada com crioterapia, lesão tratada com (LIPUS) e lesão tratada com a associação dos recursos. O protocolo de lesão muscular (gastrocnêmio direito) foi realizado por esmagamento mecânico. A crioterapia foi utilizada imediatamente após a lesão (imersão em água a 10°C, por 20min) e o LIPUS após 24 horas (1MHz, 0.4W/cm²SPTA; pulsado 20%; subaquático, 5min de aplicação). A associação compreendeu os procedimentos anteriores com o ultrassom aplicado nos últimos 5min da imersão na água. Os animais foram tratados a cada 8 horas por 72 horas. A concentração das espécies reativas de oxigênio (ERO), lipoperoxidação (LPO), capacidade antioxidante contra os radicais peroxil (ACAP) e catalase (CAT) foram medidas no tecido muscular. A creatina quinase (CK), a lactato desidrogenase (LDH) e a proteína C-reativa ultrasensível (PCR) foram analisadas no plasma sanguíneo. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (DP). A análise de variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis foram

aplicados quando apropriado e estes foram seguidos pelo post-hoc de Tukey. A significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerada.

Resultados: A lesão aumentou no tecido muscular a concentração das ERO ($p = 0,003$), a LPO ($p < 0,001$), a CAT ($p < 0,001$) e reduziu a ACAP ($p < 0,001$), além de aumentar os níveis plasmáticos da CK ($p < 0,001$), da LDH ($p = 0,002$) e da PCR ($p < 0,001$). A crioterapia reduziu a LPO ($p < 0,001$), a ACAP ($p < 0,001$), a CK ($p < 0,001$), a LDH ($p = 0,002$) e a PCR ($p < 0,01$) em relação ao grupo lesão. O LIPUS também reduziu LPO ($p < 0,001$), ACAP ($p < 0,001$), a CK ($p < 0,001$), a LDH ($p = 0,002$) e a PCR ($p < 0,01$) em relação ao grupo lesão. A associação manteve os resultados dos tratamentos anteriores e acresceu os níveis da ACAP ($p < 0,001$), da CAT ($p < 0,001$) e reduziu a concentração das ERO ($p = 0,003$) em relação ao grupo lesão.

Conclusão: A associação da crioterapia e do ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade aplicado como tratamento na fase inflamatória da lesão musculoesquelética aumenta a capacidade antioxidante contra o radical peróxido, a atividade da catalase e reduz a formação das espécies reativas de oxigênio em relação às terapias individuais. Desta forma a utilização das técnicas associadas melhora o estado oxidativo na fase inflamatória após a lesão muscular esquelética.

Palavras-chave: Reabilitação; Músculo esquelético; Inflamação; Estresse oxidativo; Crioterapia.

ABSTRACT

Background: Musculoskeletal injuries are frequent in physical and/or sporting activity. Cryotherapy and low intensity pulsed therapeutic ultrasound (LIPUS) are nonpharmacological interventions employed in treatment of this injuries. Usually, they are used combined in clinical practice, however, without scientific evidences that this association had additional benefits to rehabilitation.

Objective: To evaluate the isolated and associated effects of cryotherapy and therapeutic ultrasound on oxidative stress parameters, muscular damage and inflammatory response after musculoskeletal injury by contusion.

Methodology: Sixty male Wistar rats were used in study after approval by Ethics Committee in Animal Use (CEUA/FURG n° P034/2012), weighing more than 300g which are randomized and divided homogeneously in five groups (n=12/group): control, lesion without treatment, lesion treated with cryotherapy, lesion treated with LIPUS and lesion treated with association of resources. The muscle injury protocol (gastrocnemius right) was performed by mechanical crushing. Cryotherapy was applied immediately after injury (immersion in water at 10°C during 20min), and LIPUS only after 24h (1MHz, 0.4W/cm²SPTA, 20% duty cycle, underwater, 5min). Association comprised the previous procedures with ultrasound's application in the last 5min of water immersion. The animals were treated every 8h for 72h. Concentration of reactive oxygen species (ERO), lipoperoxidation (LPO), antioxidant capacity against peroxy radical (ACAP) and catalase (CAT) were measured in muscle tissue. Creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and C-reactive protein (PCR) were analyzed in blood plasma. The data are expressed like mean ± standard deviation (DP). Analysis of variance (ANOVA) and Kruskal-Wallis test were employed with Tukey's post-hoc test. A significance of 5% (p<.05) were considered.

Results: The injury increased ERO ($p=.003$), and decreased LPO ($p<.001$), CAT ($p<.001$) and ACAP ($p<.001$) concentration in muscle tissue besides increases plasmatic levels of CK ($p<.001$), LDH ($p=.002$) and PCR ($p<.001$). Cryotherapy decreased LPO ($p<.001$), ACAP ($p<.001$), CK ($p<.001$), LDH ($p=.002$) and PCR ($p<.01$) in relation to lesion without treatment group. LIPUS also decreased LPO ($p<.001$), ACAP ($p<.001$), CK ($p<.001$), ($p=.002$) and PCR ($p<.01$) in relation to lesion without treatment group. Association kept this results, and increased levels of ACAP ($p<.001$) and CAT ($p<.001$), and decreased ERO's concentration ($p=.003$) in relation to lesion without treatment group.

Conclusion: Cryotherapy and low intensity pulsed therapeutic ultrasound association employed in inflammatory phase of musculoskeletal injury treatment increases antioxidant capacity against peroxy radical, catalase's activity, and decreases the formation of reactive oxygen species in relation to individual's treatments. Therefore, utilization of this association improves the oxidative state in inflammatory phase after skeletal muscle injury.

Key words: Rehabilitation, Muscle skeletal, Inflammation, Oxidative stress, Cryotherapy.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesão muscular esquelética

No corpo humano, o músculo esquelético é um dos tecidos mais abundantes e está exposto a vários tipos de lesões. Dentre a geração de lesões musculoesqueléticas, as atividades físicas e/ou esportivas são responsáveis por cerca de 10-55%.^{1,2} Atletas são mais suscetíveis às lesões musculares, as quais ocorrem devido a uma variedade de mecanismos, sendo classificados em dois tipos: traumas diretos (contusões, lacerações ou distensões) e traumas indiretos (isquemia ou disfunções neurológicas).³ Sendo assim, a lesão muscular é um importante campo de estudo e atuação nas áreas da traumatologia,⁴ da medicina esportiva e da reabilitação.³ As lesões são divididas em quatro fases sequenciais e sobrepostas denominadas por degeneração, inflamação, reparo (regeneração) e remodelamento/fibrose,^{5,6} as quais estão descritas a seguir.

-fase da degeneração (destruição): fase na qual ocorre a ruptura e a morte (necrose) das células musculoesqueléticas, conseqüente formação de hematoma entre as miofibrilas rompidas e o início das reações pró-inflamatória.⁶ Nesta fase, ocorre a ruptura de capilares e das miofibrilas adjacentes, os mastócitos do tecido conjuntivo desencadeiam a sinalização de mediadores químicos (citocinas) que irão ativar células imunológicas e iniciarão a fase inflamatória.²

-fase inflamatória: nesta fase ocorre a diapedese ou migração transendotelial (infiltração de glóbulos brancos da circulação para o tecido),⁷ além do aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, quimiotaxia de células inflamatórias⁵ e fagocitose (proteólise) do tecido necrosado. Esta fase apresenta uma sintomatologia característica (rubor, edema, calor, dor e perda de função).⁵

-fase do reparo (regeneração): fase na qual ainda está ocorrendo a fagocitose do tecido necrosado, regeneração das miofibrilas, aumento da expressão e atividade de

fatores de crescimento (fator de crescimento derivado da insulina 1 [IGF-1], fator de crescimento de hepatócitos [HGF], fator de crescimento fibroblástico beta [β FGF] e fator de crescimento transformador beta 1 [TGF- β 1]), células de adesão e concomitante produção de tecido cicatricial (fibrina e fibronectina), ocorre ainda a revascularização da área lesada devido a formação de novos capilares (angiogênese).^{5,6}

-fase do remodelamento (fibrose): período em que ocorre a maturação das novas miofibrilas, retração e reorganização do tecido cicatricial, que levam a recuperação da capacidade funcional.⁶ Neste período, o local de lesão está totalmente preenchido pelo tecido de granulação enriquecido com fibras de colágeno do tipo I. Com o aumento da reposição de colágeno, apoptose de fibroblastos e células endoteliais forma-se o tecido cicatricial. Nesta fase os eosinófilos e os linfócitos aparecem e podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento, assim como efetores do processo imunológico.⁸

As lesões musculares independentemente do tipo apresentam um comportamento temporal similar entre as fases. A fase inicial (destruição e inflamação) ocorre entre o 1º e o 5º dia, a segunda fase (reparação) entre a 3ª e 4ª semana e a terceira fase (remodelamento) pode se estender até o 6º mês.^{3,7,9} A lesão muscular causa o rompimento do sarcolema e extravasamento de proteínas intracelulares para o meio extracelular, estas proteínas após a injúria são encontradas circulando livremente no plasma sanguíneo.² Enzimas como a creatina quinase (CK)¹⁰ e a lactato desidrogenase (LDH) são importantes enzimas do metabolismo energético^{10,11} e são encontradas no citosol e/ou nas mitocôndrias. A CK e a LDH tem sido utilizadas como marcadores de lesão e regeneração muscular.^{10,12,13}

Dependendo da gravidade da lesão, ocorre o rompimento de capilares que juntamente com as miofibrilas vizinhas irão desencadear a sinalização através de citocinas pró-inflamatórias. Estes mediadores promovem a quimioatração dos

neutrófilos e dos monócitos circulantes no sangue para seus locais de atuação, está a resposta é chamada de imune inata.^{14,15} Os neutrófilos envolvem os patógenos em um fagossoma, onde depois de engolfados, os microrganismos são destruídos através de uma combinação de espécies reativas de oxigênio (ERO), proteases e peptídeos antimicrobianos.¹⁶ Em relação às ERO, os neutrófilos apresentam um mecanismo superóxido-dependente, que proporciona a morte celular das miofibrilas danificadas.⁷

Os monócitos com a ocorrência da lesão penetram no músculo lesado e diferenciam em macrófagos (resposta imunidade adaptativa). Deste modo, os macrófagos diferenciados irão se agregar com os já presentes no tecido muscular (epinício e perimísio) potencializando a resposta imune inata.^{2,17} Esta resposta é chamada de monocitose e seu início se dá em algumas horas após a lesão substituindo os leucócitos polimorfonucleares.³

1.2 Estresse oxidativo

A produção de espécies reativas é um fenômeno biológico comum nas células eucariontes,¹⁸ assim como a produção de antioxidantes enzimáticos que fazem o controle dessas moléculas. Nos tecidos dos mamíferos, o oxigênio (O_2) e a NO são rapidamente convertidos em ERON, sendo que os intermediários mais importantes são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$).¹⁹ O organismo apresenta diversas defesas contra essas ERON, os antioxidantes enzimáticos superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT)^{20,21} e não enzimáticos (ácido úrico, vitaminas A, C, E).^{22,23}

