

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**

**RODRIGO SANTOS ALMEIDA**

**EFEITO ANGIOGÊNICO DA APLICAÇÃO DE ONDAS DE CHOQUES RADIAIS NA  
MUSCULATURA ÍNTEGRA DO QUADRÍCEPS DE RATOS *Wistar*: UMA NOVA  
PERSPECTIVA PARA FISIOLOGIA MUSCULAR**

Belo Horizonte

2020

**RODRIGO SANTOS ALMEIDA**

**EFEITO ANGIOGÊNICO DA APLICAÇÃO DE ONDAS DE CHOQUES RADIAIS NA  
MUSCULATURA ÍNTEGRA DO QUADRÍCEPS DE RATOS *Wistar*: UMA NOVA  
PERSPECTIVA PARA FIOLOGIA MUSCULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.

Área de Concentração: Resposta inflamatória à agressão tecidual.

Linha de Pesquisa: Repercussões locais e sistêmicas em lesões teciduais fármacos aplicados em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Percope de Andrade.

Belo Horizonte - MG

2020

Almeida, Rodrigo Santos.

AL447e Efeito angiogênico da aplicação de ondas de choques radiais na musculatura íntegra do quadríceps de ratos Wistar [manuscrito]: uma nova perspectiva para fisiologia muscular. / Rodrigo Santos Almeida. - - Belo Horizonte: 2020.

70f.: il.

Orientador (a): Marco Antônio Percope de Andrade.

Área de concentração: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Indutores da Angiogênese. 2. Músculo Quadríceps. 3. Fisiologia. 4. Fenômenos Fisiológicos Musculoesqueléticos e Neurais. 5. Dissertação Acadêmica. I. Andrade, Marco Antônio Percope de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WE 102

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitora:** Prof<sup>a</sup>. Sandra Goulart Almeida

**Vice-Reitor:** Prof. Alessandro Fernandes Moreira

**Pró-Reitor de Pós-Graduação:** Prof. Dr. Fábio Alves da Silva Júnior

**Pró-Reitor de Pesquisa:** Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

### **Faculdade de Medicina**

**Diretor:** Prof. Dr. Humberto José Alves

**Vice-Diretor:** Prof<sup>a</sup>. Alamanda Kfoury Pereira

**Coordenador do Centro de Pós-Graduação:** Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

**Chefe do Departamento de Cirurgia:** Prof. Dr. Marco Antônio Gonçalves Rodrigues

**Coordenadora do Centro de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vivian Resende

**Chefe do Departamento do Aparelho Locomotor:** Prof. Dr. Robinson Esteves Santos Pires

### **Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vivian Resende (Coordenadora)

Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro (Subcoordenador)

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Antônio Percope de Andrade

Prof. Daniel Vitor Vasconcelos Santos

Artur Wiliam Caldeira Abreu Veloso – representante discente



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**EFEITO ANGIOGÊNICO DA APLICAÇÃO DE ONDAS DE CHOQUES RADIAIS NA MUSCULATURA ÍNTEGRA DO QUADRÍCEPS DE RATOS WISTAR**

**RODRIGO SANTOS ALMEIDA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **nove de novembro de dois mil e vinte**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

**DANIEL ANTERO DE ALMEIDA GALDINO**  
FACULDADE DE MEDICINA DE BARBACENA

**ROBINSON ESTEVES SANTOS PIRES**  
UFMG

**MARCO ANTONIO PERCOPE DE ANDRADE - Orientador**  
UFMG

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Antero de Almeida Galdino, Usuário Externo**, em 09/11/2020, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio Percopo de Andrade, Professor do Magistério Superior**, em 09/11/2020, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Esteves Santos Pires, Professor do Magistério Superior**, em 12/11/2020, às 19:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0358214** e o código CRC **4369D00B**.

## **NOTA TÉCNICA**

Este trabalho foi realizado no Biotério da Faculdade de Medicina de Barbacena em conjunto com laboratório de Angiogênese do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais com apoio financeiro da iniciativa privada – Fundação José Bonifácio.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre está presente em todas as realizações da minha vida, dando-me força e amparo.

Em especial, ao Professor Marco Antônio Percope de Andrade, pela orientação, atenção, paciência, principalmente com minhas teimosias, e pela grande oportunidade de poder realizar este trabalho.

Ao Professor e Mestre, Márcio Heitor Stelmo da Silva, pelo auxílio nos procedimentos experimentais.

Ao colega e Mestre em Engenharia Aeronáutica, Camilo Brandão de Resende, pela detalhada orientação estatística.

Ao amigo e sócio, Newton da Fonseca Silveira, que é um verdadeiro exemplo na Ortopedia e na vida que sempre me apoiou nesta etapa.

À Professora e Doutora Silvia Passos Andrade, que abriu a porta do Laboratório de Angiogênese do Instituto de Ciências e Biologia da Universidade Federal de Minas Gerais e me ajudou na compreensão desse processo.

À Professora Doutora Fernanda Brandão Machado Carneiro, coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – Faculdade de Medicina (CEUA–FAME) e Barbacena e ao diretor dessa instituição, Marco Aurélio Bernardes de Carvalho, que me apoiaram em toda a trajetória para este sonho se tornasse realidade.

Ao Reitor da Faculdade de Medicina de Barbacena (FUNJOB), Deputado Bonifácio José Tamm de Andrada, pela confiança e pelo conhecimento compartilhado, fazendo a experiência do aprendizado algo magnífico e apaixonante.

Ao amigo Doutor Dimas de Araújo Vidigal (*in memoriam*), que idealizou este trabalho e fez muita falta nesta caminhada.

Ao Professor Doutor Alcino Lázaro da Silva, que com todo seu conhecimento e experiência na carreira acadêmica apresentou ótima receptividade e atenção comigo e que permitiu a realização desta etapa de tamanha importância na minha vida.

Aos alunos Ítalo Guilherme Giarola de Freitas Mariano e Raquel Ida Ferreira, que não pouparam seu tempo para auxílio na realização deste trabalho.

À amiga Doutora Raissa Coelho Andrade, que inúmeras vezes fez ponderações de real importância para esta dissertação.

À minha amada esposa, Ana Carolina Rodrigues Laguardia Almeida, que com seu amor e carinho me confortou nos momentos mais difíceis. Aos meus queridos filhos, Ester Laguardia Almeida e Pedro Laguardia Almeida, que souberam com um sorriso dar sentido a qualquer sacrifício.

Aos meus pais, Marconi Ferreira Almeida (*in memoriam*) e Heloisa Maria dos Santos Almeida, pelo amor incondicional e exemplo de vida.



“O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos”.

Lao-Tsé.

“As novas opiniões sempre despertam suspeita e, em geral, oposição, sem qualquer outra razão que não o fato de já não serem comuns”.

Jonh Locke.

“A ciência da Medicina, se não quiser ser rebaixada à categoria de emprego, deve cuidar de sua história e tomar conta dos velhos monumentos que só tempos pretéritos lhe deixaram como legado”.

Émile Littré.

“A educação promove o homem e é garantia inalienável do seu futuro”.

Bonifácio José Tamm de Andrada.

“Nós somos o que fazemos repetidamente. A excelência, portanto, não é um ato, mas um hábito”.

Will Durant.

## RESUMO

A terapia por ondas de choque extracorpóreas (TOC) foi introduzida na prática médica no início dos anos 90, como derivação da litotripsia urológica. Nos Estados Unidos, o uso de tais ondas no sistema musculoesquelético foi aprovado em 2001 e sua aplicação semelhante no Brasil em 1998. Atualmente tem sido aplicado para tratar diversas doenças, como: epicondilites, tendinites patelares, tendinoses, tendinites calcáreas do ombro, retardo de consolidação e pseudoartrose de fraturas, bursites do grande trocanter, fasciíte plantar, diversas lesões esportivas. Além disso, há outras indicações em estudo, como úlceras diabéticas, espasticidades neuromusculares, disfunção erétil, obstrução de coronárias, síndrome da dor pélvica crônica e no tratamento estético da celulite, como também o uso em musculatura íntegra de atletas saudáveis, demonstrando melhora da elasticidade e recrutamento muscular. O presente estudo avaliou o efeito da aplicação de ondas de choque com aparelho radial da empresa *Electro Medical System* (EMS) – o *Swiss Dolorclast Smart 20* na musculatura íntegra do quadríceps direito de ratos *Wistar*, comparando-o com o mesmo grupo muscular do lado esquerdo, o qual não foi submetido à aplicação. O experimento foi realizado no biotério da Faculdade de Medicina de Barbacena-MG. Foram submetidos 12 ratos *Wistar* à aplicação de ondas de choque sob anestesia intraperitoneal. Foram realizadas três aplicações com intervalo semanal, conforme protocolo do modelo do aparelho, e na quarta semana, sob aprofundamento anestésico, as cobaias foram eutanasiadas e a musculatura do quadríceps foi encaminhada para análise histológica comparativa no laboratório de Microscopia da Faculdade de Medicina de Barbacena e no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo revisadas no laboratório TECSAR, com sede em Belo Horizonte. Verificou-se discreto aumento de proliferação fibrovascular com número de núcleos por fibras, células satélites e vasos com diferença significativa ( $p < 0,005$ ) no quadríceps submetido à aplicação de ondas de choque em relação ao contralateral, o que demonstrou a capacidade de angiogênese na musculatura íntegra pelo método empregado.

**Palavras-chave:** Ondas de choque. Angiogênese. Musculatura íntegra.

## ABSTRACT

Extracorporeal shockwave therapy (ESWT) was introduced in medical practice in the early 1990s as a derivation of urological lithotripsy. In the United States, the use of ESWT in the musculoskeletal system was approved in 2001, and in Brazil, in 1998. Currently it has been applied to treat various orthopedic pathologies (such as epicondylitis, patellar tendinitis, tendinosis, calcareous shoulder tendinitis, retardation. of consolidation, pseudoarthrosis of fractures, great trochanter bursitis, plantar fasciitis, various sports injuries) here are other indications being studied such as diabetic ulcers, neuromuscular spasticity, erectile dysfunction, coronary obstruction, chronic pelvic pain syndrome and aesthetic treatment as well as the use in muscles of healthy athletes showing improvement in elasticity and recruitment muscular. The present study evaluated the right quadriceps musculature of Wistar rats after shockwave application with the radial appliance Swiss Dolorclast Smart 20 (Electro Medical System) and compared with the same muscle group on the left side, which was not subjected to such waves. The experiment was carried out in the vivarium of the Faculty of Medicine of Barbacena - MG. Twelve Wistar rats were submitted to shockwave application under intraperitoneal anesthesia. The animals were submitted to three weekly interval applications, according to the protocol of the appliance model, and on the fourth week, under anesthetic deepening, the Wistar rats were euthanized and the quadriceps muscles were sent for comparative histological analysis in the Microscopy laboratory of the Faculty of Medicine of Barbacena and the Institute of Biological Sciences of the Federal University of Minas Gerais and reviewed in the TECSAR laboratory, located in Belo Horizonte. There was a slight increase in fibrovascular proliferation with the number of nuclei per fiber, presence of satellite cells and vessels with significant statistical difference ( $p < 0.005$ ) on the quadriceps submitted to shockwave application in relation to the contralateral one, which demonstrated the capacity of angiogenesis in intact muscles by the method employed.

**Keywords:** Shock waves. Angiogenesis. Integrated musculature.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EMS	<i>Electro Medical System</i>
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase
FAME	Faculdade de Medicina
FUNJOB	Faculdade de Medicina de Barbacena
HE	Hematoxilina e eosina
Hz	Hertz
MHz	Mega-hertz – $10^6$ hertz.
MPa	Megapascal
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
nm	Milimícron do metro ( $1 \times 10^{-9}$ )
NO	Óxido nítrico
OC	Ondas de choque
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
TECSA	Tecnologia em Saúde Animal
TOC	Terapia por ondas de choque
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
$\mu\text{m}$	Micrômetro ( $1 \times 10^{-6}$ )

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização do musculoesquelético.....	17
Figura 2 - Fisiologia da contração muscular.....	18
Figura 3 - As etapas da angiogênese.....	20
Figura 4 - A família de fatores de crescimento derivados do endotélio e receptores.....	21
Figura 5 - Representação esquemática da onda de choque típica com cavitação (alto pico de tensão com curto período de duração do pulso e elevação rápida com queda exponencial e baixa frequência -22 Hz) e o ultrassom (ondas senoidais com baixa amplitude e alta frequência -1 e 3 MHz)	23
Figura 6 - Diferentes geradores de choque.....	24
Figura 7 - Instalações do Biotério da FAME no momento da aplicação das ondas de choque.....	28
Figura 8 - Aparelho <i>Swiss Dolorclast Smart</i> .....	30
Figura 9 - Biópsia do quadríceps esquerdo.....	31
Figura 10 - Biópsia do quadríceps direito.....	32
Figura 11 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda do animal 1, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	36
Figura 12 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 2, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	37
Figura 13 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 3, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	38
Figura 14 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 4, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	39
Figura 15 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 5, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	40

Figura 16 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 6, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	41
Figura 17 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 7, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	42
Figura 18 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 8, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	43
Figura 19 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 9, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	44
Figura 20 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 10, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	45
Figura 21 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 11, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	46
Figura 22 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 12, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B.....	47

## LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 - <i>Boxplot</i> comparando as variáveis estudadas em patas direitas (teste) e esquerdas (controle).....	49
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas gerais da avaliação inicial de ratos <i>Wistar</i> submetidos às ondas de choque no Biotério da Faculdade de Medicina de Barbacena, Minas Gerais.....	35
Tabela 2 - .....	48
Tabela 3 - Comparação dos resultados obtidos no estudo das patas direitos (teste) e patas esquerdas (controle).....	49



## SUMÁRIO<sup>1</sup>

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Organização do musculoesquelético.....	16
1.2 Fisiologia e contração celular.....	17
1.3 Angiogênese do musculoesquelético.....	18
1.4 Histórico do uso das ondas de choque em Medicina.....	21
1.5 Princípios das ondas de choque.....	23
1.6 Justificativa.....	25
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivo específico.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Desenho experimental.....	27
3.2 Amostragem.....	28
3.3 Métodos.....	29
3.4 Aplicação das ondas de choque radiais.....	29
3.5 Extração do tecido muscular.....	31
3.6 Análise histológica do tecido muscular.....	32
3.7 Descarte de carcaça.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Análise histológica.....	36
5 DISCUSSÃO.....	50
6 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi revisado com base nas novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 2019

ANEXOS E APÊNDICES.....	58
-------------------------	----

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido muscular esquelético é formado por feixes de células longas, cilíndricas, multinucleadas e com inúmeros filamentos cilíndricos chamados miofibrilas. As fibras musculares esqueléticas originam-se no embrião pela fusão de células alongadas, os mioblastos (CORMACK; HAM, 1991).