Sendo assim, o desequilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes podem conduzir a danos macromoleculares, interrupção dos circuitos tíois alterando a sinalização celular e disfunção no controle redox é definido como estresse oxidativo.^{24,25} Esses danos podem ocorrer nas membranas lipídicas, proteínas celulares e no DNA

podendo acarretar em funções anormais das células.^{24,25} Todavia, as ERON são moléculas de sinalização e possuem um papel vital em diferentes processos fisiológicos como regulação do crescimento e diferenciação celular, inativação da NO, alteração na atividade da matriz extracelular e modulação da produção de citocinas²⁶ pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa-beta (NF- κ B).²⁷

1.3 Modelos de lesão muscular experimentais

As lesões mais frequentes em humanos são decorrentes de contusões, lacerações e distensões ou estiramentos.²⁸ As contusões e distensões são os tipos mais comuns de lesão muscular e responsáveis por aproximadamente 90% das lesões musculares no esporte.⁶ A contusão é uma lesão na qual o tecido é exposto a uma força de esmagamento, onde o músculo sofre uma compressão rápida e forte⁶ e ela pode ser realizada de forma direta ou indireta.²

O modelo experimental é usado principalmente para avaliar os possíveis métodos de tratamento para a lesão por contusão que facilitem o processo de regeneração muscular, redução do tempo da fase inflamatória, assim como, evitar danos em miofibrilas não danificadas. Para o melhor entendimento das diferentes fases que a compreendem (degeneração, inflamação, regeneração e remodelamento) a mioregeneração, bem como, a ação de agentes farmacológicos e não farmacológicos, vem sendo utilizados uma variedade de modelos animais, nos quais foram desenvolvidas e empregadas modelos ou técnicas para reproduzir essas interações.²

Estudar esta interação em seres humanos apresenta limitações metodológicas e éticas. As questões metodológicas se devem a dificuldade na obtenção de um número amostral relevante, controle das fases da lesão muscular e a coleta de tecido muscular (biópsia). Os aspectos éticos envolvidos remetem as fases iniciais dos estudos, onde

nestas justifica-se o uso de animais e após demonstrado resultados relevantes os estudos evoluem para a fase clínica.

A maioria dos estudos com modelo animal vem utilizando a forma direta, não penetrante reproduzida pela queda de um peso impactando no ventre muscular.²⁹⁻³² Esse modelo é mais próximo da reprodução da lesão por contusão, pois o mecanismo assemelhasse com o qual ocorre em seres humanos. A forma indireta de reproduzir a lesão pode ser desenvolvida cirurgicamente, através de corte direto ao músculo³³⁻³⁵ ou expondo o ventre muscular e o esmagando para formar a lesão.³⁶ Estes modelos não são compatíveis com a lesão por contusão que ocorrem em seres humanos, este tipo de intervenção torna-se desapropriada, pois danifica a pele e os tecidos adjacentes, isso leva inicialmente ao aumento dos níveis de citocinas que possivelmente não estão relacionados com o trauma das miofibrilas.² Outro modelo de reproduzir a lesão muscular é com a criolesão, técnica que gera uma injúria a partir do congelamento e descongelamento de parte do músculo.³⁷ Esta também torna-se incompatível com as lesões ocorridas nos seres humanos.

Esses diferentes modelos de lesão vem sendo utilizados para estudar os efeitos de terapias como: o ultrassom terapêutico,^{30,32,34,35,37} exercícios físicos,³⁰ crioterapia,³⁸ laser terapêutico,³⁷⁻³⁹ medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides⁴⁰ e a terapias antifibróticas.⁴¹ Na prática clínica, terapias farmacológicas e não-farmacológicas vem sendo utilizados no tratamento do processo inflamatório. Em relação às terapias farmacológicas, o uso de drogas anti-inflamatórias não-esteróides (AINEs) e dos glicocorticoides apresentam benefícios no tratamento de lesões musculares em seres humanos,⁴² onde a maioria apresenta como sítio de ação relacionado às alterações na cascata do ácido araquidônico,⁴³ contudo, terapias não-farmacológicas apresentam

menores efeitos colaterais comparados a terapias farmacológicas quando utilizados por longos períodos.

1.4 Crioterapia

A crioterapia é amplamente utilizada para tratamento das lesões musculares, bem como, na prevenção dos danos secundários.⁴⁴ Esse recurso terapêutico apresenta diversas denominações descritas na literatura como: hipotermia terapêutica, crioterapia ou banho de imersão no gelo. O papel mais notavelmente da crioterapia é a redução do metabolismo e da inflamação.⁴⁵ A imersão na água fria dos tecidos moles como técnica terapêutica possui o intuito de promover vasoconstrição, além de reduzir edemas, fadiga e a dor.⁴⁶ Sabe-se que os mamíferos apresentam capacidade de suportar grandes quedas de temperatura no ambiente (10°C) por longos períodos (4h)⁴⁷ e isso se dá pela capacidade de termoregulação desses animais.⁴⁸

A aplicação da crioterapia mostra reduzir a concentração das ERO no plasma após lesão musculoesquelética, assim como, o dano lipídico (TBARS), além de reduzir a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase,⁴⁹ atenua na resposta inflamatória pela redução da formação das citocinas (IL-1 α e IL-1 β)⁵⁰ favorecendo a recuperação da lesão. A hipotermia terapêutica a 10°C, por uma hora aumenta os níveis de IL-10 e da expressão de proteínas de choque térmico (HSP-70) e diminui a produção de IL-6.⁵¹ Já a 18°C pelo mesmo período de tempo favorece o processo de angiogênese e de termogênese. A aplicação crônica da crioterapia demonstrou a capacidade de aumentar a expressão de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), tanto no músculo cardíaco como no músculo esquelético.⁵² A hipotermia terapêutica possui ainda a capacidade em atuar nas vias adrenérgicas/noradrenérgicas regulando a atividade das citocinas.⁵³ Entretanto, o banho de imersão a 14°C por 1h durante 6 semanas, aumentou

os níveis sanguíneos de linfócitos, monócitos e de TNF- α e sem modificações da IL-6, IL-1b.⁵⁴

1.5 Ultrassom Terapêutico (UST)

O ultrassom terapêutico (UST) é um recurso físico que produz uma energia mecânica, em contato com as estruturas corporais essa energia se transforma em energia cinética.⁵⁵ Seus efeitos terapêuticos dependem dos parâmetros como frequência (1 a 3MHz), intensidade (0,1 a 3W/cm^{2SPTA}), tempo de aplicação (1 a 10 min) e tipo de onda (contínuo e pulsado).^{56,57} O ultrassom terapêutico de baixa intensidade (LIPUS) (0.1 a 3 W/cm²) é amplamente empregado na prática clínica, em especial no tratamento e/ou reabilitação de lesões do sistema musculoesquelético.⁵⁸ Efeitos biológicos estabelecidos pelo LIPUS é normalmente resultado das forças mecânicas associadas com a *micro-streaming*, ondas de pressão e calor.^{57,59-62} Os efeitos térmicos são devido à absorção da onda ultrassônica pelos tecidos e os efeitos mecânicos estão associados com oscilações estáveis de micro-bolhas.^{59,60}

Dentre os efeitos terapêuticos do UST destacam-se, o aumento e a proliferação celular, a síntese de proteínas na reparação tecidual,⁶³ a vasodilatação dependente do endotélio,⁶⁴ a redução da neutrofilia^{34,35} e da lipoperoxidação após lesão muscular.⁵⁸ Estudo prévio demonstrou que o UST no modo contínuo (1Mhz, 0,08W/cm^{2SAT}, por 5 min) aplicado imediatamente após a lesão muscular aumenta o processo inflamatório.³³ Por outro lado, o UST no modo pulsado nas mesmas condições, reduziu os neutrófilos, os monócitos, os linfócitos³⁴ e o fibrinogênio após lesão muscular aguda em ratos wistar.³⁵

A utilização do UST para facilitar a absorção de drogas transdérmicas é chamada de fonoforese.⁶⁵ Esse recurso promove a permeação dos fármacos através da pele por convecção,⁶⁶ cavitação e pelos efeitos térmicos.⁶⁷ O mecanismo principal de

permeação através da pele ocorre por cavitação acústica, que é definida como o processo em que as bolhas de ar interagem com a pressão acústica e oscilam em torno de um raio de equilíbrio (cavitação não-inercial ou estável), ou que leva ao seu colapso (cavitação inercial ou transitória).^{67,68} No UST (1MHz) a cavitação não-inercial é o principal responsável pela penetração das partículas^{57,69} facilitando a passagem de medicamentos e potencializando o tratamento da lesão muscular.

Os estudos descritos anteriormente sugerem os efeitos anti-inflamatórios favoráveis ao uso da crioterapia e do ultrassom terapêutico de baixa intensidade (LIPUS) na fase inflamatória da lesão musculoesquelética, entretanto a associação destes recursos terapêuticos, comumente utilizada na área clínica, ainda não foi estudada. O presente estudo visou contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de ação destes recursos sobre o processo inflamatório após lesão muscular, especificamente sobre a concentração das espécies reativas de oxigênio, lipoperoxidação e defesas antioxidantes, bem como, sobre os marcadores inflamatórios.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos isolados e associados da crioterapia e do ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade sobre os parâmetros de estresse oxidativo, de dano muscular e marcador inflamatório após lesão musculoesquelética.

2.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos deste estudo buscamos avaliar os efeitos isolados e associados da crioterapia e do ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade sobre:

- a concentração das espécies reativas de oxigênio (ERO);
- a concentração da capacidade antioxidante contra o radical peroxil (ACAP);
- a peroxidação lipídica (LPO);
- os níveis da atividade antioxidante enzimática da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT);
- os níveis plasmáticos das enzimas musculares da creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH);
- as concentrações plasmáticas de proteína C-reativa ultrasensível (PCR);
- correlacionar os parâmetros de estresse oxidativo com as medidas de dano muscular (CK e LDH) e inflamação sistêmica (PCR).

3. ARTIGO

EFFECTS OF CRYOTHERAPY ASSOCIATED WITH ULTRASOUND THERAPEUTIC IN THE OXIDATIVE STRESS AND TISSUE DAMAGE AFTER MUSCULOSKELETAL CONTUSION

Cassio Noronha Martins, MsC, PT,^a Maicon Borges Moraes, MsC, PE,^a Luis Fernando Guerreiro MsC, PE,^a Melina Hauck, MsC, PT,^b Douglas Dalcin Rossato, MsC, PT,^c Carlos Eduardo da Rosa, PhD, BSc,^a Luis Ulisses Signori, PhD, PT^{a,b,d}

From the ^a Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Brazil;

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Brazil;

^c Departamento de Fisioterapia, Centro Universitário Franciscano, Brazil;

^d Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

Revista: Archives of Physical Medicine and Rehabilitation

(Fator de impacto: 2,358)

Short title:

Cryotherapy and ultrasound in the muscle lesion

Title: Cryotherapy associated with low intensity pulsed ultrasound in the oxidative stress and inflammatory response after musculoskeletal lesion in rats

Cassio Noronha Martins, MsC, PT,^a Maicon Borges Moraes, MsC, PE,^a Luis Fernando Guerreiro MsC, PE,^a Melina Hauck, MsC, PT,^b Douglas Dalcin Rossato, MsC, PT,^c Carlos Eduardo da Rosa, PhD, BSc,^a Luis Ulisses Signori, PhD, PT^{a,b,d}

From the ^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Brazil;

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Brazil;

^c Departamento de Fisioterapia, Centro Universitário Franciscano, Brazil;

^d Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

Corresponding author:

Luis Ulisses Signori. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Campus Carreiros, Av. Itália km 8, ZIP: 96.201-900 - Rio Grande - RS, Brasil. Tel: (55) 55 3214-1165, Fax: (55) 53 32336633.

e-mail: l.signori@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the effects of cryotherapy and low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) association on oxidative stress parameters, tissue damage markers and inflammation systemic after musculoskeletal injury.

Design: Controlled laboratory study.

Setting: University research laboratory.

Animals: Seventy male Wistar rats (weight, 349.16 ± 19.73 g) were homogeneously divided into five groups: Control, Lesion, Cryotherapy, LIPUS and Association (cryotherapy + LIPUS).

Interventions: Injury of gastrocnemius muscle was made by mechanical crushing. Cryotherapy was applied immediately after injury (immersion in water at 10°C for 20min). LIPUS was started 24 hours after injury (1MHz, $0.4\text{W}/\text{cm}^{2\text{SPTA}}$; 20% duty cycle; 5min). The association protocol repeated both procedures. All animals were treated every 8h for 72h.

Main Outcome Measures: Oxidative stress in muscle were evaluated in terms of concentration of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO), antioxidant capacity against peroxy radical (ACAP), superoxide dismutase (SOD) and catalase. Concerning to muscle damage it was analyzed creatine kinase (CK) and plasma lactate dehydrogenase (LDH) and inflammation systemic was evaluated by C-reactive protein (CRP).

Results: Muscle damage caused increases in, ROS, LPO and in the enzymatic activity of catalase, CK, LDH and CRP and elicits a reduction of ACAP ($P < .01$). Cryotherapy and LIPUS when applied individually provided reduction of CK, LDH, CRP and LPO ($P < .01$). The association protocol maintained results previously observed for each

separate protocol and also caused a reduction of ROS and further increases in ACAP and catalase ($P < .05$).

Conclusions: The association of cryotherapy and LIPUS showed an increase in catalase and ACAP that resulted in decreased of reactive oxygen species concentration, which contributes to the reduction of adjacent muscle damage and tissue repair.

Key Words: Rehabilitation; Muscle skeletal; Inflammation; Physical Therapy Modalities; Oxidative stress.

Word count: 2998

INTRODUCTION

Muscle injuries are one of the main traumas occurring in practice of physical and sporting activities.^{1,2} Inflammation is the most important phase (1-3 day) of muscle repair process because it determining the extent and recovery time. During this period occurs the action of inflammatory cells infiltrates,^{2,3} increases in chemotactic activity and excessive concentration of reactive oxygen and nitrogen species³ that in turns induce oxidative stress.^{2,4} Oxidative damage of injury reaches adjacent tissues like hematopoietic, and its related to intensity of inflammatory response.⁵ In this phase, therapeutic interventions should attenuate damage into healthy myofibrils limiting area affected by hematoma and excessive inflammation.² The primary goal of rehabilitation is an earlier return to physical and/or sporting activities,¹ and nonpharmacological interventions such as cryotherapy and low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) are treatments often used on inflammatory phase of muscle injury.

Cryotherapy is defined as the therapeutic application of any substance that removes heat from body consequently lowering temperature of tissues,⁶ and the immersion in cold water ($\leq 15^{\circ}\text{C}$) is one of the common ways of induction heat reduction.⁷ Its therapeutic effects are analgesia, vasoconstriction and reduction of blood flow, and decreased metabolism, inflammation and pain.^{6,7} Its application is indicated immediately after musculoskeletal injuries⁸ because it attenuates microvascular dysfunction, and decreases muscle and blood oxidative damage,⁵ leading to lower adhesion and infiltration of leukocytes in tissue.²

Therapeutic ultrasound parameters traditionally vary in application time (3-10min), frequency (1 to 3MHz), intensity ($0.1-0.5\text{W}/\text{cm}^{2\text{SATA}}$) and waveform (continuous and pulsed).^{4,9} It is usually employed in pulsed waveform 24h after musculoskeletal injury,^{4,10} because increases synthesis of contractile proteins derived

from satellite cells of myofibrils¹¹ and stimulates aligning of collagen fibers which favors formation of new muscle fibers and reduction of injured area.^{12,13} LIPUS also reduces muscle lipoperoxidation⁴ and decreases plasma concentration of neutrophils, monocytes and lymphocytes.¹⁴

Recent study showed favorable results of the combination of cryotherapy with LIPUS in recovery of joint function in patients after total knee replacement surgery.¹⁵ However, in skeletal muscle injuries the previous studies only described the isolated effects from cryotherapy^{2,5,8} or from LIPUS..^{4,10,12-14} These therapies are commonly used together, however, with low scientific evidences of the benefits and the mechanisms from this association. The aim of our study was to evaluate the isolated and associated effects from cryotherapy and LIPUS in oxidative stress parameters, tissue damage markers and inflammation systemic after musculoskeletal injury.

METHODS

Animal Experiment Permission

Controlled laboratory study was approved by Ethics Commission on Animal Use from the Universidade Federal do Rio Grande (n° P034/2012).

Animals and Groups

Adult male Wistar rats (349.16 ± 19.73 g) were obtained from the Central animal house from our institution. The animals were housed in a density of three per cage with free access to food and water. All of the animals were maintained on a 12h dark/12h light cycle at temperature maintained between 20-24°C. Seventy animals were initially anesthetized and randomly divided by a computer program (www.random.org) into five homogeneous groups (n=14 per group): Control (animals were handled but without muscle injury or intervention); Lesion (muscle injury without treatment); Cryotherapy (muscle injury treated with cryotherapy); LIPUS (muscle injury treated with low intensity pulsed ultrasound); Association (muscle injury treated with cryotherapy associated with LIPUS). All treatments proceedings were repeated every 8h and the complete experimental protocol lasted 72h. After 8h of the last treatment round, all animals were euthanized by decapitation, and injured gastrocnemius muscle and blood samples were collected and frozen at -80°C for later analysis.

Muscle injury

The gastrocnemius muscle from right calf was injured by mechanical crushing.^{10,16} Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (80mg/kg) and xylazine (15mg/kg) before proceedings. Before the injury, all animals were depilated. Animals were positioned in ventral decubitus at the base of lesion equipment with knee fully extended and ankle in neutral position (90°). Briefly, gastrocnemius injury was produced by metal mass (0.2kg) that fell through a metal

guide from a 30cm high. The kinetic energy delivered in each impact was 0.484 Joules and two impacts were performed. Rats of control group were also anesthetized and manipulated to ensure standardization but without muscle trauma. At the end of the study the lesion site was dissected and no signs of bone fractures were found.

Cryotherapy application

Immediately after muscle injury, animals from Cryotherapy group were immersed up to the waist in cold water (10°C) for 20min. Animals from Control and Lesion group were immersed up to the waist in water (30°C) for 20min.¹⁷ The water temperature was controlled by exchanging water and/or addition of crushed ice or hot water. After treatment, the animals were dried, monitored, and returned to their cages. In each experiment, after animals were removed from water, central (in-ear) and skin (site of injury) temperature of animals were registered using a digital thermometer (model MT-455, Minipa, SP, Brazil) connected to a thermocouple sensor (model MTK-01, SP, Brazil).

LIPUS application

Ultrasound equipment (Model 6763, Ibramed, SP, Brazil) was calibrated by the manufacturer before and after study, ensuring the linearity of scale with the radiant force method. Pulsed ultrasound was applied at a frequency of 1MHz and low intensity of $0.4\text{W}/\text{cm}^{2\text{SPTA}}$ (spatial peak-temporal average) for 5min, using a 3cm diameter head (nº: TR3CCE02) with an effective radiating area of 5cm^2 . The protocol used a 20% duty cycle (2ms on, 8ms off) corresponding to $0.08\text{W}/\text{cm}^{2\text{SATA}}$ (spatial-averaged temporal intensity).^{14,18} Treatment with LIPUS was initiated only 24h after muscle injury, and was applied in underwater way (water at 30°C).

Cryotherapy and LIPUS Association

Association consisted in the application of cryotherapy (as described above) for 20min immediately after muscle injury. LIPUS (as described above) were applied in the last 5min of cryotherapy. These procedures were started 24h after muscle injury protocol.

Reactive oxygen species (ROS) and antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) analysis

The ROS and ACAP analysis were done employing 100mg of gastrocnemius muscle tissue. The samples were homogenized in buffer solution (1mM MgCl₂, 0.32M sucrose, 20mM HEPES adjusted to pH 7.4) using a rate of 300μl of buffer that was mixed with 100μl of tissue, and homogenates were centrifuged at 20.000×g for 20min at 4°C.¹⁹

The determination of ROS and ACAP was made by a reaction media containing (30mM HEPES, 200mM KCl, 1mM MgCl₂ adjusted to pH 7.2). For ROS analysis and the 2',7'- dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA; Invitrogen™) at a final concentration of 40μM. Total fluorescence production was calculated by integrating the fluorescence units (FU) along the time and the results were expressed as ROS = relative area. For ACAP analysis employing the 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (20mM ABAP; Aldrich™) as a ROS generator after thermal decomposition at 37°C using 488nm (absorption) into 60min, and the results were expressed as 1/(relative area with/without ABAP).¹⁹

Lipid Peroxidation measurement

The Fox assay (ferrous oxidation/xylene orange method) was performed to measure the lipid peroxidation (LPO).²⁰ Frozen tissues were homogenized in methanol (5:1) and centrifuged at 1000xg for 10min at 4°C. Lipoperoxidation was determined

using a reaction media containing (1mM FeSO₄, 0.25M H₂SO₄ and 1mM xylenol orange). The absorbance was measured at 550nm in a microplate reader after 4h for incubation at 37°C. The cumene hydroperoxide (1.75nM) was employed as a standard. The values of LPO were expressed in equivalent CHP/g of wet tissue.

Enzymes activity assays

To measure the activities of antioxidant enzymes 100mg of frozen muscle tissue were homogenized (1:4) in buffer solution (20mM Tris, 1mM EDTA, 1mM DTT, 500mM sucrose, 150mM KCl adjusted to pH 7.6). Homogenates were centrifuged at 9.000×g for 45min at 4°C; supernatants were extracted and immediately used for analyses. Total proteins content were determined in the supernatants by the Biuret method (Dole's Reagentes, GO, Brazil). All the activities analyses were performed at temperature of 37°C. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured by the epinephrine autoxidation method. The product of this reaction can be detected by spectrophotometry (480nm). SOD activity presented in the sample prevents the epinephrine oxidation by the superoxide anions, and its activity was expressed as SOD units, where 1 unit is defined as the amount of sample necessary to inhibit 50% of epinephrine oxidation. Catalase activity was spectrophotometrically (240nm) measured by the method based on the rate of H₂O₂ degradation by the action of catalase, contained in the examined samples. Catalase activity presented in the sample was expressed as Catalase units, where 1 unit is defined as the amount of sample necessary to transform H₂O₂ into H₂O e O₂. SOD and catalase activity was measured by the method as previously described.⁵

Evaluation of markers of tissue damage and systemic inflammation

Blood was collected in heparinized vacutainers and centrifuged at 3.000×g for 15min at 4°C in order to separate blood cells from plasma. The plasma activities of

Creatine Kinase (CK), Lactate Dehydrogenase (LDH) and plasma concentration C-reactive protein (CRP) were spectrophotometrically determined. The CK activity was measured at 340nm at 37°C. CK activity was expressed as standard units international per liter (UI/L).²¹ The LDH activity was determined (340nm) at 37°C and activity was expressed (UI/L).²² The enzymes were analyzed using kits (Doles Reagentes, GO, Brazil). CRP concentration was measured at 540nm at 37°C and concentration was expressed (mg/dL) for method imunoturbidimetria (Labtest, Lagoa Santa, MG).