Nas fibras musculares esqueléticas, os numerosos núcleos elípticos localizam-se na periferia, logo abaixo do sarcolema, que é a membrana delgada que reveste a fibra. Essa localização nuclear característica ajuda a distinguir o musculoesquelético do cardíaco, ambos com estriações transversais, uma vez que, no músculo cardíaco os núcleos são centrais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Em cada extremidade da fibra muscular a camada superficial do sarcolema funde-se com uma fibra do tendão. A fibra do tendão, por sua vez, se agrupa em feixes para formar os tendões dos músculos que se inserem nos ossos (OVALLE; NAHIRNEY; NETTER, 2014).

### 1.1 Organização do musculoesquelético

O corpo humano contém numerosos órgãos musculares esqueléticos que se movem e sustentam nosso corpo presos aos ossos pelos tendões. O musculoesquelético está sob controle voluntário do sistema nervoso somático (MONTANARI, 2016)

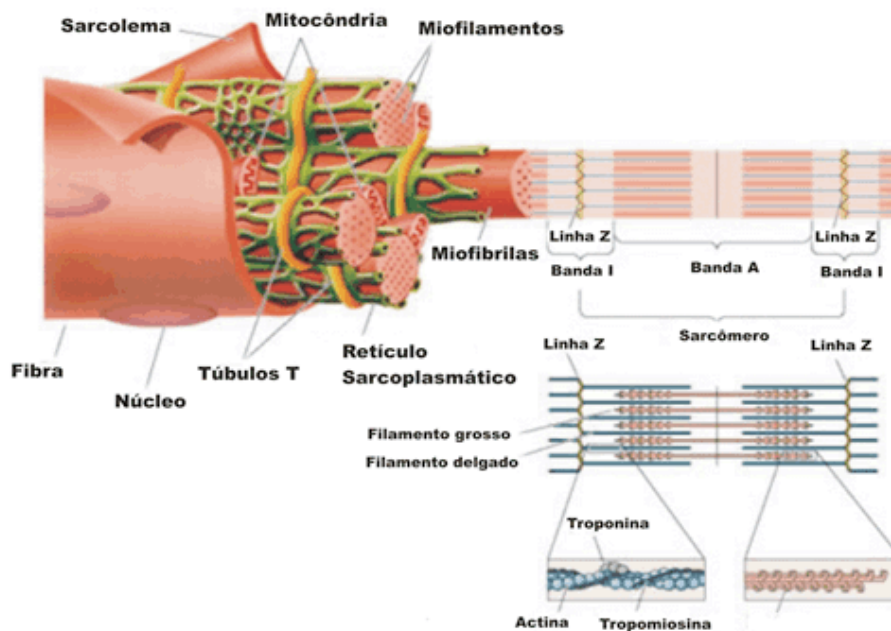
O musculoesquelético se constitui de múltiplos feixes (fascículos) de células unidas, chamadas fibras musculares, que são envolvidas por camada de tecido conjuntivo chamada de epimísio. Do epimísio partem finos septos de tecido conjuntivo, chamados de perimísio, que se dirigem para o interior do músculo, separando e envolvendo os feixes de fibras. Entre as fibras musculares há uma delicada camada de tecido conjuntivo, denominada endomísio, formada por fibras reticulares e células de tecido conjuntivo, que contém extensa rede de capilares sanguíneos (OVALLE; NAHIRNEY; NETTER, 2014).

As células musculares são formadas a partir da fusão dos mioblastos do desenvolvimento em processo conhecido como miogênese. As fibras musculares são cilíndricas e possuem mais de um núcleo e múltiplas mitocôndrias para atender às necessidades energéticas. Elas são compostas de miofibrilas que apresentam

filamentos de miosina e actina, repetidos em unidades chamadas de sarcômeros, que são considerados a unidade funcional da musculatura estriada e responsável por essa aparência. Cada célula muscular esquelética é envolvida por uma lâmina basal. O tecido conjuntivo do músculo contém ainda vasos linfáticos e nervos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Uma função importante do tecido conjuntivo é manter unidas as fibras musculares, além de agir na transmissão das forças produzidas pelo músculo na sua contração (CORMACK; HAM, 1991)

Figura 1 - Organização do musculoesquelético  
**Organização da fibra muscular**



Demonstração da unidade funcional do músculo – sarcômero.

Linha Z: entre um disco e outro. Z do alemão – *Zwischenscheibe*.

Banda I: de isotrópica, quando observada pela luz polarizada composta de filamentos finos de actina.

Banda A: de anisotrópica, mais escura, onde ocorre sobreposição de filamentos finos com espessos de miosina.

Complexo actina-miosina-troponina e tropomiosina.

Fonte: [www.sobiologia.com.br](http://www.sobiologia.com.br).

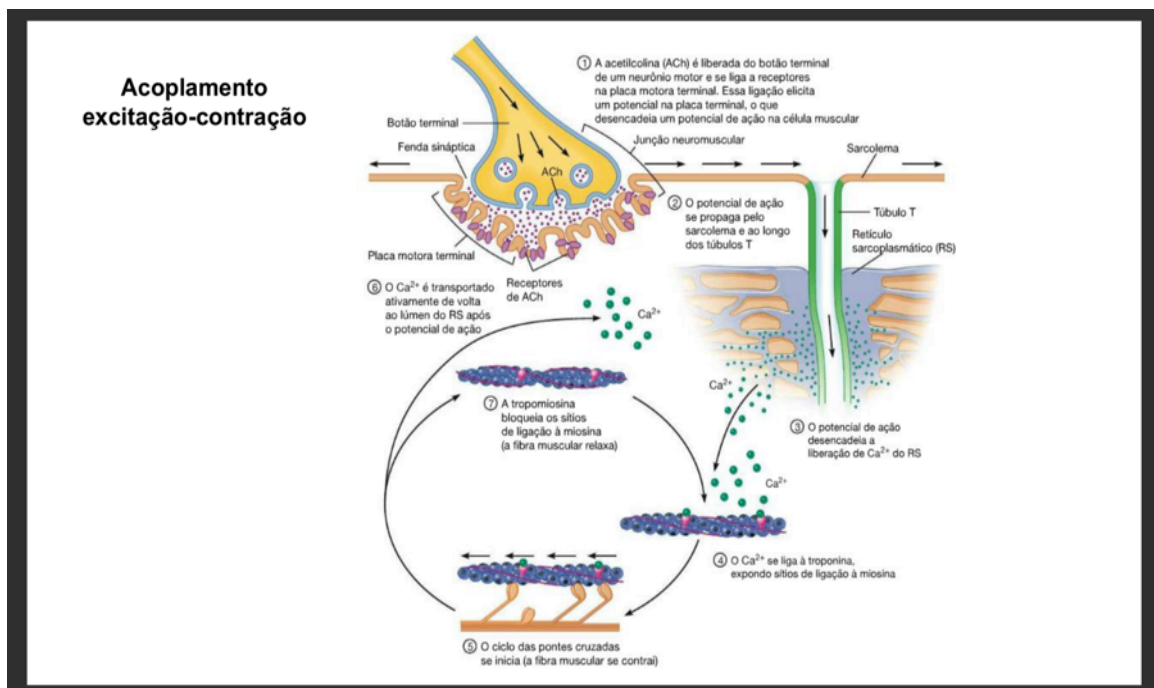
## 1.2 Fisiologia e contração celular

Além dos componentes de actina e miosina que constituem o sarcômero, as fibras musculares esqueléticas também contêm outras duas importantes proteínas reguladoras, a troponina e a tropomiosina, que são necessárias para que ocorra a

contração muscular. Essas proteínas estão associadas à actina e cooperam para prevenir sua interação com a miosina. As células musculares esqueléticas são excitáveis e estão sujeitas à despolarização pelo neurotransmissor acetilcolina, liberado na junção neuromuscular pelos neurônios motores.

Uma vez que uma célula é suficientemente estimulada, o retículo sarcoplasmático da célula libera cálcio iônico ( $\text{Ca}^{2+}$ ), que então interage com a proteína reguladora troponina. A troponina ligada ao cálcio sofre uma mudança do formato que leva ao movimento da tropomiosina, expondo subsequentemente os sítios de ligação da miosina à actina. Isso permite a ciclagem em ponte cruzada dependente de ATP e miosina e a contração do músculo (GUYTON; ALL, 2011).

Figura 2 - Fisiologia da contração muscular



Junção neuromuscular com secreção de acetilcolina.

Inicia aumento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular.

$\text{Ca}^{++}$  se prende à troponina.

Desloca o complexo troponina-tropomiosina dos sítios de ligação da actina na miosina.

A ponte cruzada da miosina se liga à actina.

Fonte:www.sobiologia.com.br.

### 1.3 Angiogênese do musculoesquelético

A angiogênese é um mecanismo de múltiplos passos, controlada por fatores que se desenvolvem quando algum estímulo induz a mudança das células endoteliais de um estado de repouso para um estado de replicação e invasão. Essa

neovascularização é principalmente uma resposta adaptativa à hipóxia tecidual e depende do acúmulo do fator de transcrição induzido pela hipóxia, que serve para aumentar a transcrição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores VEGF-R, pelas células em sofrimento isquêmico. A indução da angiogênese é observada no exercício e treinamento físico e a regulação do crescimento dos vasos sanguíneos depende do controle da produção de VEGF a partir de alterações na estabilidade e taxa de transcrição de seu ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) (VALIATTI *et al.*, 2011)

O VEGF é um importante fator pró-angiogênico, sendo potente estimulador de mitoses para as células endoteliais. Para os efeitos angiogênicos do VEGF serem favoráveis, porém, é preciso que haja a produção do óxido nítrico (NO) no endotélio vascular, por apresentar propriedades que auxiliam no funcionamento adequado do endotélio (BLOOR, 2005).

O alvo dos fatores angiogênicos são os capilares, que contêm células endoteliais sobre uma lâmina basal, cobertas por camada descontínua de células presentes na parede vascular (periócitos) e células musculares lisas. Um dos processos iniciais da resposta angiogênica é a quebra das ligações entre as células dessas camadas. As células endoteliais ativadas geram enzimas proteolíticas que permitem a degradação da matriz extracelular e migração dessas células através da membrana basal a partir do vaso da qual se originam (VALIATTI *et al.*, 2011).

Figura 3 - As etapas da angiogênese



ESTÁGIO 0 - Vaso estável. Componentes maiores que um capilar normal pode ser envolvido no processo de angiogênese.

ESTÁGIO 1 – Alterações dentro dos vasos.

ESTÁGIO 2 – Formação de um novo canal.

ESTÁGIO 3 – Maturação de um novo vaso.

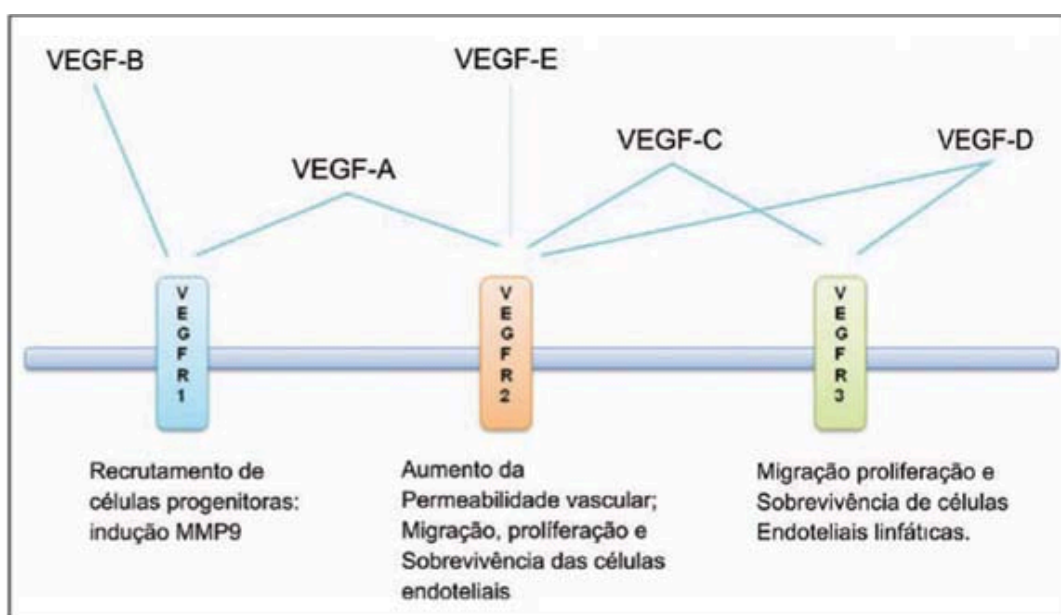
Fonte: Lorier *et al*, Arquivo Brasileiro de Cardiologia 2011

O papel dos capilares é servir como interface para a entrega de oxigênio e remoção de metabólitos de/para os tecidos. Vários estudos na última década ajudaram na compreensão da angiogênese. O musculoesquelético compreende cerca de 40% da massa corporal em humanos e sua densidade capilar tem significativo impacto no metabolismo, função endócrina e locomoção e é rigidamente regulada em diferentes níveis (HOIER; HELLSTEN, 2014).