Statistical analysis

Results are reported as means \pm standard deviation (SD). Distribution of variables was tested through test of normality Kolmogorov–Smirnov. Variables were compared with analysis of variance (ANOVA one-way) and Kruskal-Wallis test as appropriate, followed by the Tukey post-hoc test. Pearson correlation coefficient was calculated. The differences were considered to be statistically significant when $P < .05$.

RESULTS

Temperature

Central temperature after treatments reduced less than 1°C in Cryotherapy ($P<.01$) and Association ($P<.05$) groups (fig 1A). This reduction is not sufficient to be considered like therapeutic hypothermia ($<35^{\circ}\text{C}$).²³ Immersion in water at 30°C reduced local skin temperature in approximately 2°C in Control ($P<.01$), Lesion ($P<.01$) and LIPUS ($P<.001$) groups. Local skin temperature of Cryotherapy ($P<.001$) and Association ($P<.001$) groups treated by immersion in water at 10°C decreased in approximately 14°C (fig 1B).

Muscle oxidative damage

ROS formation in gastrocnemius muscle increased 60% in Lesion group when compared to Control group ($P=.002$). Cryotherapy group was not different from Lesion ($P=.442$) and Control ($P=.377$) group. These values are similar to LIPUS results that were not different from Lesion ($P=.605$) and Control ($P=.245$) group. Association group showed a decrease of 55% in relation to Lesion group ($P=.005$), but its results were similar to Control group ($P=.998$) (fig 2A). Lesion group produced musculoskeletal LPO three times larger than Control group ($P<.001$). Cryotherapy ($P<.001$), LIPUS ($P<.001$) and Association ($P<.001$) groups reduced LPO in comparison to the Lesion group, and their values were similar to Control group ones (fig 2B).

Muscle antioxidant defenses

Muscular injury reduces ACAP in 2.7 times in Lesion group ($P<.001$), 1.6 times in Cryotherapy group ($P<.042$) and 1.7 times in LIPUS group ($P<.018$) in relation to Control group. However, Association group increased ACAP 200% when compared to Lesion group ($P=.007$), and this result was equal to Control group ($P=.640$) (fig 3A). SOD enzymatic activity was not different between groups after 72h of injury ($P=.662$)

(fig 3B). With respect to Control group, catalase enzymatic activity was 71% elevated in Lesion ($P<.001$), 78% in Cryotherapy ($P<.001$), 94% in LIPUS ($P=.001$) and 145% in Association ($P<.001$) groups (fig 3C). Association group also enhanced catalase activity in 35% in relation to Lesion ($P=.002$), Cryotherapy ($P=.01$) and LIPUS ($P=.003$) groups.

Markers of tissue damage and systemic inflammation

Plasma levels of CK increased 36% in Lesion group when compared to Control group ($P<.001$) 72h after musculoskeletal injury. Values in Cryotherapy ($P=.01$), LIPUS ($P=.006$) and Association ($P=.003$) groups were like in Control group, and lower than of Lesion group (8%) (fig 4A). LDH was 55% greater in Lesion group than Control group ($P=.002$). Cryotherapy ($P=.01$), LIPUS ($P=.006$) and Association ($P=.003$) showed lower values than Lesion group, and their plasma levels were equal to Control group (fig 4B). CRP plasma increased three times after muscle injury ($P<.001$) and isolated and associated interventions reversed this increase, returning to the values of the control group.

A positive correlation between muscular LPO and CK ($r=.436$, $P<.001$), LPO and LDH ($r=.428$, $P<.001$) and between muscular LPO and CRP ($r=.523$, $P<.001$) was found (fig 5A, fig 5B and fig 5C respectively).

DISCUSSION

The present study demonstrated that untreated muscular injury increased ROS such as previous study.⁵ The ROS, like radical anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($OH\cdot$) are intermediary molecules naturally produced during cellular respiration²⁴ that are increased in inflammatory process.²⁵ Excessive ROS concentration may cause direct damage to macromolecules like proteins, lipids and DNA.²⁴ Our results also showed that LPO was enhanced after muscular lesion. Formation of lipid hydroperoxides in consequence of injury is a common process in degeneration/inflammation phase.^{1,4,5} Necrotic cells and increasing cellular metabolism around injured area¹ release ROS which in turns recruit and activate phagocytes, release arachidonic acid, activate NADPH-oxidase, form peroxides, and modify the Ca^{2+} homeostasis that causes more formation of ROS.²⁶ These mechanisms induce an increase of tissue infiltrates^{2,5} and an enlargement of injury area.²⁴

It was demonstrated in the present study that isolated and associated interventions reduces LPO. It is known that cryotherapy attenuates microvascular dysfunction, and decreases temperature, metabolism⁵ and O_2 demand in electron transport chain.²⁷ As a consequence, lower formation of ROS were observed and as a result lesser damage to adjacent molecules were generated.⁵ The production of ROS in intervention groups presented the same levels of Control group, which contributed in part to reduction of LPO and plasma activity of CK and LDH. Results of Cryotherapy and LIPUS groups are similar despite distinct mechanism of action, but these results have already been demonstrated.^{5,28} Biological effects of LIPUS typically are the result of ultrasonic pressure wave and heat.^{29,30} However, considering the dose used in this study ($0.08W/cm^{2SAT}$) thermal effects are negligible. On the other hand, the non-thermal effects as the pressure wave (moving large quantities of fluids) and acoustic

streaming can stimulate shear stress when that occurs near the endothelial cells³⁰ increases nitric oxide (NO) formation.³⁰⁻³² NO production attenuates endothelial dysfunction, inhibits expression of adhesion molecules and leukocytes infiltration and aggregation in injured tissue³¹. Thus, this process causes a lower generation of ROS and consequent LPO reduction. Our results LIPUS group demonstrated that ROS was in basal values which partly contributes to the reduction of LPO and plasma markers of muscle damage according to previous study^{4,15}. Only in Association group ROS was reduced in relation to Lesion group. This is probably because cryotherapy and LIPUS work together on redox balance suggesting greater cell protection.

Excessive production of ROS in inflammatory process is counterbalanced by antioxidants like enzymatic factors such as SOD, catalase and glutathione peroxidase (GPx) which reduce ROS keeping cellular redox balance.²⁴ The present study showed no changes in SOD, an increasing of catalase and ACAP reduction 72h after muscle lesion. Like others studies,^{4,5,16} values of SOD not changed after lesion and treatments. An increasing of catalase after muscle lesion was also observed in previous studies^{4,5,16,33} because it acts over H₂O₂.²⁴ However, in our study catalase activity increase was insufficient to avoid lipid damage in Lesion group, which is supported by reduction of antioxidants capacity. Isolated treatments obtained the same antioxidant enzymes values of Lesion group. Carvalho *et al.* (2010)⁵ found catalase's unchanged activity on first day and reduced activity of catalase in fifth day after muscular lesion treated with ice. The differences between this and our results should be because of lesion and cryotherapy (ice, twice a day, 5min) distinct protocols, which probably are insufficient to stimulate the activity of catalase. LIPUS group presents similar catalase values to Lesion group as demonstrated in the literature.^{4,15} Nevertheless, association group obtained increases in catalase activity that enhanced ACAP in relation to single treatments. Probably because

of ROS production increases from muscular injury which stimulates catalase production to reestablish the redox balance. Together, cryotherapy and LIPUS may reduce injured area, raise enzymatic production of surrounding cells, and potentiate the protector effect by ACAP elevation.

The inflammatory phase of muscular damage can be measure by increasing of circulating biomarkers a few hours after injury.^{4,5} The structures of muscle fibers are altered because of oxidative stress²⁵ that causes rupture of the sarcolemma and leakage of specific metabolic enzymes of sarcoplasm and mitochondria.³⁴ Our model of skeletal muscle injury was effective because CK, LDH and CRP were increased 72h after lesion like previous studies.^{4,5} Cryotherapy, LIPUS and their association decreased plasmatic levels of CK when compared to Lesion group. Carvalho *et al.* (2010)⁵ also demonstrated reduction of CK during 10 days after muscular injury by cryotherapy, and LIPUS reduces CK 24h after musculoskeletal lesion.⁴ LDH metabolic enzyme is present on mitochondria and its permeability and solubility is equal to CK,³⁴ thus the positive results of treatments are reinforced by LDH reduction 72h after injury. Muscle lesion increased CRP levels, and treatments attenuate this effect. Kang *et al.* (2014)¹⁵ demonstrated that patients with total knee replacement treated with cryotherapy, LIPUS and association during 3 weeks reduced plasmatic level of CRP, results similar to our findings.

All of these alterations explain the correlations between muscular LPO and plasmatic concentrations of CK, of LDH and of CRP. It occurs in part due to lesion of lipid membrane which allows the leakage of these enzymes to bloodstream³⁴ as also shows another study.⁵ Water immersion at 30°C of Control, Lesion and LIPUS groups decreases local skin temperature approximately 2°C showing that this temperature is

therapeutically inert,²³ and that the effects in LIPUS group occurred only by the application of ultrasound.

Study Limitations

Absence of histochemical measures (inflammatory infiltrates and morphometry), assessment of others antioxidant pathways like GPx, GSH/GSSG, protein oxidative damage and changes in the DNA structure are limitations of the present study.

CONCLUSION

Cryotherapy and LIPUS single treatments reduced plasmatic markers of muscular damage, C-reactive protein and lipoperoxidation. Association group obtains the same results describe above, but with a decreases of reactive oxygen species, and an increases of catalase activity that enhances antioxidant capacity against peroxy radical. These results suggest that association of cryotherapy and therapeutic ultrasound shows favorable synergistic effects during inflammatory phase of mioregeneration.

REFERENCE

1. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *The American journal of sports medicine*. 2005;33:745–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15851777>
2. Souza J de, Gottfried C. Muscle injury: review of experimental models. *Journal of electromyography and kinesiology*. 2013;23:1253–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011855>
3. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide*. 2009;21:157–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19682596>
4. Freitas LS, Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Pinho RA, Streck EL. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell biology international*. 2007;31:482-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196843>
5. Carvalho N, Puntel G, Correa P, Gubert P, Amaral G, Morais J, et al. Protective effects of therapeutic cold and heat against the oxidative damage induced by a muscle strain injury in rats. *Journal of sports sciences*. 2010;28:923–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20544483>
6. Nadler SF, Weingand K, Kruse RJ. The physiologic basis and clinical applications of cryotherapy and thermotherapy for the pain practitioner. *Pain physician*. 2004;7:395–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16858479>
7. Wilcock IM, Cronin JB, Hing WA. Physiological response to water immersion: a method for sport recovery? *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*. 2006;36:747–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16937951>
8. Ascensão A, Leite M, Rebelo AN, Magalhães S, Magalhães J. Effects of cold water immersion on the recovery of physical performance and muscle damage following a one-off soccer match. *Journal of sports sciences*. 2011;29:217–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21170794>
9. Robertson VJ. Dosage and treatment response in randomized clinical trials of therapeutic ultrasound. *Physical Therapy in Sport*. 2002;3:124–33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466853X02901070>
10. Matheus JPC, Oliveira FB, Gomide LB, Milani JGPO, Volpon JB, Shimano AC. Effects of therapeutic ultrasound on the mechanical properties of skeletal muscles after contusion. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. 2008;12:241–7.

11. 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.* 2003;15:65–70.
12. Montalti CS, Souza NVCKL, Rodrigues NC, Fernandes KR, Toma RL, Renno ACM. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on injured skeletal muscle. *Brazilian journal of physical therapy.* 2013;17:343–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970116>
13. Rennó ACM, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, et al. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomedicine and laser surgery.* 2011;29:5–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166589>
14. Signori LU, da Costa ST, Neto AFS, Pizzolotto RM, Beck C, Sbruzzi G, et al. Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. *Physiotherapy.* 2011;97:163–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497251>
15. Kang J Il, Kim Y-N, Choi H. Effects of Low-intensity Pulsed Ultrasound and Cryotherapy on Recovery of Joint Function and C-reactive Protein Levels in Patients after Total Knee Replacement Surgery. *Journal of physical therapy science.* 2014;26:1033–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4135191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Silveira PCL, Victor EG, Schefer D, Silva LA, Streck EL, Paula MM, et al. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound in medicine & biology.* 2010;36:44–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900747>
17. Camargo MZ, Siqueira CPCM, Preti MCP, Nakamura FY, de Lima FM, Dias IFL, et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy and cold water immersion therapy on exercise-induced muscle damage in rats. *Lasers in medical science.* 2012;27:1051–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223060>
18. Signori LU, Teixeira ADO, da Silva AMV, da Costa ST, Dipp T, Plentz RDM. Effects of therapeutic ultrasound on haematological dynamics and fibrinogen during the inflammatory phase after muscle injury in rats. *Acta Scientiarum. Health Science [Internet].* 2014 [cited 2014 Mar 21];36:25. Available from: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/14472>
19. Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *The Science of the total environment.* 2009;407:2115–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095287>

20. Hermes-lima M, Willmore WG, Storey KB. Original Contribution. 1995;19:271–80.
21. Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, de Toledo OMS. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics*. 2008;48:403–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384832>
22. Basta G, Venneri L, Lazzerini G, Pasanisi E, Pianelli M, Vesentini N, et al. In vitro modulation of intracellular oxidative stress of endothelial cells by diagnostic cardiac ultrasound. *Cardiovascular Research*. 2003;58:156–61. Available from: [http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0008-6363\(02\)00665-X](http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0008-6363(02)00665-X)
23. Alva N, Palomeque J, Carbonell T. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013:957054.
24. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006;8.
25. Pierce AP, de Waal E, McManus LM, Shireman PK, Chaudhuri AR. Oxidation and structural perturbation of redox-sensitive enzymes in injured skeletal muscle. *Free radical biology & medicine*. 2007;43:1584–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18037124>
26. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;393:561–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171167>
27. Schaser K-D, Disch AC, Stover JF, Lauffer A, Bail HJ, Mittlmeier T. Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. *The American journal of sports medicine*. 2007;35:93–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17197574>
28. Freitas TP, Gomes M, Fraga DB, Freitas LS, Rezin GT, Santos PM, et al. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on lipoperoxidation and fibrogenesis in an animal model of wound healing. *The Journal of surgical research*. 2010;161:168–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577772>
29. Juffermans LJM, van Dijk A, Jongenelen CAM, Drukarch B, Reijerkerk A, de Vries HE, et al. Ultrasound and microbubble-induced intra- and intercellular bioeffects in primary endothelial cells. *Ultrasound in medicine & biology*. 2009;35:1917–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766381>
30. VanBavel E. Effects of shear stress on endothelial cells: possible relevance for ultrasound applications. *Progress in biophysics and molecular biology*.

2007;93:374–83. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16970981>

31. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2009;196:193–222. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220204>
32. Sugita Y, Mizuno S, Nakayama N, Iwaki T, Murakami E, Wang Z, et al. Nitric oxide generation directly responds to ultrasound exposure. *Ultrasound in medicine & biology*. 2008;34:487–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17933454>
33. Victor EG, Silveira PCL, Possato JC, da Rosa GL, Munari UB, de Souza CT, et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *Journal of nanobiotechnology*. 2012;10:11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3325169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
34. Ohlendieck K. Proteomics of skeletal muscle glycolysis. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1804:2089-101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20709194>

Figure Legends

Fig 1. Temperature. Values are presented as mean \pm SD. Cryotherapy: lesion treated with cryotherapy; LIPUS: lesion treated with low-intensity pulsed ultrasound; Association: lesion treated with Cryotherapy associated low-intensity pulsed ultrasound. * $P < .05$ Before vs After, † $P < .05$ vs Control ‡ $P < .05$ vs Lesion; § $P < .05$ vs Cryotherapy; || $P < .05$ vs LIPUS.

Fig 2. Parameters of oxidative skeletal muscle damage. Values are presented as mean \pm SD. Cryotherapy: lesion treated with cryotherapy; LIPUS: lesion treated with low-intensity pulsed ultrasound; Association: lesion treated with Cryotherapy associated low-intensity pulsed ultrasound. * $P < .05$ vs Control; † $P < .05$ vs Lesion.

Fig 3. Parameters of skeletal muscle defense against radical species. Values are presented as mean \pm SD. Cryotherapy: lesion treated with cryotherapy; LIPUS: lesion treated with low-intensity pulsed ultrasound; Association: lesion treated with Cryotherapy associated low-intensity pulsed ultrasound. * $P < .05$ vs Control, † $P < .05$ vs Lesion; ‡ $P < .05$ vs Cryotherapy; § $P < .05$ vs LIPUS.

Fig 4. Blood markers of skeletal muscle damage. Values are presented as mean \pm SD. Cryotherapy: lesion treated with cryotherapy; LIPUS: lesion treated with low-intensity pulsed ultrasound; Association: lesion treated with Cryotherapy associated low-intensity pulsed ultrasound. * $P < .05$ vs Control, † $P < .05$ vs Lesion.

Fig 5. Correlation between the skeletal muscle parameters of oxidative stress and plasma markers tissue damage and inflammation systemic. LPO: Lipid peroxidation; CK: Creatine kinase; LDH: Lactate dehydrogenase; PCR: C-reactive protein.

Fig 1.

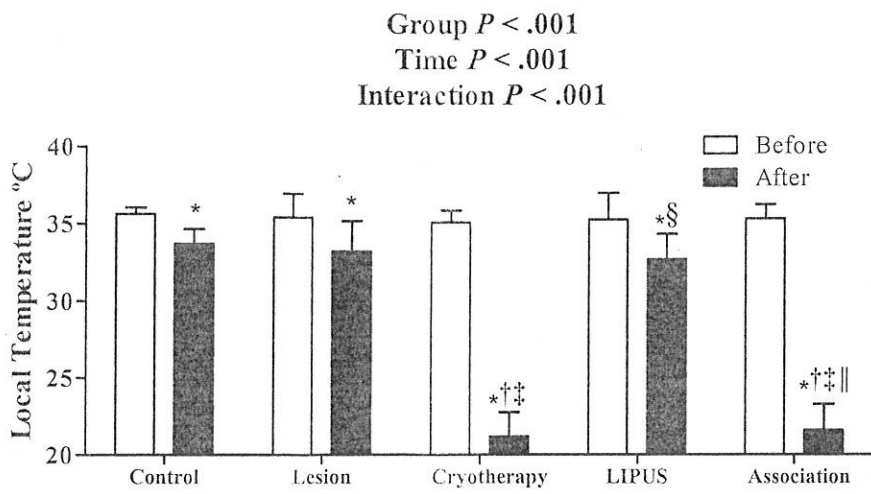
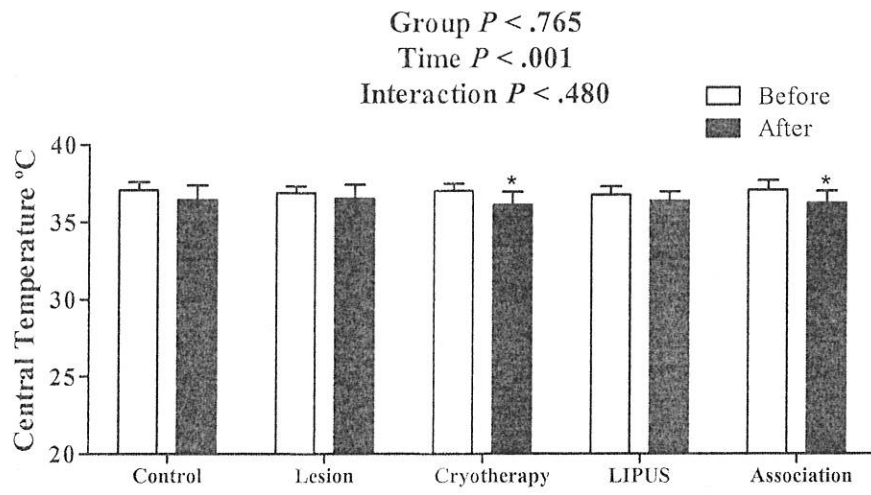


Fig 2.

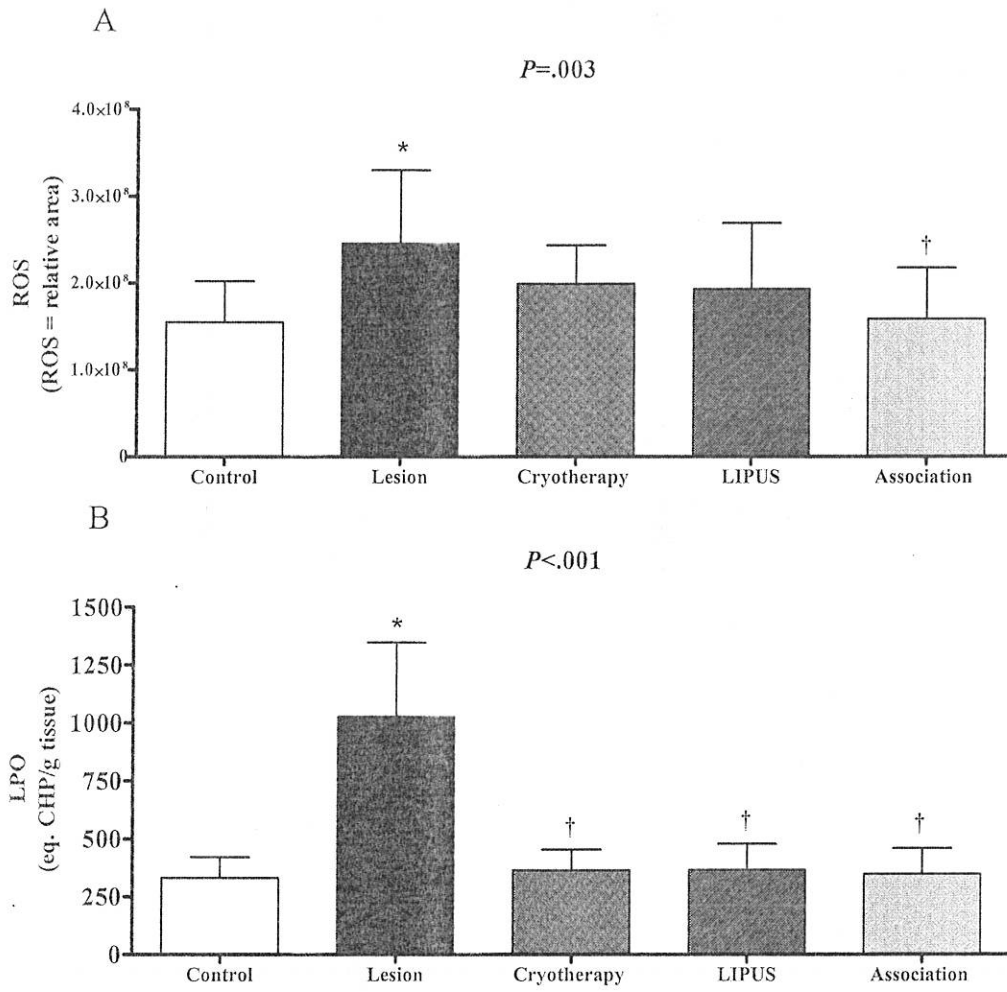


Fig 3.