O musculoesquelético é também altamente adaptável e, assim, um dos poucos sistemas que podem ser experimentalmente manipulados (por exemplo, exercício físico) para estudar a regulação fisiológica da angiogênese. Um papel fundamental na angiogênese é desempenhado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (HAAS; NWADOZI, 2015).

A regulação do crescimento dos vasos sanguíneos para atender às necessidades do tecido depende do controle da produção de VEGF a partir de mudanças na estabilidade do seu mRNA e na sua taxa de transcrição (ABREU; CARDOSO; CECATTO, 2017). O processo de múltiplos estágios da angiogênese ocorre pela integração de um conjunto de sinais associados a estresses hipóxicos, metabólicos e mecânicos dentro do músculo ativo. A doença arterial periférica e o diabetes apresentam paradoxal falta de angiogênese (FERREIRA *et al.*, 2011).

Figura 4 - A família de fatores de crescimento derivados do endotélio e receptores



Propriedades:

- 1- Estimulo à angiogênese.
- 2- Aumento da permeabilidade vascular, fenestração.
- 3- Efeito pró-inflamatório.
- 4- Efeito neuroprotetor.
- 5- Fator de sobrevivência vascular .

Fonte: Rev.bras.ofthalmol.vol.67 Rio de Janeiro Nov./Dec.2008

#### 1.4 Histórico do uso das ondas de choque em Medicina

Durante a última Guerra Mundial, foi observado que naufragos que permaneceram na água na proximidade de explosões de bombas apresentavam danos pulmonares letais ao serem resgatados, sem que fosse encontrada alguma lesão externa. Esses achados despertaram o interesse militar alemão a fim de formar mais uma arma de guerra. Estudos demonstraram, porém, que seria uma



arma bélica sem grande uso fora do meio líquido, e os métodos da época a supriam com mais facilidade e economia (WANG *et al.*, 2012).

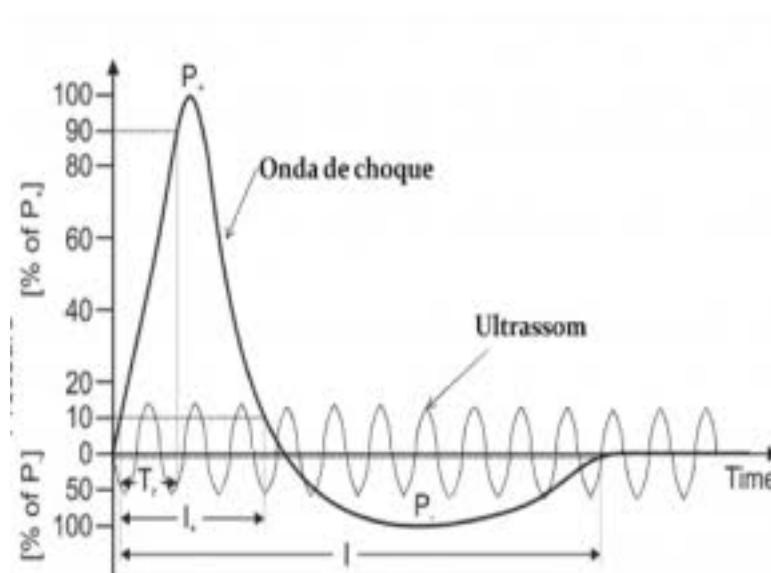
O interesse continuou devido às evidências causadas e documentadas pelo efeito da onda de choque (OC) nos tecidos humanos. Em 1950 foram realizadas investigações sistemáticas para o uso de OC na Medicina, e nos Estados Unidos foi aceita a primeira patente de um gerador de OC eletro-hidráulico. De 1968 até 1971, a interação entre OC e tecido biológico em animais foi investigada pelo Departamento de Defesa da Alemanha. O resultado mostrou que as OCs causam efeitos no organismo, particularmente na interface do corpo. Em 1974, o Departamento de Pesquisa e Ciência da Alemanha financiou o programa de pesquisa “Aplicação de Ondas de Choque Extracorpóreas”. O procedimento foi desenvolvido pela Companhia Dornier, da Alemanha. Pela primeira vez, em fevereiro de 1980, um paciente com cálculo renal foi tratado com sucesso, em Munique, com equipamento protótipo chamado *Lithotripter* HM1 (LOHRER *et al.*, 2016).

A terapia por ondas de choque extracorpóreas (TOC) foi introduzida na prática médica no início dos anos 80, como derivação da litotripsia urológica. Nos Estados Unidos, o uso de tais ondas no sistema musculoesquelético foi aprovado em 2001 e sua aplicação semelhante no Brasil em 1998. Atualmente têm sido aplicadas para tratar diversas doenças, como: epicondilites (THIELE; THIELE; GERDESMEYER, 2015), tendinites patelares (CHUNG; WILEY, 2002), tendinoses e tendinites calcárias do ombro (LOUWERENS *et al.*, 2014), retardo de consolidação e pseudoartrose de fraturas (SCHADEN *et al.*, 2015), bursites do grande trocanter (MAFFULLI; HEMMINGS, S.; MAFFULLI, 2014), fasciíte plantar (WANG *et al.*, 2006), diversas lesões esportivas (WANG, 2012). Além disso, há outras indicações em estudo, como úlceras diabéticas (HITCHMAN *et al.*, 2019), espasticidades neuromusculares (JIN-YOUN *et al.*, 2014), disfunção erétil (ASSALY *et al.*, 2019), obstrução de coronárias (ZUOZIENE *et al.*, 2008), síndrome da dor pélvica crônica (VAHDATPOUR *et al.*, 2013) e no tratamento estético da celulite (CHRIST *et al.*, 2008), como também em musculatura íntegra de atletas saudáveis, demonstrando melhora da elasticidade e recrutamento muscular (NOTARNICOLA *et al.*, 2018).

## 1.5 Princípios das ondas de choque

A onda de choque é um fenômeno que cria intensa troca de pressão entre os meios. Ela aparece na atmosfera em eventos explosivos, quando um material explosivo é detonado, nos relâmpagos ou quando aviões quebram a barreira do som. Também se fala em ondas acústicas, que se caracterizam por pulsos de alta pressão em curto tempo. Essa intensa troca de pressão produz ondas fortes que se propagam pelo meio. A propagação difere-se pela densidade e se o meio é líquido, ar ou outros. Apesar de sua relação com o ultrassom, as OCs têm características diferentes. O ultrassom é uma onda senoidal, de baixa amplitude e alta frequência - >1 KHz (HEINZLOHRER; VASILEIOS; MALLIAROPOULOS, 2016).

Figura 5 - Representação esquemática da onda de choque típica com cavitação (alto pico de tensão com curto período de duração do pulso e elevação rápida com queda exponencial e baixa frequência -22 Hz) e o ultrassom (ondas senoidais com baixa amplitude e alta frequência -1 e 3 MHz)



Fonte: [www.dolorclast.com.br](http://www.dolorclast.com.br).

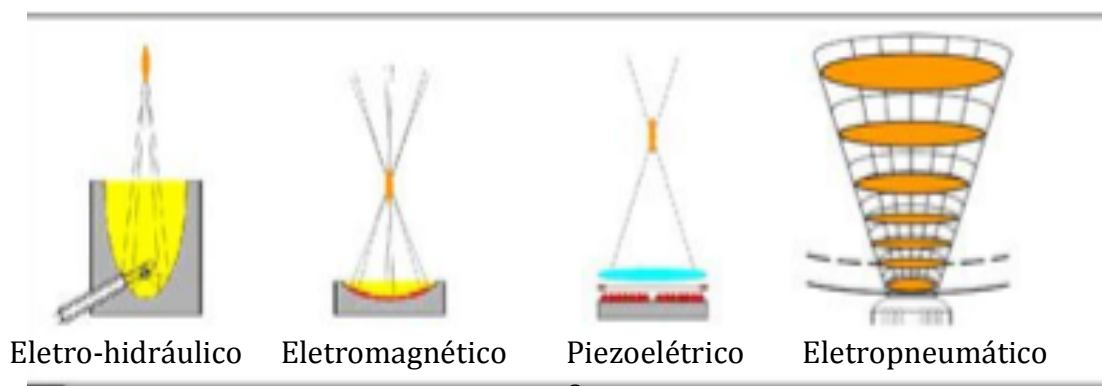
As ondas de choque produzem dois efeitos básicos: um direto (primário), de geração da força mecânica, e outro indireto (secundário), de força mecânica chamada de cavitação. Durante a fase de tensão as forças da onda excedem a resistência à tração dinâmica da água (ou fluido intersticial), gerando bolhas de cavitação. Essas bolhas aumentam e diminuem de volume e entram em colapso,

liberando grande quantidade de energia armazenada na forma de jatos de água. Nos líquidos muito viscosos, esse fenômeno é suprimido (GLEITZ, 2011).

As ondas de choque usadas no sistema musculoesquelético são pulsos mecânicos sonoros de alta energia, com alto gradiente de pressão (positiva acima de 100 MPa seguida por uma queda brusca até -5 a 10 MPa) aplicadas em curto espaço de tempo em um ponto específico do corpo (GLEITZ, 2011).

Existem quatro técnicas principais pelas quais as ondas de choque são geradas. Esses são princípios eletro-hidráulicos, eletromagnéticos, piezoelétricos, eletropneumáticos e cada um deles representa uma técnica diferente de gerar ondas de choque. O padrão de ondas de choque difere da onda de ultrassom, que é tipicamente bifásica e tem uma pressão de pico de 0,5 bar (LOHRER *et al.*, 2016).

Figura 6 - Diferentes geradores de choque



**Eletro-hidráulico** – produzem uma bolha por descarga de alta voltagem entre dois eletrodos em água no foco mais próximo de um refletor paraelipsoidal. O plasma em expansão gera uma frente de choque, que é refletida e focada em segundo foco no tecido-alvo.

**Eletromagnético** – um pulso de alta voltagem é enviado através de uma bobina, que é oposta a uma membrana metálica. A bobina produz um campo magnético, resultando em súbita deflexão da membrana e gerando ondas de pressão em fluido. As ondas são focadas por uma lente e se inclinam para uma onda de choque perto do foco.

**Piezoelétrico** – este gerador produz ondas de choque por uma descarga de alta voltagem através de um padrão de cristais piezoelétricos montados na superfície de um suporte esférico que é colocado dentro de uma cavidade cheia de líquido. Cada elemento que se expande gera um pulso de pressão que se propaga em direção ao centro ou na região focal, do arranjo.

**Eletropneumático** - neste gerador o ar comprimido acelera um projétil dentro de um tubo-guia cilíndrico. Quando o projétil atinge o aplicador no final do tubo, uma onda de pressão é produzida e se expande radialmente no tecido-alvo. Esses dispositivos induzem uma cavitação acústica.

Fonte: [www.dolorclast.com.br](http://www.dolorclast.com.br).

O padrão de ondas de choque é unifásico com pressão de pico tão alta quanto 500 bar. Existem dois tipos básicos de ondas de choque: primário – são as forças mecânicas diretas que resultam na energia de pulso benéfica máxima concentrada no ponto-alvo; secundário – que são as forças mecânicas indiretas por

cavitação que podem causar efeito negativo ou dano aos tecidos (LOHRER *et al.*, 2016).

Em vários estudos com emprego das ondas de choque para reparo de lesões ósseas e musculares foi demonstrado o crescimento de novos vasos, incluindo capilares. A utilização de tal método libera o crescimento angiogênico e os fatores de proliferação, incluindo enzima óxido nítrico sintase (eNOS), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA3) (LOHRER *et al.*, 2016).

Levando-se em consideração esses aspectos, o objetivo deste estudo foi verificar se o estímulo produzido por ondas de choque do tipo eletropneumático, ou seja, do tipo radial, induziria a angiogênese na musculatura íntegra do quadríceps de ratos *Wistar*.

## **1.6 Justificativa**

O estudo se justifica por se tratar de uma nova abordagem do emprego das ondas de choque em musculatura de atletas saudáveis para diminuir a ocorrência de lesões musculares durante a temporada esportiva, como também minimizar os danos do desuso após procedimentos cirúrgicos articulares, diminuindo o tempo de recuperação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente estudo propõe avaliar a angiogênese na periferia da musculatura íntegra de quadríceps de ratos *Wistar* submetidos a três sessões semanais de aplicação de ondas de choque radiais.