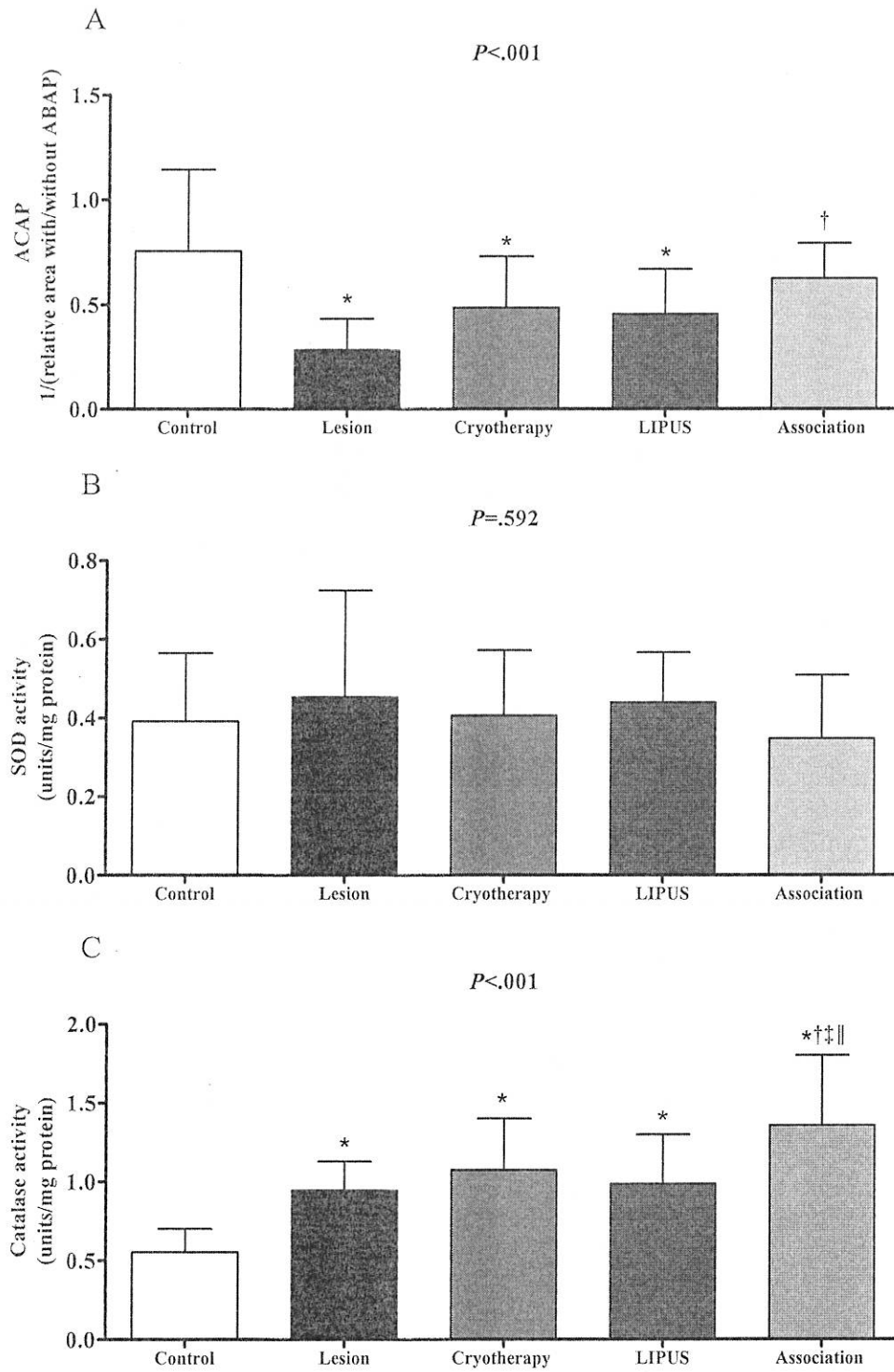


Fig 4.

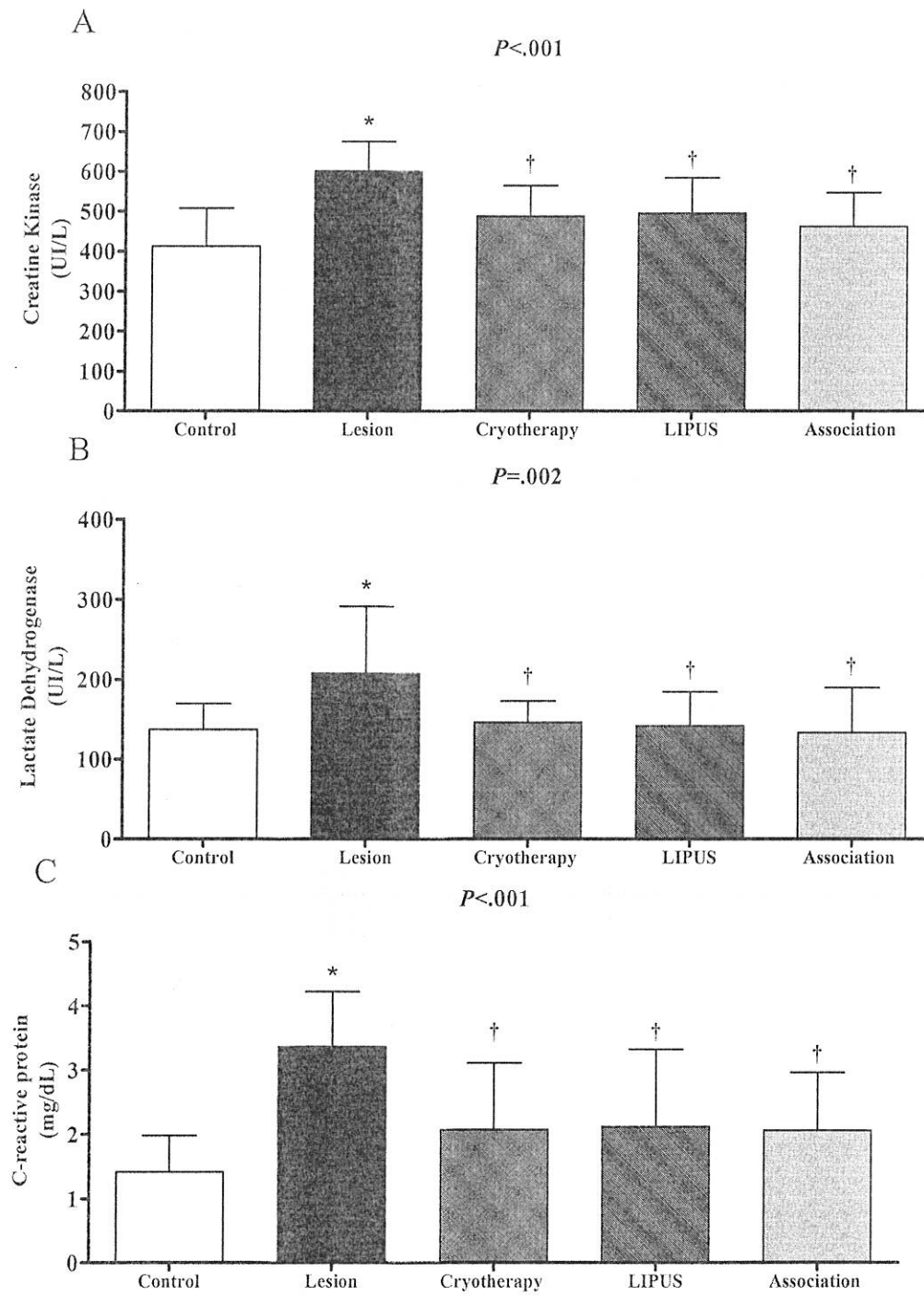
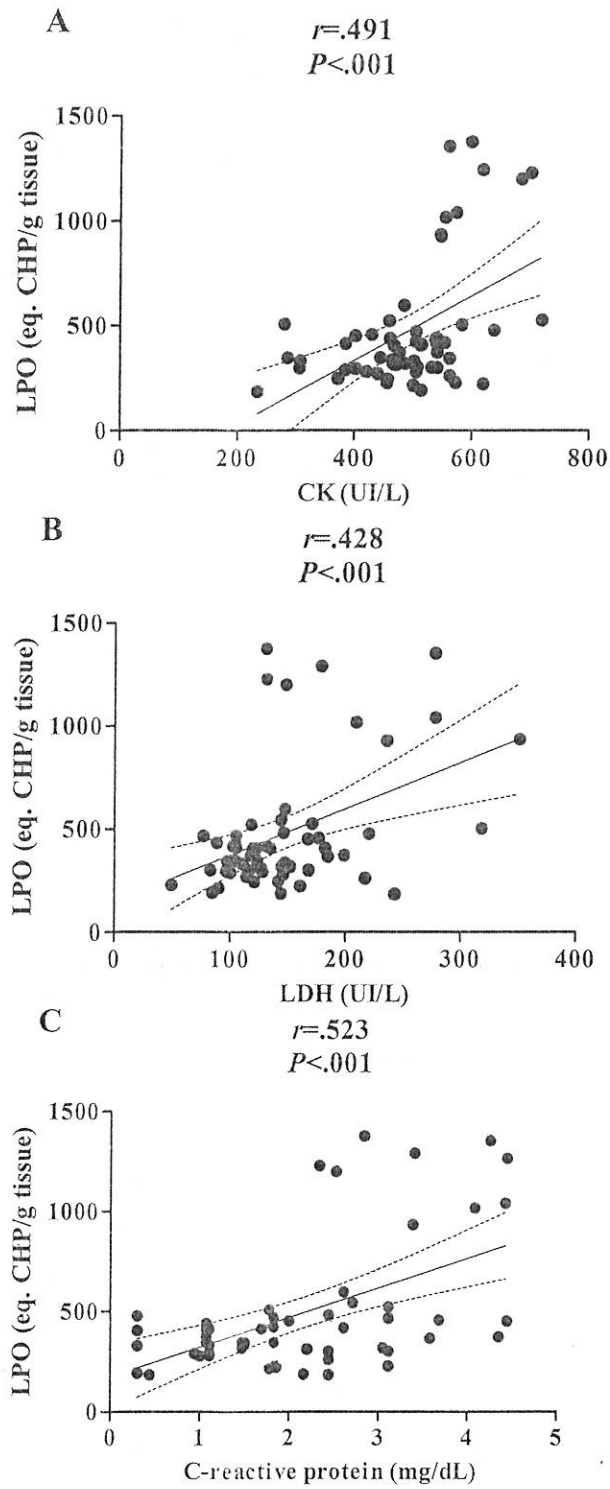


Fig 5.



4. DISCUSSÃO GERAL

As lesões musculares esqueléticas promovem um esperado aumento do estado oxidativo e da resposta inflamatória,^{49,58} os quais foram demonstrados no presente estudo pelo aumento das concentrações das ERO, da peroxidação lipídica (LPO), da atividade da catalase e redução da capacidade antioxidante contra o radical peroxil (ACAP) no músculo lesado e pela elevação dos níveis plasmáticos dos marcadores de lesão muscular (CK e LDH) e inflamação sistêmica (PCR). Individualmente, a crioterapia e o LIPUS reduziram a lipoperoxidação, a ACAP e proporcionaram uma elevação da atividade catalase comparados ao controle. Com relação aos marcadores plasmáticos de dano muscular houve uma redução comparados ao grupo lesão. Entretanto, a associação dos tratamentos manteve os resultados anteriores e ainda diminuiu as concentrações das ERO, aumentou a atividade da catalase e um aumento da ACAP.

O presente estudo demonstrou que a lesão muscular não tratada aumentou as ERO conforme demonstrado em estudo prévio.⁴⁹ As ERO são produzidas naturalmente durante o processo metabólico. Elas compreendem o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), os quais apresentam sua formação aumentada na resposta inflamatória.¹⁰ Os resultados do presente estudo demonstrou o aumento da LPO após a lesão. A LPO ocorre nas células danificadas por injúria na fase de degeneração/inflamação,^{42,49,58} isso ocorre devido às ERO liberadas por células necrosadas e pelo aumento do metabolismo celular no entorno da área lesada,⁴² que recrutam e ativam as células fagocitárias, liberam ácido araquidônico, formando peróxidos, estimula a NADPH-oxidase e alteram a homeostase do Ca^{2+} , levando a uma produção adicional das ERO.⁷⁰ Esses mecanismos levam ao aumento adicional dos infiltrados teciduais^{2,49} e a amplificação da inflamação e da área lesada.

As intervenções isoladas e associadas reduziram a LPO. A crioterapia atenua a disfunção microvascular, diminui a temperatura, reduz o metabolismo⁴⁹ e a demanda de O₂ na cadeia de transporte de elétrons,⁷¹ resultando na menor formação das ERO com menor dano às macromoléculas adjacentes.⁴⁹ No presente estudo, as intervenções isoladas mantiveram a concentração das ERO aos níveis intermediários não apresentando diferença do grupo controle nem do grupo lesão, mas apresentaram redução na LPO e nas concentrações plasmáticas de CK, LDH e PCR. Esses resultados, já foram demonstrados previamente.⁴⁹ Os efeitos biológicos estabelecidos do LIPUS são normalmente resultado de micro-bolhas, da onda de pressão e calor.^{60,62} Os parâmetros utilizados no presente estudo (0.08W/cm²SATA) praticamente não apresenta os efeitos térmicos. As *micro-streaming* e a onda de pressão que ocorrem próximo às células endoteliais deslocam quantidades de fluidos que estimulam o *shear stress*⁶⁰ e criam poros temporários na membrana aumentando a biodisponibilidade do Ca²⁺ intracelular, levando ao desacoplamento da eNOS e a formação de NO.^{60,72,73} A produção de NO atenua a disfunção endotelial, inibe a expressão das moléculas de adesão e a consequente agregação e infiltração dos leucócitos no tecido lesado,⁷² reduzindo as concentrações das ERO e a LPO. Os resultados deste estudo demonstram que as ERO retornaram aos níveis basais, resultando na redução da LPO e nos marcadores plasmáticos de lesão, o que está de acordo com estudos prévios.^{65,74} Entretanto, somente a associação dos tratamentos foi capaz de reduzir as concentrações das ERO em relação ao grupo lesão, pois os efeitos da crioterapia e do LIPUS interagiram sobre o equilíbrio redox, sugerindo que esta conduta apresenta uma maior proteção celular.

Os antioxidantes contrabalançam a geração excessiva das ERO decorrente do processo inflamatório, dentre estes existem fatores enzimáticos como a SOD, a CAT e a GPx, que atuam na redução das espécies reativas, mantendo o equilíbrio redox celular.²⁴

No presente estudo, 72h após a lesão muscular observou-se um aumento da catalase, diminuição da ACAP e a SOD ficou inalterada. Os resultados da SOD não se modificaram frente à lesão e aos tratamentos, o que já foi demonstrado em estudos anteriores.^{49,58,65} Entretanto, o aumento da catalase após lesão muscular foi observada em estudos prévios.^{49,58,65,75} A catalase atua sobre o H_2O_2 ,²⁴ mas o aumento da atividade desta enzima não foi suficiente para evitar o dano lipídico no grupo lesão observado no presente estudo. Os tratamentos isolados apresentaram as mesmas respostas nas enzimas antioxidantes em relação ao grupo lesão. Carvalho et al., 2010⁴⁹ demonstraram que a atividade da catalase após a lesão muscular tratada com gelo mostrou-se inalterada no 1º dia e reduzida no 5º dia de intervenção.⁴⁹ As diferenças em relação ao presente estudo se devem aos diferentes protocolos de lesão e os parâmetros da crioterapia (gelo, 2x por dia durante 5min), o que possivelmente sejam insuficientes para estimular a atividade da catalase. O LIPUS apresentou valores semelhantes ao grupo lesão para a catalase, o que já demonstrado na literatura.^{49,58,65} A crioterapia associada ao LIPUS aumentou a atividade da catalase potencializando a ACAP em comparação aos tratamentos isolados. Possivelmente, isso ocorre devido ao aumento na produção das ERO advindas da lesão muscular, estimulando a produção desta enzima antioxidante, reestabelecendo o equilíbrio redox. Sugere-se que a associação das técnicas possui ação benéfica na resposta inflamatória por estimular a produção de antioxidantes enzimáticos pelas células vizinhas isso se confirma com o aumento da ACAP e estes efeitos potencializam a proteção do tecido muscular e evita um aumento do dano muscular.

O dano muscular pode ser mensurada através de biomarcadores circulatórios, pelo aumento dos seus níveis plasmáticos que ocorre em algumas horas após a lesão.^{49,58} As fibras musculares sofrem alterações de suas estruturas na presença do estresse oxidativo¹⁰ e essas alterações levam a ruptura do sarcolema, o que provoca o

vazamento de enzimas metabólicas específicas do sarcoplasma e das mitocôndrias.⁷⁶ Kang et al. 2014⁷⁷ demonstraram que os pacientes com artroplastia total do joelho tratada com crioterapia, ultrassom pulsado de baixa intensidade e pela associação das duas técnicas durante 3 semanas reduziu os níveis plasmáticos de PCR, resultados semelhantes aos achados do presente estudo.

Essas alterações explicam as correlações da LPO muscular com as concentrações plasmáticas da CK, da LDH e da PCR os quais já foram demonstrados em estudo prévio.⁴⁹ Estas ocorrem em parte, devido a lesão das membranas lipídicas permitirem o vazamento destas enzimas para a corrente sanguínea.⁷⁶ O modelo de lesão muscular esquelético utilizado no presente estudo³² se mostrou efetivo, pois a CK e a LDH encontravam-se aumentadas 72h após a lesão sem tratamento, estando de acordo com estudos prévios que utilizaram diferentes formas de dano muscular em ratos.^{49,58} A crioterapia, o LIPUS e a associação destas terapias diminuíram os níveis plasmáticos de CK. Carvalho et al., 2010⁴⁹ demonstraram que a crioterapia foi capaz de reduzir a CK por dez dias após lesão muscular esquelética. O LIPUS reduziu a CK 24h após lesão muscular esquelética.⁵⁸ Os resultados dessas terapias são reforçados pela redução da LDH 72h após lesão, pois esta enzima metabólica está presente na mitocôndria, tendo sua permeabilidade e solubilidade semelhantes à CK.⁷⁶

5. CONCLUSÃO

Os tratamentos isolados de crioterapia e o ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade reduziram a lipoperoxidação, a creatina quinase, a lactato desidrogenase e a proteína c-reativa. A associação dessas terapias manteve os resultados descritos anteriormente, além de reduzir a concentração de espécies reativas de oxigênio e aumentar a capacidade antioxidante contra os radicais peroxil devido a elevação da catalase. Os resultados sugerem que a associação da crioterapia e ultrassom terapêutico apresentam efeitos sinérgicos que favorece a redução do estresse oxidativo formado durante fase inflamatória contribuindo para a aceleração do reparo tecidual. O presente estudo sugere que estas terapias devam ser testadas em estudos clínicos para a sua aplicação na prática diária.

6. PERSPECTIVAS

O estado oxidativo é um dos mecanismos importantes na fase inflamatória e os tratamentos tanto isolados como associados da crioterapia e do ultrassom terapêutico pulsado de baixa intensidade mostraram uma ação benéfica neste estudo, assim como na redução do dano muscular e da inflamação sistêmica. Entretanto, os dados só apontam parte do mecanismo, vale salientar que futuras análises são imprescindíveis como a verificação da glutathione peroxidase (GPx), glutathione reduzida (GSSG), além de substratos derivados da cadeia nitrogenada e análises de dano proteico (mieloperoxidase), pois a presente estudo verificou somente os pró-oxidantes derivados do oxigênio e os antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase e catalase).

Seguindo na mesma linha dos mecanismos envolvidos na fase inflamatória após a lesão musculoesquelética análises de citocinas pró e anti-inflamatórias são cruciais para o melhor entendimento do mecanismo dessas técnicas não farmacológicas. Por este

motivo, análises do TNF- α , IL-1 e IL-10 estão como perspectivas futuras. Análises histológicas com das células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), morfometria celular, complexos da cadeia transportadora de elétrons e do citocromo C também fazem parte de objetivos de estudos futuros.

Outra questão clínica pertinente é aplicação do ultrassom terapêutico isolado ou associado a crioterapia imediatamente após a lesão muscular, pois caso estes resultados se confirmem a aplicação precoce deste recurso terapêutico aumentara os efeitos benéficos destes recursos na fase inflamatória de lesão muscular esquelética.

7. BIBLIOGRAFIA GERAL

1. Kaariainen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kamilo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sport*. 2000;10:332-7.
2. de Souza J, Gottfried C. Muscle injury: review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol*. 2013;23(6):1253-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011855>
3. Baoge L, van den Steen E, Rimbaut S, Philips N, Witvrouw E, Almqvist KF, et al. Treatment of Skeletal Muscle Injury: A Review. *Int Sch Res Netw Orthop*. 2012;2012:1-7. Available from: <http://www.hindawi.com/isrn/orthopedics/2012/689012/>
4. Chan Y-S, Hsu K-Y, Kuo C-H, Lee S-D, Chen S-C, Chen W-J, et al. Using low-intensity pulsed ultrasound to improve muscle healing after laceration injury: an in vitro and in vivo study. *Ultrasound Med Biol*. 2010;36(5):743-51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381949>
5. Wei S, Huard J. Tissue Therapy: Implications of Regenerative Medicine for Skeletal Muscle. 2000;1232-47.
6. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Aärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, et al. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007;21(2):317-31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512485>
7. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physio*. 2005;288:345-53.
8. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização : uma revisão. *Brazilian J Pharm Sci*. 2005;41(1):27–51.
9. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide*. 2009;21(3-4):157–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19682596>
10. 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*. 2007;43(12):1584-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18037124>
11. Beck BD, Gerson B, Feldman HA, Brain JD. Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Hamster Lung Lavage Fluid after Lung Injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1983;71:59–71.
12. Cooke MB, Rybalka E, Williams AD, Cribb PJ, Hayes A. Creatine supplementation enhances muscle force recovery after eccentricity-induced muscle damage in healthy individuals. *J Int Soc Sports Nutr*. 2009;6:13.

Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2697134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

13. Mäkinen TM, Rintamäki H, Karpakka J, Komulainen J, Hissa R. Submaximal exercise in the cold: does cooling potentiate the development of muscle injuries in the rat? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1998;121(3):273-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9972324>
14. Beghdadi W, Madjene LC, Benhamou M, Nicolas C, Gautier G, Launay P, et al. Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. *Front Immun.* 2011;2:37.
15. Gri G, Frossi B, Inca FD, Danelli L, Betto E, Mion F, et al. Mast cell : an emerging partner in immune interaction. *Front Immun.* 2012;3:120.
16. Pham CTN. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1317–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2440796&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
17. Kharrz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Macrophage Plasticity and the Role of inflammation in Skeletal Muscle Repair. *Mediat Inflamm.* 2013;2013.
18. Ji LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol.* 2007;42(7):582–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467943>
19. Bonetto A, Penna F, Muscaritoli M, Minero VG, Rossi Fanelli F, Baccino FM, et al. Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? *Free Radic Biol Med.* 2009;47(7):906-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19591922>
20. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press. Oxford; 2001. p. 936.
21. Shen KK, Ji LL, Chen Y, Yu QM, Wang ZT. Influence of glutathione levels and activity of glutathione-related enzymes in the brains of tumor-bearing mice. *Biosci Trends.* 2011;5(1):30–7.
22. Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. *Pharmacol Ther.* 2010;128(2):336–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732353>
23. Shrinivas K, Bhaskar MV, Aruna Kumari M, Nagaraj K RK. Antioxidants, lipid peroxidation and lipoproteins in primary hypertension. *Indian Heart J.* 2000;52:285–8.

24. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10).
25. Sies H., Jones DP. (2007) Oxidative stress. In: *Encyclopaedia of stress*. Ed: Fink G. San Diego, Elsevier. 45-48.
26. Trachtenberg BH HJ. Biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Hear Fail Clin*. 2009;5(4):561–77.
27. Bar-Shai M, Reznick AZ. Reactive nitrogen species induce nuclear factor-kappaB-mediated protein degradation in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(12):2112–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785025>
28. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A(5):822–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12004029>
29. Stratton SA, Heckmann R, Francis RS. Therapeutic Ultrasound: Its Effects on the Integrity of a Nonpenetrating Wound. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1984;5(5):278-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806407>
30. Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal Ultrasound and Exercise in Skeletal Muscle Regeneration. 2005;86:1304–10.
31. 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*. 2003;15(2):65–70.
32. Matheus JPC, Oliveira FB, Gomide LB, Milani JGPO, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. *Rev Bras Fisioter*. 2008;12(3):241–7.
33. Plentz RDM, Stoffel PB, Kolling GJ, da Costa ST, Beck C, Signori LU. Alterações hematológicas provocadas pelo ultra-som de 1MHz na forma contínua aplicadas no tratamento da fase aguda de lesão muscular iatrogênica em ratos. *Rev Bras Fisioter*. 2008;
34. Signori LU, da Costa ST, Neto AFS, Pizzolotto RM, Beck C, Sbruzzi G, et al. Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. *Physiotherapy*. 2011;97(2):163–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497251>
35. Signori LU, Teixeira ADO, da Silva AMV, Costa T, Dipp T, Plentz RDM, et al. Effects of therapeutic ultrasound on haematological dynamics and fibrinogen during the inflammatory phase after muscle injury in rats. *Acta Sci*. 2014;36(1):25–31.
36. Bunn JR, Canning J, Burke G, Mushipe M, Marsh DR, Li G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle--a biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. *J Orthop Res*.

2004;22(6):1336–44. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475218>

37. Rennó ACM, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, et al. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(1):5–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166589>
38. Camargo MZ, Siqueira CPC, Preti MCP, Nakamura FY, de Lima FM, Dias IFL, et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy and cold water immersion therapy on exercise-induced muscle damage in rats. *Lasers Med Sci.* 2012; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223060>
39. Stergioulas A. Low-Level Laser Treatment Can Reduce Edema in Second Degree Ankle Sprains. *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22(2):125–8.
40. Borges M, Filho RM, Laposy CB, Guimarães-Okamoto PTC, Chaves MP, Vieira ANLS, Melchert A. Nonsteroidal anti-inflammatory therapy. Changes on renal function of healthy dogs. *Acta Cirúrgica Bras.* 2013;28(12):842–7.
41. Nozaki M, Li Y, Zhu J, Ambrosio F. Improved Muscle Healing After Contusion Injury by the Inhibitory Effect of Suramin on Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth. *Am J Sport Med* 2008;2354–62.
42. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33(5):745–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15851777>
43. Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep.* 2008;60(1):3–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276980>
44. Wilcock IM, Cronin JB, Hing WA. Physiological response to water immersion: a method for sport recovery? *Sports Med.* 2006;36(9):747–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16937951>
45. Banfi G, Melegati G, Barassi A, Dogliotti G, Melzi d’Eril G, Dugué B, et al. Effects of whole-body cryotherapy on serum mediators of inflammation and serum muscle enzymes in athletes. *J Therm Biol.* 2009;34(2):55–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645650800106X>
46. Nadler SF, Weingand K, Kruse RJ. The physiologic basis and clinical applications of cryotherapy and thermotherapy for the pain practitioner. *Pain Physician.* 2004;7(3):395–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16858479>
47. DuBose DA, Leon LR, Morehouse DH, Rufolo DM, Blaha MD, Gordon CJ. Hypothermia induction and recovery in free-ranging rats. *J Therm Biol.* 2007;32(2):87–96. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306456506001203>

48. Mäkinen T, Rintamäki H, Hohtola E, Hissa R. Energy cost and thermoregulation of unrestrained rats during exercise in the cold. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1996;114(1):57–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8925427>
49. Carvalho N, Puntel G, Correa P, Gubert P, Amaral G, Morais J, et al. Protective effects of therapeutic cold and heat against the oxidative damage induced by a muscle strain injury in rats. *J Sports Sci.* 2010;28(9):923–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20544483>
50. Nemet D, Meckel Y, Bar-Sela S, Zaldivar F, Cooper DM, Eliakim A. Effect of local cold-pack application on systemic anabolic and inflammatory response to sprint-interval training: a prospective comparative trial. *Eur J Appl Physiol.* 2009;107(4):411–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2762537&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
51. Chen Z, Chen H, Rhee P, Koustova E, Ayuste EC, Honma K, et al. Induction of profound hypothermia modulates the immune/inflammatory response in a swine model of lethal hemorrhage. *Resuscitation.* 2005;66(2):209–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16053944>
52. Kim JC, Yi HK, Hwang PH, Yoon JS, Kim HJ, Kawano F, Ohira Y, Kim KC. Effects of cold-water immersion on VEGF mRNA and protein expression in heart and skeletal muscles of rats. *Acta Physiol Scand.* 2005;183(4):389–97.
53. Rhind SG, Castellani JW, Brenner IKM, Shephard ROYJ, Zamecnik J, Montain SJ, et al. Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;66–75.
54. Janský L, Pospíšilová D, Honzová S, Ulicný B, Srámek P, Zeman VKJ. Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1996;72(5-6):445–50.
55. Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine.* 1999;11(6):416–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10346981>
56. Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A Review of Therapeutic Ultrasound : *Phys Ther.* 2001;81(7):1351–8.
57. O'Brien WD. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93(1-3):212–55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1995002&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
58. Freitas LS, Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Pinho RA, Streck EL. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle

- after injury. *Cell Biol Int*. 2007;31(5):482–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196843>
59. Wu J. Shear stress in cells generated by ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;93:363–73.
 60. VanBavel E. Effects of shear stress on endothelial cells: possible relevance for ultrasound applications. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;93(1-3):374–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16970981>
 61. Bertuglia S. Mechanisms by which low-intensity ultrasound improve tolerance to ischemia-reperfusion injury. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33(5):663–71.
 62. Juffermans LJM, van Dijk A, Jongenelen CAM, Drukarch B, Reijerkerk A, de Vries HE, et al. Ultrasound and microbubble-induced intra- and intercellular bioeffects in primary endothelial cells. *Ultrasound Med Biol*. 2009;35(11):1917–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766381>
 63. Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB. The role of ultrasound-induced cavitation in the “in vitro” stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. *Ultrasonics*. 1980;18(1):33–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7350723>
 64. Iida K, Luo H, Hagsisawa K, Akima T, Shah PK, Naqvi TZ, et al. Noninvasive low-frequency ultrasound energy causes vasodilation in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(3):532–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16875980>
 65. Silveira PCL, Victor EG, Schefer D, Silva LA, Streck EL, Paula MM, et al. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound Med Biol*. 2010;36(1):44–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900747>
 66. Simonin J. On the mechanisms of in vitro and in vivo phonophoresis. *J Control Release*. 1995;33:125–41.
 67. Polat BE, Hart D, Langer R, Blankschtein D. Ultrasound-Mediated Transdermal Drug Delivery: Mechanisms, Scope, and Emerging Trends. *J Control Release*. 2012;152(3):330–48.
 68. Dalecki D. Mechanical Bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:229–48.
 69. Silveira PCL, da Silva LA, Tromm PTC, Scheffer DDL, de Souza CT, Pinho RA. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide phonophoresis on oxidative stress parameters after injury induced by eccentric exercise. *Ultrasonics*. 2012;52(5):650–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326779>

70. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393(4):561–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171167>
71. Schaser K-D, Disch AC, Stover JF, Lauffer A, Bail HJ, Mittlmeier T. Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. *Am J Sports Med.* 2007;35(1):93–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17197574>
72. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;196(2):193–222.
73. Sugita Y, Mizuno S, Nakayama N, Iwaki T, Murakami E, Wang Z, Endoh R, Furuhashi H. Nitric oxide generation directly responds to ultrasound exposure. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34(3):487–93.
74. Freitas TP, Gomes M, Fraga DB, Freitas LS, Rezin GT, Santos PM, et al. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on lipoperoxidation and fibrogenesis in an animal model of wound healing. *J Surg Res.* 2010;161(1):168–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577772>
75. Victor EG, Silveira PCL, Possato JC, da Rosa GL, Munari UB, de Souza CT, et al. 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* 2012;10(1):11.
76. Ohlendieck K. Proteomics of skeletal muscle glycolysis. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2010;1804(11):2089–101. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963910002165>
77. Kang J Il, Kim Y-N, Choi H. Effects of Low-intensity Pulsed Ultrasound and Cryotherapy on Recovery of Joint Function and C-reactive Protein Levels in Patients after Total Knee Replacement Surgery. *J Phys Ther Sci.* 2014;26(7):1033–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4135191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>