### **2.2 Objetivo específico**

Relatar a proliferação vascular por meio de microscopia ótica convencional do material com coloração de rotina por hematoxilina e eosina (HE) e protocolo de Gomori do quadríceps íntegro de ratos submetidos à aplicação de ondas de choque radiais.

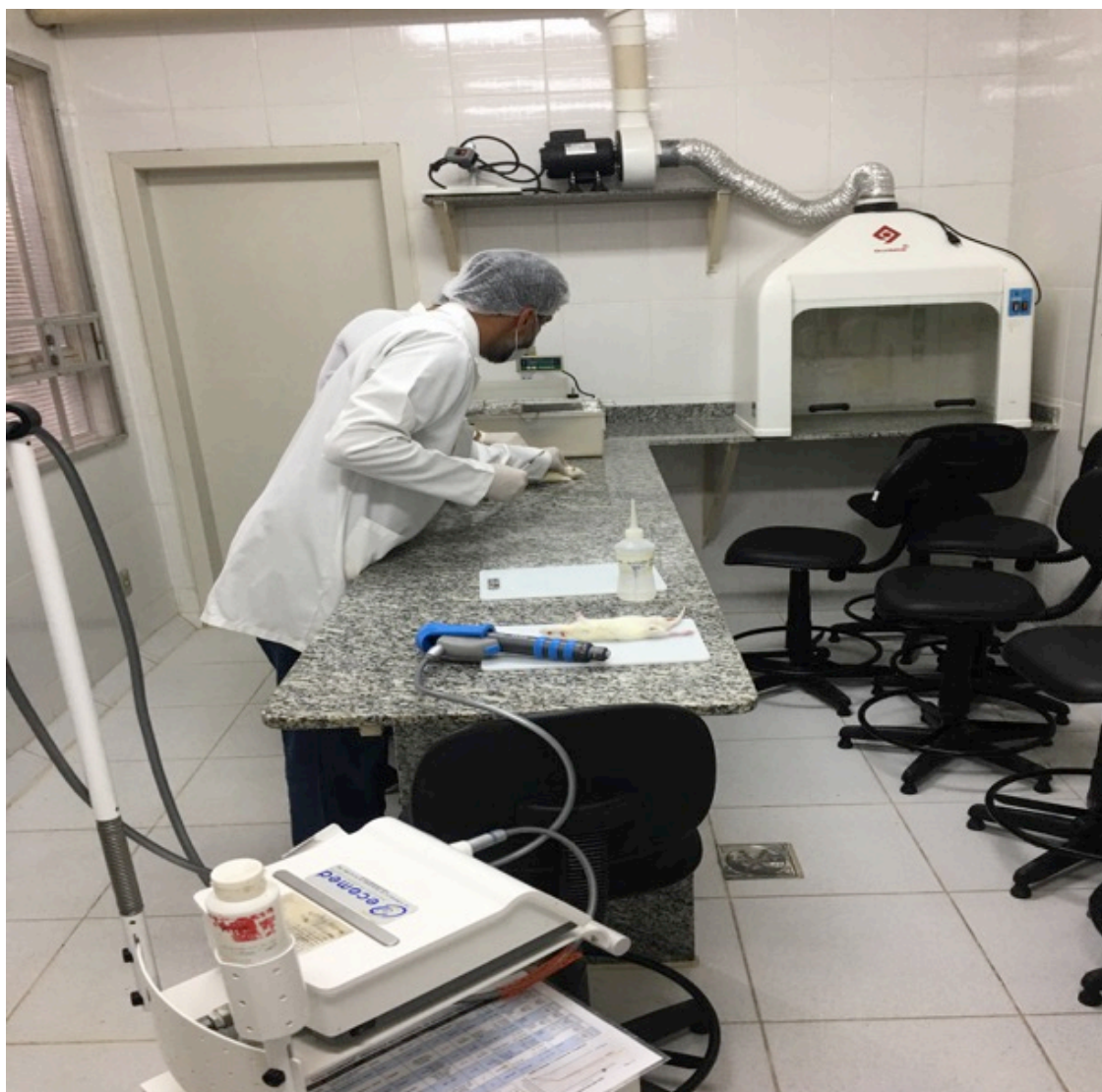
### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho experimental**

Trata-se de estudo experimental prospectivo para avaliação dos efeitos histológicos da terapia por onda de choque na musculatura do quadríceps de ratos *Wistar*, aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA – FAME de Barbacena) sob o protocolo número 01/2017.

O estudo foi realizado no biotério da Faculdade de Medicina de Barbacena, Minas Gerais sob a coordenação e supervisão técnica do professor e mestre veterinário Márcio Heitor Stelmo da Silva.

Figura 7 - Instalações do Biotério da FAME de Barbacena-MG no momento da aplicação das ondas de choque



Fonte: arquivo pessoal do autor.

### 3.2 Amostragem

O tamanho da amostra foi estimado utilizando-se intervalo de confiança de 5% e poder de 80%. Assumindo-se que nenhuma amostra controle apresente alguma variável e que 50% das amostras teste apresentem, seria necessária a amostra de oito animais no teste exato de Fischer. Uma amostra constituída por 12 animais (12 membros-teste direitos e 12 membros-controle esquerdos) foi escolhida para que, mesmo que não fosse viável avaliação de 1/3 das amostras, o tamanho amostral mínimo fosse respeitado (APÊNDICE B).

### 3.3 Métodos

Foram avaliados 12 ratos brancos machos da raça *Wistar*, fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, com média de oito semanas de idade e 173 gramas de peso. Os animais foram mantidos sob condições estáveis de temperatura em estante ventilada a 22°C em ciclos claro/escuro de 12 horas controlados, com livre acesso à água e à alimentação *ad libitum*.

### **3.4 Aplicação das ondas de choque radiais**

Os animais foram previamente pesados e anestesiados com o uso de cetamina na dose de 75 mg/Kg para efeito dissociativo, hipnótico e analgésico, que produz a dissociação com córtex cerebral e o animal fica em estado de analgesia profunda sem perda dos reflexos protetores. Foi associado o uso da xilazina 10 mg/Kg para efeito sedativo, analgésico visceral e relaxante muscular, potencializando o efeito da cetamina e administrados por via intraperitoneal.

Em seguida foi aplicado gel de contato à base de água (meio de condução da onda de som) no membro inferior direito e realizado estímulo de 2.000 pulsos a 4,0 bar de pressão de saída de ar e frequência de 20 Hz no quadríceps pelo aparelho *Swiss Dolorclast Smart*<sup>®</sup> 20 com a pistola *Evo Blue*<sup>®</sup>.





Fabricado na Suíça pela *Electro Medical System* (EMS) é um sistema de ondas de choque radiais indicado para o tratamento do musculoesquelético. Referência do produto FT-226. Classificação 93/42 CEE: Classe II b. Tecnologia – radial ESWT pneumática com compressor externo. Gama de frequência 4/ 8/ 12/ 20 Hz. Faixa de pressão de ar 1,5 – 4 bar. Gama de impulsos 500 – 2500. Peça manual EVOBLUE® para uma densidade de energia constante.

Fonte: arquivo pessoal do autor.

Após o procedimento os ratos foram acondicionados em gaiolas coletivas para três animais.

A segunda aplicação foi realizada com o mesmo critério após sete dias e a terceira após 14 dias, respectivamente. Passado o efeito da anestesia os animais foram observados por mais 30 minutos com ênfase no estado geral, comportamento e marcha e tal observação foi com frequência diária até o término do experimento.

### 3.5 Extração do tecido muscular

Decorrido cada tempo de seguimento preestabelecido (21 dias com três aplicações semanais – primeira na data inicial do experimento, a segunda sete dias após e a terceira 14 dias após a aplicação inicial; e com 21 dias foi o tempo total de seguimento) para seguir o protocolo do aparelho, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico via intraperitoneal com uso de tiopental sódico na dose de 45 mg/Kg.

Em seguida, foi retirada parte do quadríceps. Iniciou-se com tricotomia dos membros inferiores direito e esquerdo. Com o auxílio de bisturi e tesoura de Metzenbaum retirou-se a parte do músculo de objeto deste estudo, sendo colocada em solução de formaldeído a 10% em recipiente de plástico previamente identificado.

Figura 9 - Biópsia do quadríceps esquerdo



Observar área de tricotomia periférica à incisão longitudinal e a tonalidade mais clara da musculatura não submetida à aplicação de ondas de choque.

Fonte: arquivo pessoal do autor.

Figura 10 - Biópsia do quadríceps direito



Observar área de tricotomia periférica à incisão longitudinal e a tonalidade mais escura da musculatura submetida ao procedimento.

Fonte: arquivo pessoal do autor.

### **3.6 Análise histológica do tecido muscular**

Os tecidos a serem processados para estudo ao microscópio foram preparados de modo a preservar sua estrutura original o máximo possível. A fixação paralisa o metabolismo celular e preserva as estruturas do tecido para tratamentos posteriores. Nesse caso foi realizada fixação com formaldeído na concentração de 10%.

Para observação ao microscópio de luz, a espessura da secção do tecido presente em uma lâmina deve ser delgada o suficiente para que possa ser atravessada por um raio de luz. Para tal, os tecidos devem ser criteriosamente preparados para receber um meio endurecedor, ou seja, meio de inclusão. Neste estudo foi utilizada a parafina.

Após a fixação com soluções aquosas de formalina, os tecidos foram desidratados pela imersão em bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes. A inclusão em parafina foi precedida pelo uso de xilol.

Feita a remoção do álcool, o tecido passou por infiltração em parafina líquida e foi mantido em estufa a 56°C (ponto de fusão) e, posteriormente, transferido para o molde contendo parafina líquida.

Os blocos foram levados para a obtenção dos cortes de 5-7 nm de espessura em um micrótomo rotativo (Leica RM2135), que foram coletados em lâminas de vidro seguindo padrões previamente estabelecidos. Após a microtomia o tecido foi tratado com xilol novamente para remoção do excesso de parafina e reidratado, para então ser submetido à coloração, a qual foi realizada com uso de hematoxilina e eosina e corante de Gomori ou reservadas para reações citoquímicas.

A coloração com HE é a principal técnica de coloração de tecidos em histologia. Por meio dessa técnica podem-se diferenciar partes basófilas (pela hematoxilina) e acidófilas ou eosinófilas (pela eosina). A hematoxilina é um composto orgânico que se obtém da planta leguminosa *Haematoxylum campechianum*. Ela tem atração por substâncias ácidas dos tecidos, como núcleos e o retículo endoplasmático rugoso e ácidos nucleicos. Já a eosina, sendo ácida, cora predominantemente o citoplasma, as fibras de colágeno.

O tricrômico de Gomori foi desenvolvido em 1950 por George Gomori e seu princípio é baseado na coloração de etapa única. Um corante de plasma (2R cromotrópico) e um corante de fibra do tecido conjuntivo (verde rápido) são combinados em uma solução de ácido fosfotúngstico no qual é adicionado ácido acético glacial. O ácido fosfotúngstico promove coloração vermelha dos músculos e citoplasma. Os íons são especificamente absorvidos pelo colágeno, e a coloração das fibras do tecido conjuntivo é então ligada a esse complexo, colorindo o colágeno de verde ou azul, dependendo da contracorante utilizada. É muito usado em exames microscópicos de mielina.

O protocolo da avaliação foi a observação em 10 campos diferentes de cada lâmina com objetivas de 10X para devida varredura, 40X para avaliação básica e contagem de células e 100X-óleo de imersão para confirmação do achado.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Barbacena, Minas Gerais, sob a coordenação do Professor Dr. Renato Santos Laboissière, e no Laboratório de Angiogênese de Instituto de Ciências e Biologia da Universidade Federal de Minas Gerais, com o apoio da Professora Dr<sup>a</sup>. Silvia Passos Andrade; e revisada pelo laboratório Tecnologia em Saúde Animal (TECSA) com sede em Belo Horizonte, onde a leitura foi feita por dois patologistas distintos em sistema duplo-cego com concordância diagnóstica em todas as lâminas.

### **3.7 Descarte de carcaça**

Os animais após a eutanásia e coleta de material foram armazenados congelados para uso em outras demandas que se fizerem necessárias, visando à sua máxima utilização em atenção às boas práticas.

## 4 RESULTADOS

A média de idade dos ratos estudados foi de oito semanas, com peso e comprimento médio de 172 gramas e 17 centímetros, respectivamente, conforme verificado na TAB. 1.

Tabela 1 - Medidas gerais da avaliação inicial de ratos *Wistar* submetidos às ondas de choque no Biotério da Faculdade de Medicina de Barbacena, Minas Gerais

<b>Animal</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Comprimento (cm)</b>
1	177	17
2	170	17
3	160	18
4	160	17
5	166	18
6	179	18
7	176	18
8	193	18,5
9	175	18
10	163	17,5
11	182	17
12	167	18
Média	172,3333333	17,6666667

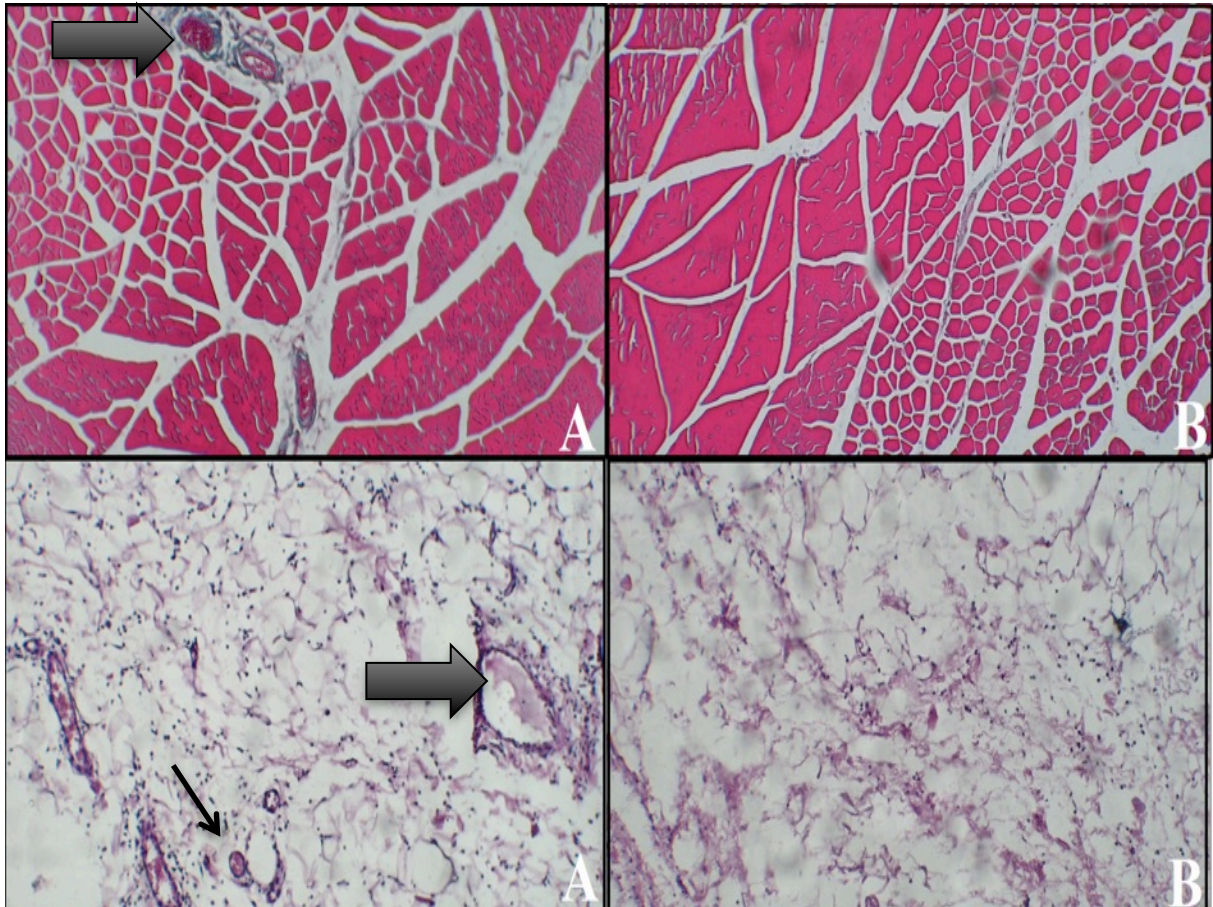
Durante as três sessões de terapia por onda de choque, o quadríceps direito apresentou hematoma, padrão semelhante em todos os animais estudados. Ressalta-se que, durante as replicações, não havia hematoma inicial em qualquer animal.

Durante os 21 dias de avaliação desde a primeira aplicação não foi identificada alteração do comportamento e do estado geral do animal, bem como alteração da marcha.



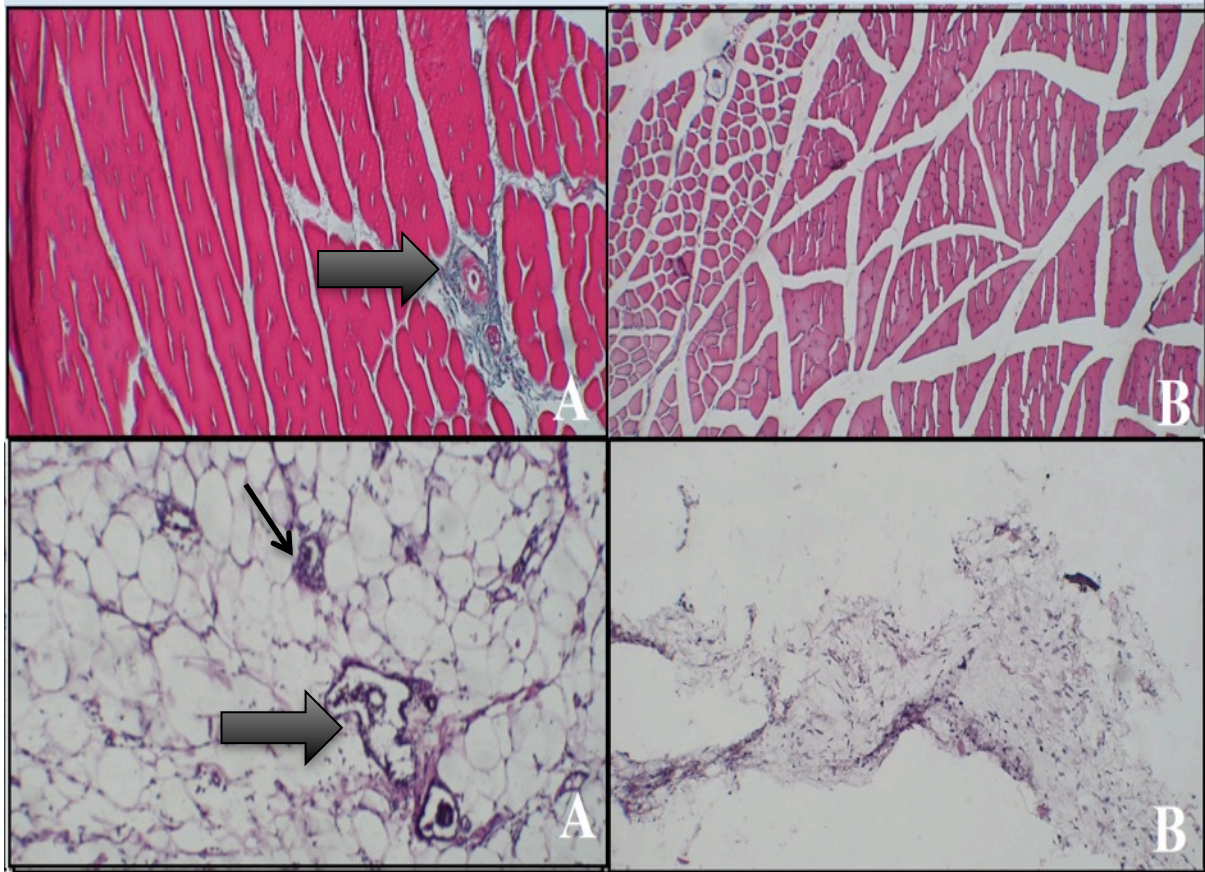
#### 4.1 Análise histológica

Figura 11 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda do animal 1, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho: demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.  
Fonte: arquivo pessoal do autor.

Figura 12 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 2, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B

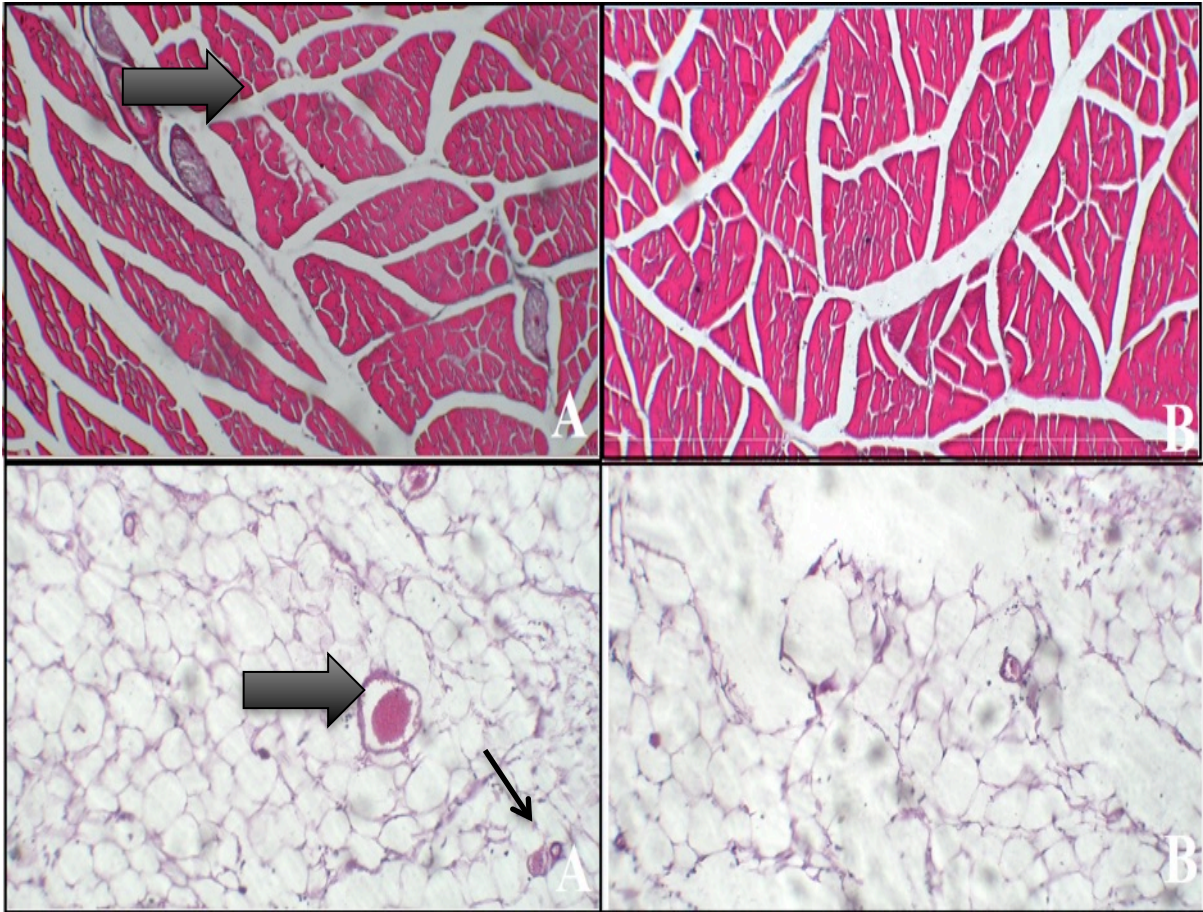


Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.

Fonte: arquivo pessoal do autor.

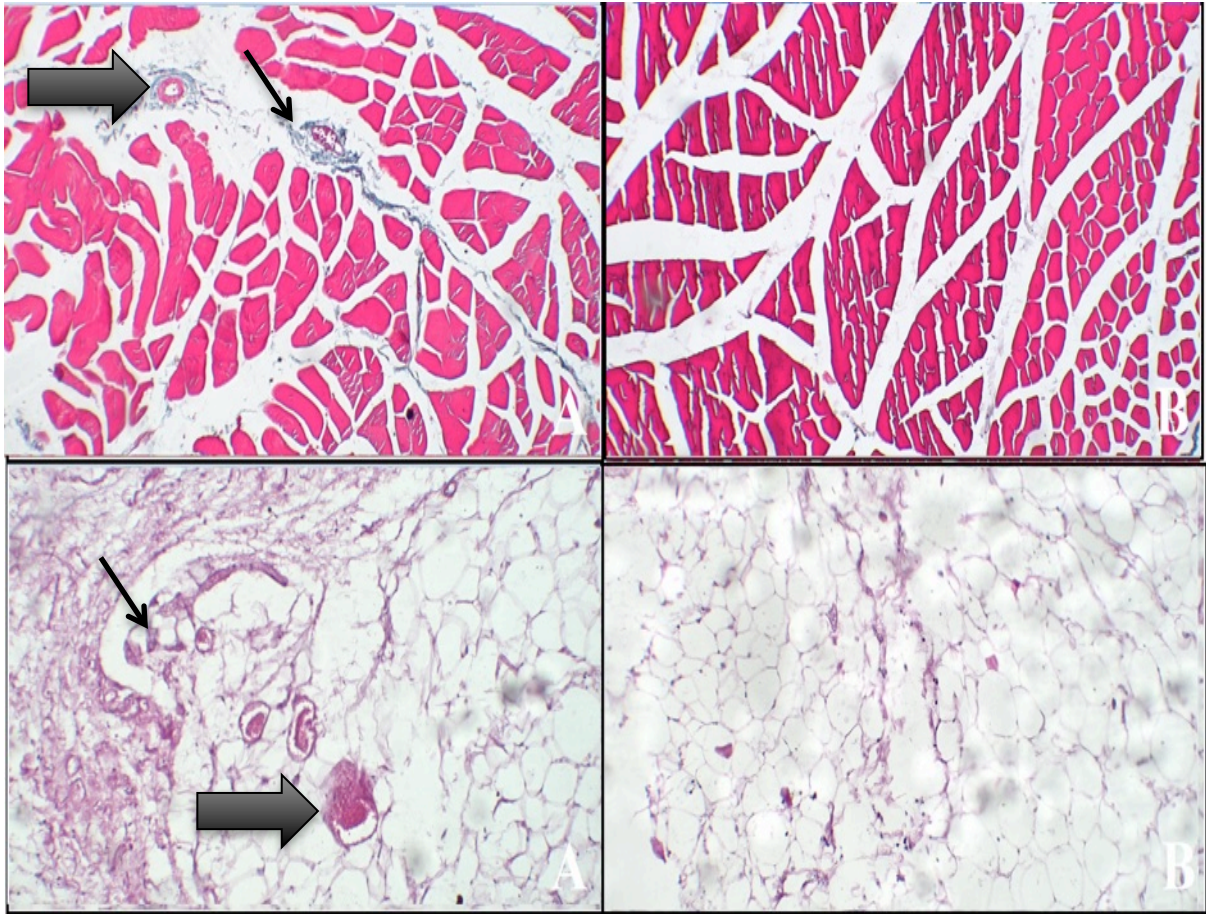


Figura 13 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 3, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.  
Fonte: arquivo pessoal do autor.

Figura 14 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 4, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B

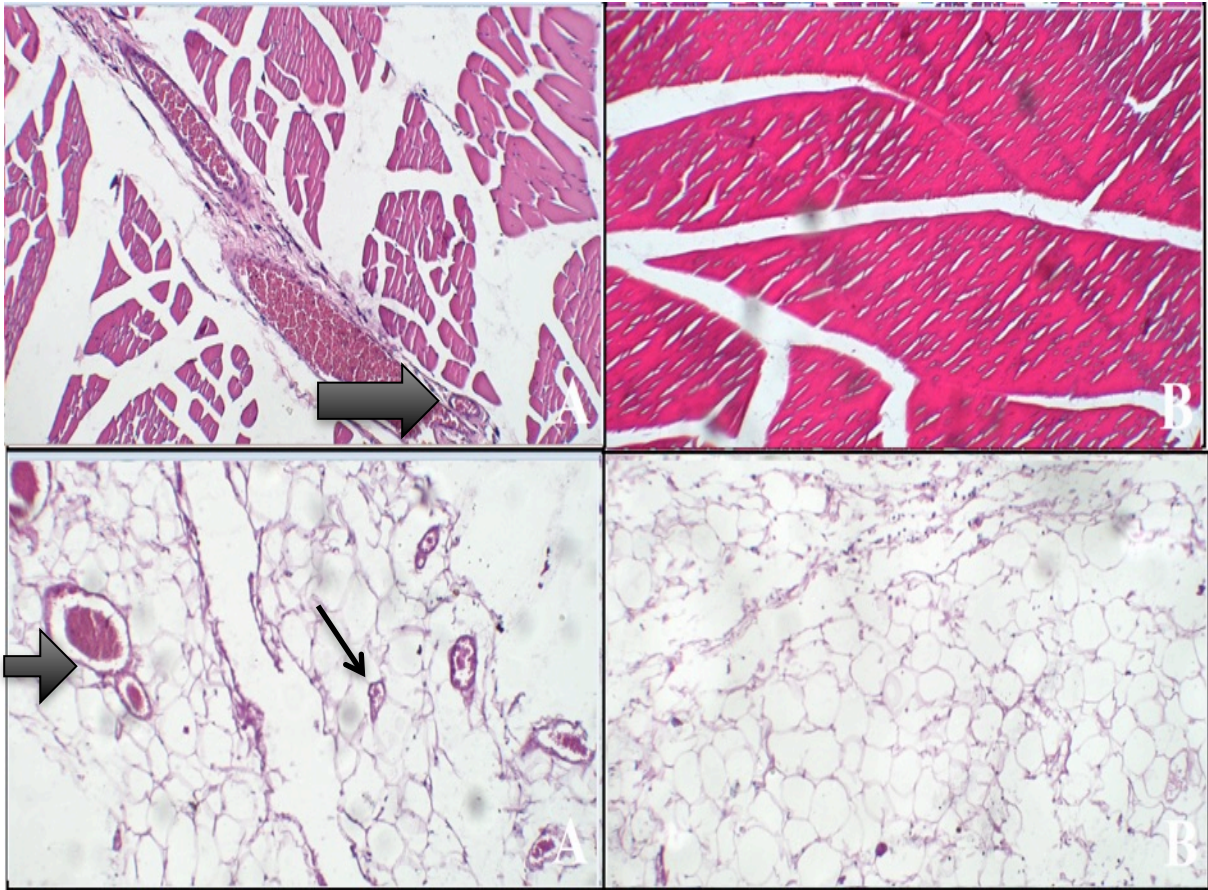


Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.

Fonte: arquivo pessoal do autor.

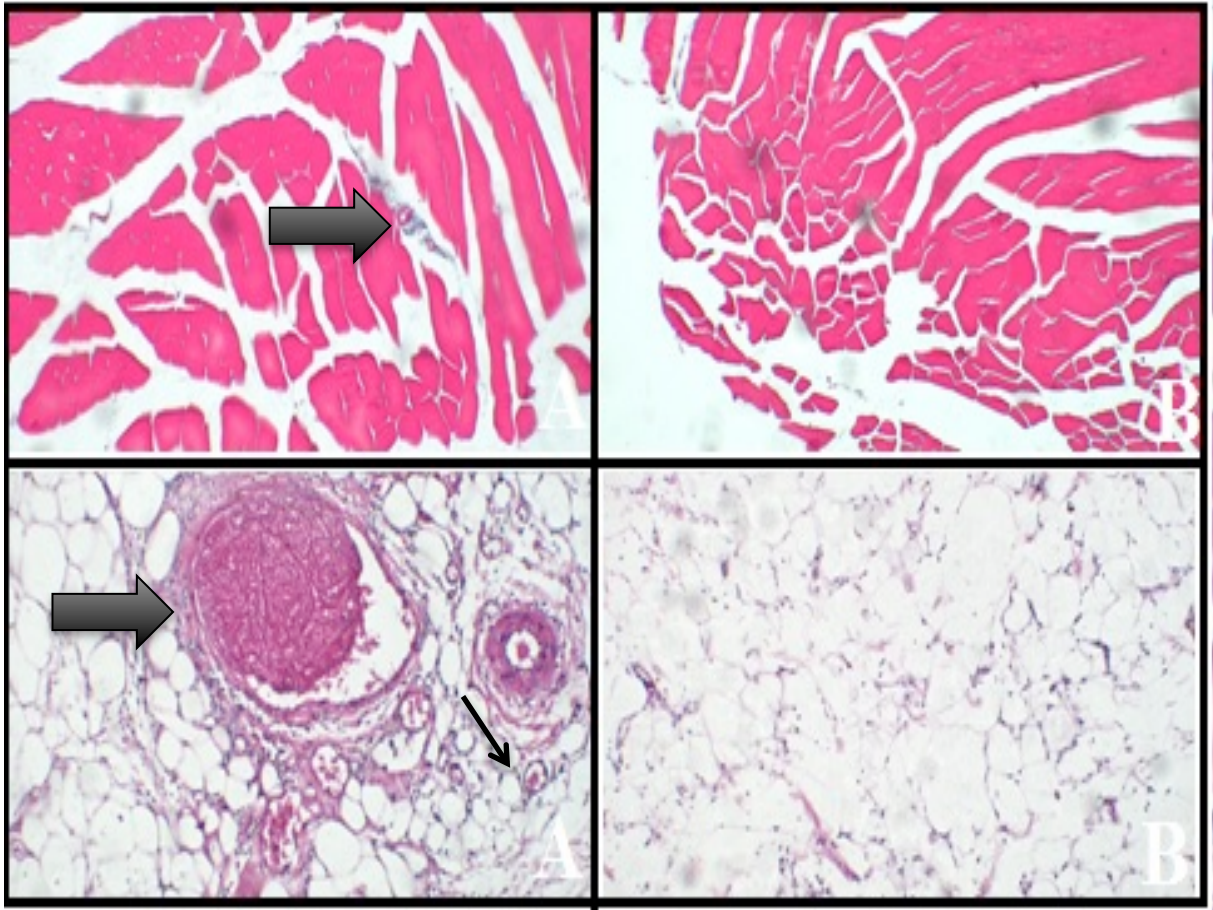


Figura 15 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 5, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.  
Fonte: arquivo pessoal do autor.

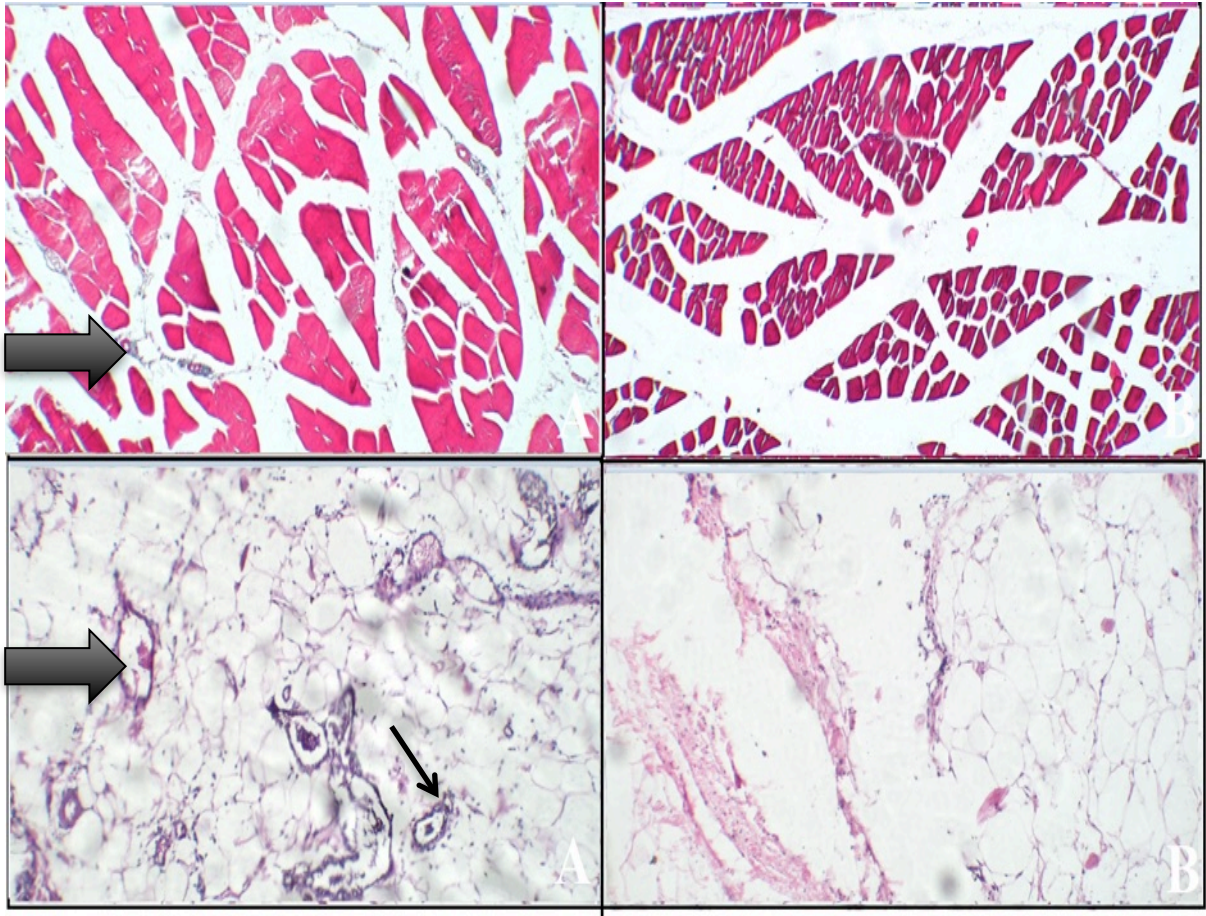
Figura 16 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 6, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.  
Fonte: arquivo pessoal do autor.



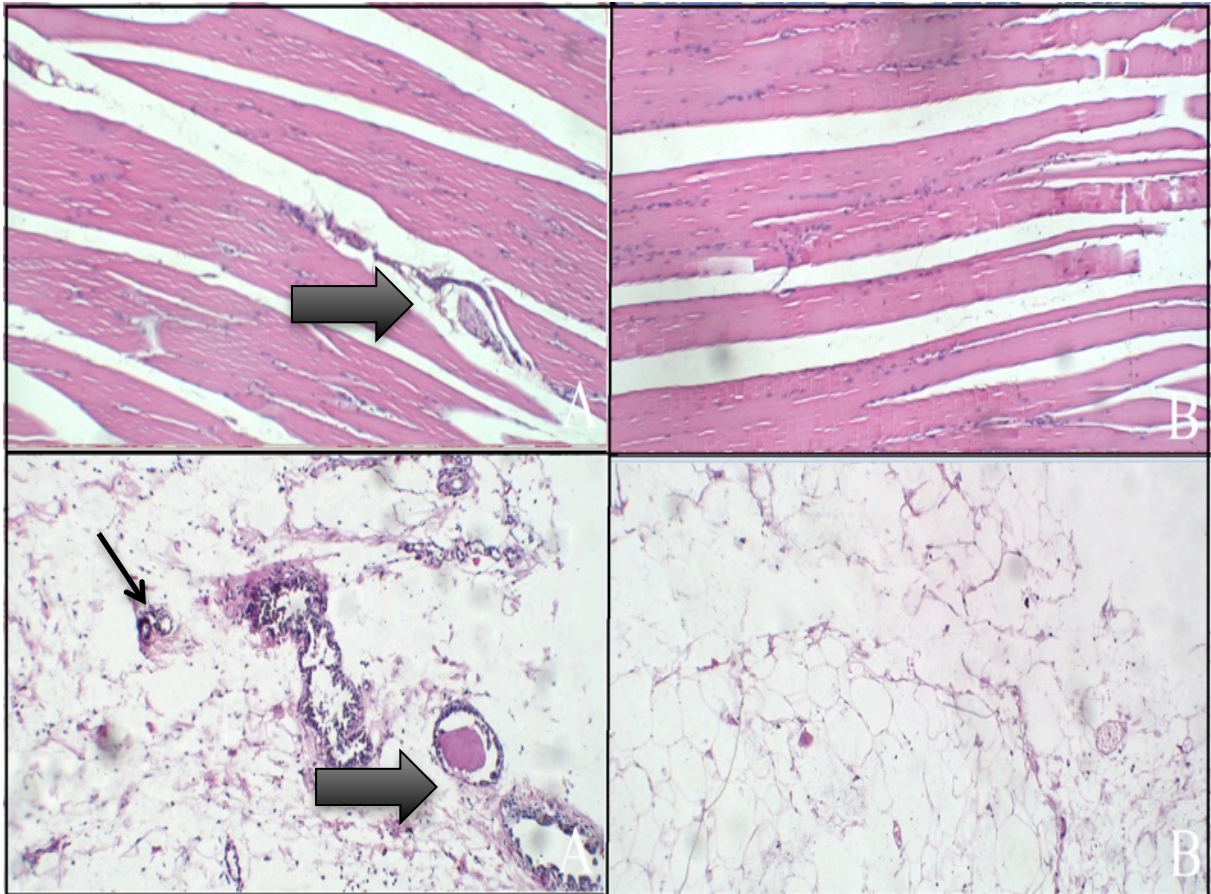
Figura 17 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 7, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.

Fonte: arquivo pessoal do autor.

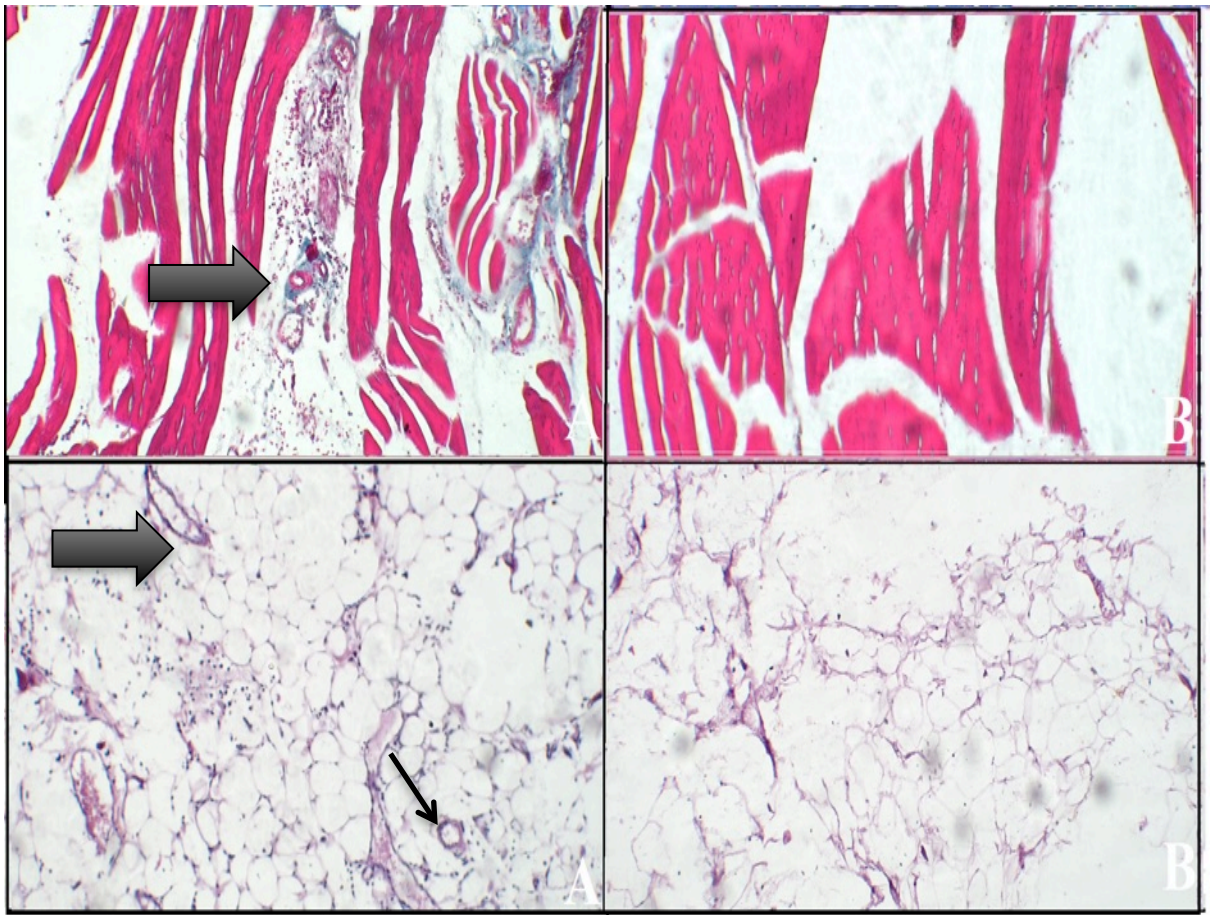
Figura 18 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 8, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.  
Fonte: arquivo pessoal do autor.

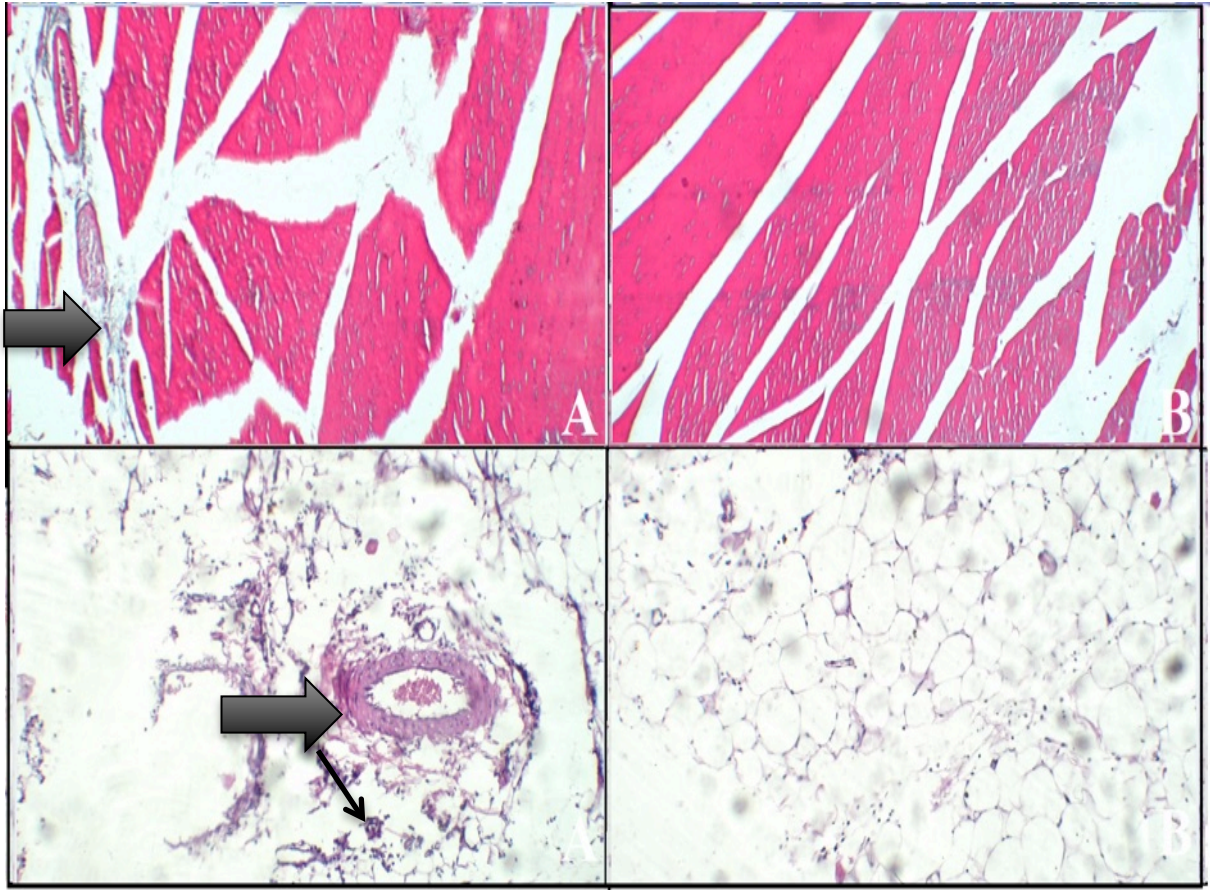


Figura 19 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 9, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.  
Fonte: arquivo pessoal do autor.

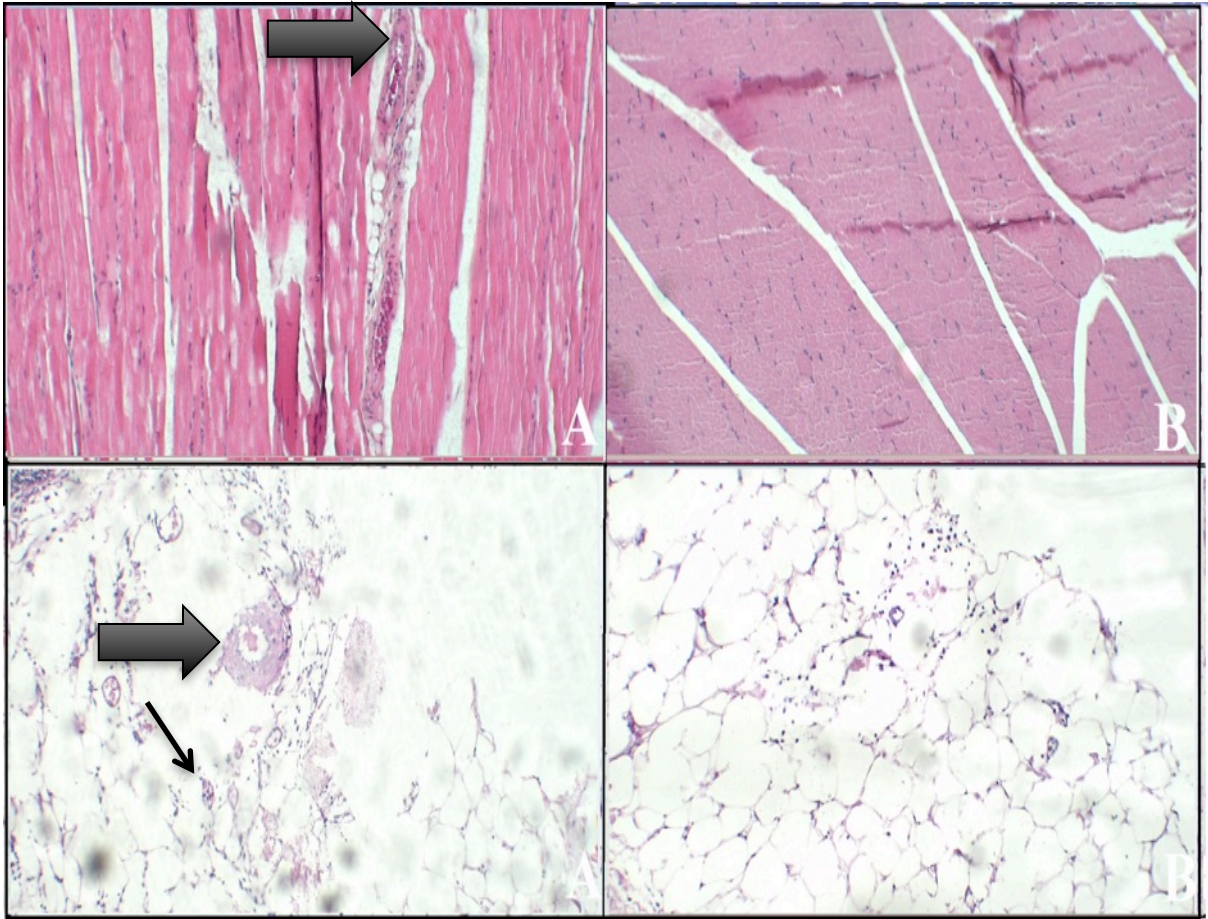
Figura 20 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 10, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.  
Fonte: arquivo pessoal do autor.



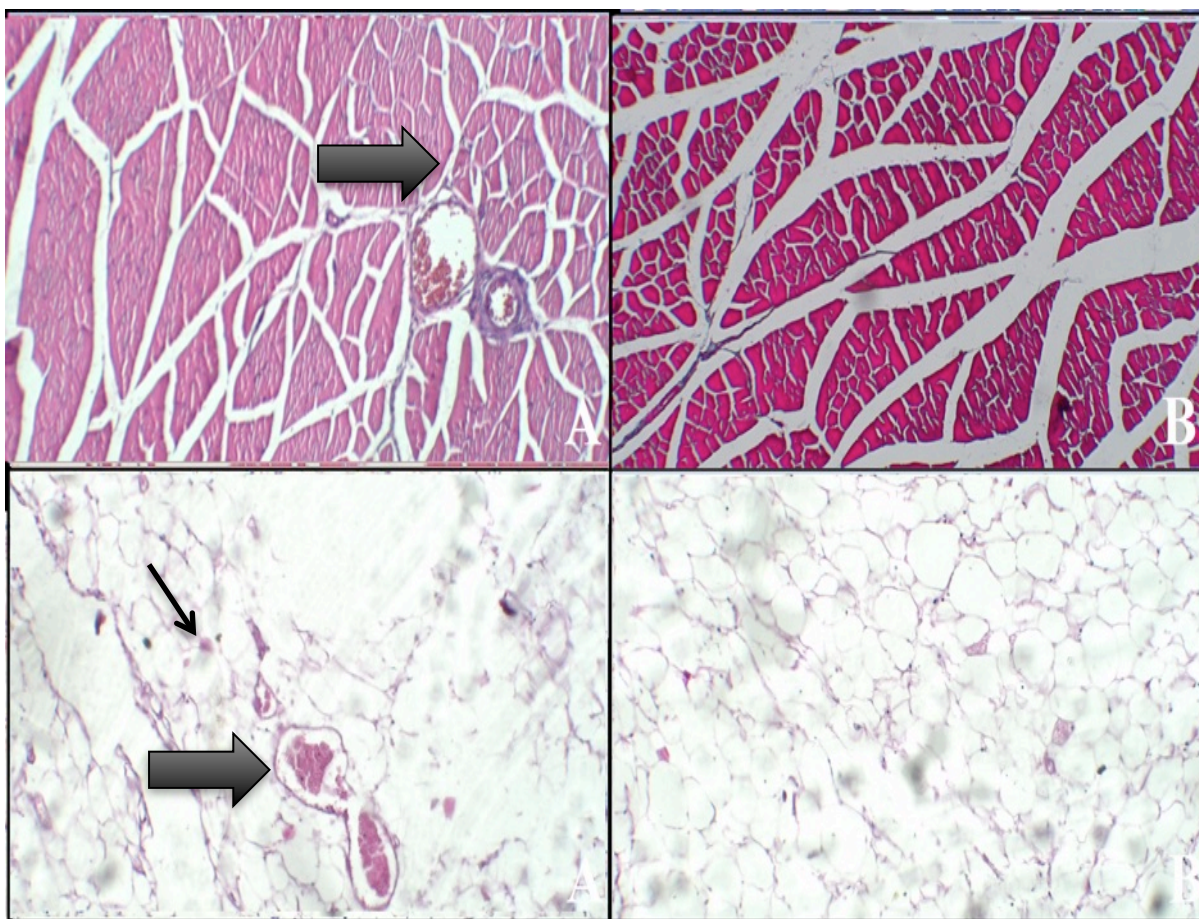
Figura 21 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 11, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.

Fonte: arquivo pessoal do autor.

Figura 22 - Comparação de achados histológicos da pata direita (A) e esquerda (B) do animal 12, evidenciando aumento do número de vasos em A em relação a B



Seta em vermelho demonstrando área de neovascularização no conjuntivo em HE (superior) e GOMORI (inferior) com a existência de vasos. Seta em preto: ilustrando célula satélite a qual se encontra no conjuntivo entre a lâmina basal e o sarcolema.  
Fonte: arquivo pessoal do autor.

Os resultados obtidos foram transcritos para a base de dados e projetados em planilha *Excel*.

Tabela 2 – Planilha Excel dos resultados .

Lado	Edema	Núcleo por fibra	Células satélites	Blastos	Vasos
D	S	5	8	0	5
e	N	3	3	0	2
d	S	6	9	1	6
e	N	5	4	0	2
d	S	5	7	2	7
e	N	3	3	0	5
d	S	3	5	0	5
e	N	3	6	0	4
d	S	4	2	0	6
e	N	4	2	0	4
d	S	4	3	0	4
e	N	3	3	0	3
d	S	4	5	0	7
e	N	3	4	0	1
d	S	4	5	0	6
e	N	4	4	0	2
d	S	5	4	1	3
e	N	3	2	0	2
d	S	2	5	0	6
e	N	2	3	0	1
d	S	3	6	0	7
e	N	3	2	0	3
d	S	5	5	0	6
e	N	2	2	0	2

Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o *software* R versão 3.5.2, a partir de métodos não paramétricos. Variáveis contínuas referentes a membros do mesmo animal foram comparadas utilizando-se o teste pareado de Wilcoxon (*signed-rank*). Variáveis discretas foram comparadas usando-se o teste exato de Fischer com correção mid-p. Foram utilizados gráficos *boxplot* para ilustrar a distribuição dos dados entre diferentes subgrupos. Variáveis contínuas foram descritas como mediana (intervalo interquartil) e variáveis binárias como número absoluto (%).

A análise histológica pelo HE demonstrou discreta proliferação fibrovascular com o aumento do número de fibras, de células satélites e vasos com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no lado direito em relação ao esquerdo, sem diferença considerável do número de blastos e com o mesmo edema intersticial, integridade das fibras musculares e ausência de malignidade em ambos os lados.

A análise histológica pelo protocolo de Gomori é realizada para observação dos componentes da matriz extracelular como o colágeno. As lâminas do grupo A

coradas com tricômomo demonstraram aumento da quantidade de fibras colágenas na região perivascular em comparação à quantidade de fibras do grupo B.

Tabela 3 - Comparação dos resultados obtidos no estudo das patas direitos (teste) e patas esquerdas (controle)

	Controle	Teste	Valor P
Núcleos por fibra	3 [ 3 - 3,25]	4 [3,75 - 5]	<b>0,0206</b>
Células satélites	3 [ 2 - 4 ]	5 [ 4,75 - 6,25]	<b>0,0105</b>
Blastos	0 (0%)	3 (25%)	0,1087
Vasos	2 [2 - 3,25]	6 [5 - 6,25 ]	<b>0,0024</b>

Foi admitida diferença estatística quando  $p < 0,05$ .

Gráfico 1 - *Boxplot* comparando as variáveis estudadas em patas direitas (teste) e esquerdas (controle)

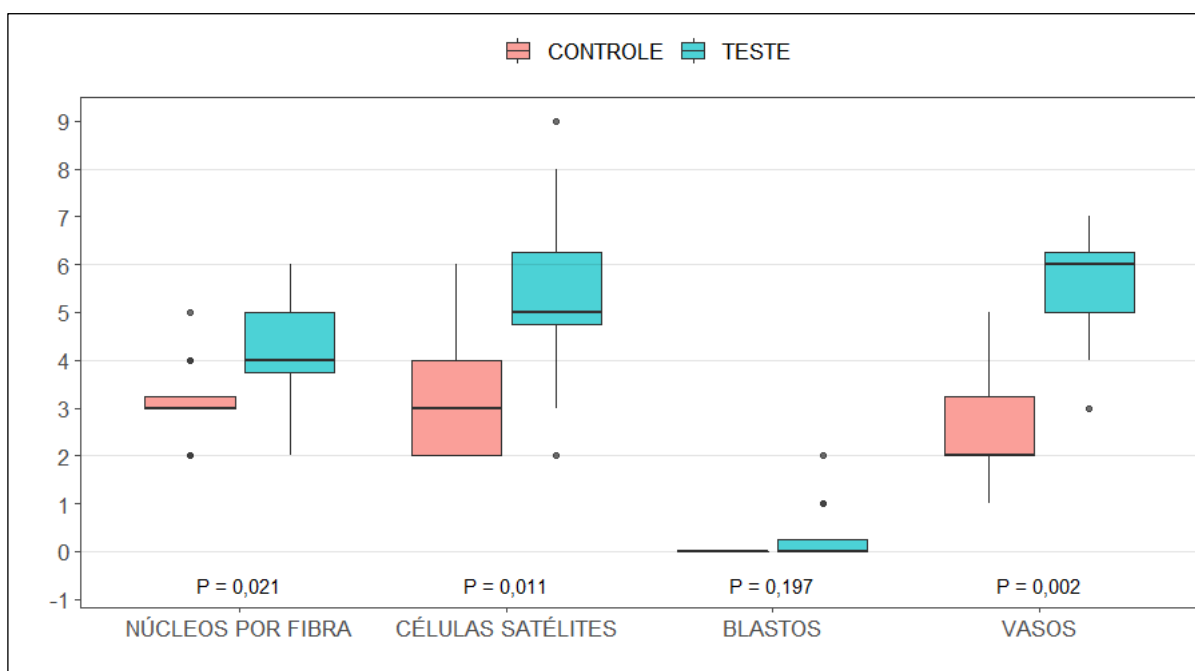


Diagrama de caixa ou de extremos e quartis: valores atípicos ou *outliers* (valores discrepantes) foram plotados como pontos individuais. Caixa rosa – controle. Caixa azul – teste. Mediana demonstrada por uma linha dentro de cada caixa.

Fonte: do autor.



## 5 DISCUSSÃO

Este estudo buscou avaliar os efeitos das ondas de choque quando aplicadas na musculatura íntegra do quadríceps de ratos Wistar e verificar a ocorrência de angiogênese em tecido muscular saudável.

A angiogênese consiste em um processo complexo em que há formação de novos vasos a partir de vasos preexistentes. Após um estímulo inicial, as células endoteliais separam-se das vizinhas bem como das de suporte perivascular, começando a proliferar e a migrar. Organizam-se posteriormente em cordões que subsequentemente adquirem lúmen, dando, assim, origem a novos vasos (BRANDÃO; COSTA; MANSILHA, 2012).

Essa formação ocorre em condições fisiológicas como ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo, embriogênese, crescimento tecidual, desenvolvimento mamário na lactação, resposta imune, adaptação à hipóxia tecidual, inflamação e cicatrização (GUYTON; ALL, 2011).

A neoformação vascular na musculatura íntegra pode ser encontrada em diferentes protocolos de treinamentos físicos específicos, uma vez que promove o aumento do fluxo sanguíneo, gerando adaptações benéficas relacionadas à produção de VEGF e eNOS (BLOOR, 2005; HOIER; HELLSTEN, 2014)

O uso das ondas de choque em Medicina ocorreu há mais de 50 anos e sua capacidade angiogênica já foi descrita em diversos artigos de diferentes indicações de reparo tecidual pelo método (KERTZMAN *et al.*, 2014). O presente estudo demonstra esse mesmo achado na musculatura íntegra dos quadríceps de ratos *Wistar*, semelhante aos achados de Notarnicola *et al.* (2018), que evidenciaram os efeitos das OCs na musculatura de atletas saudáveis. Nesse estudo os atletas foram recrutados e randomizados em dois grupos. Foram realizadas três aplicações com intervalo semanal, sendo um grupo de ondas de choque e outro com placebo. Foi realizado monitoramento desses grupos no momento do recrutamento, 15 dias após e 30 dias após. Foi feita avaliação miométrica e eletroneuromiográfica e os resultados mostraram significativo aumento nos atletas tratados com ondas de choque na elasticidade e tônus muscular. A interpretação desses achados representa o efeito biológico – aumento do fluxo sanguíneo, oxigenação, ativação do processo metabólico e efeito proliferativo. Os achados podem justificar a utilidade

das ondas de choque para reduzir a fadiga muscular e melhorar o desempenho durante a temporada esportiva.

Diante da relevância, Wang, Wang e Yang (2008) e Cheng e Wang (2015) demonstraram que as ondas de choque levam ao aumento dos marcadores angiogênicos e que o estímulo físico gerado transmite energia e pressão que perturbam a membrana celular e alteram seus potenciais, ativando proteínas da membrana e iniciando uma cascata de mitogênese, angiogênese e osteogênese. Descreveram o mecanismo biológico das OCs no osso e deram ênfase à neovascularização tecidual em diferentes condições após emprego das ondas com uso de imuno-histoquímica. Essa propriedade angiogênica foi ressaltada na presente pesquisa na musculatura íntegra do quadríceps de ratos *Wistar* com uso da histoquímica, que de acordo com Pazzini *et al.* (2017) é um método eficaz para avaliação semiquantitativa da angiogênese. Esse estudo analisou os métodos histoquímicos por meio das colorações e imuno-histoquímicos com marcadores de angiogênese e demonstrou a dificuldade da padronização deste último.

Silva *et al.* (2009) comprovaram, em estudo com ratos *Wistar*, que existe correlação positiva entre exercício aeróbico de natação e exercício exaustivo e angiogênese. Essa propriedade foi confirmada com análise histológica dos músculos sóleo e reto femoral.

No presente estudo não foi usada imuno-histoquímica, devido a problemas técnicos durante sua execução, e a demonstração de angiogênese foi feita pela avaliação histológica comparativa com coloração com HE e protocolo de Gomori. Esta análise comparativa foi realizada com observação em 10 campos na microscopia ótica com objetiva de 10X, 40X e de 100X com o auxílio do óleo de imersão. Foi acusado aumento do número de fibras, de células satélites e vasos com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ) no lado submetido à aplicação das ondas de choque em relação ao controle.

A presente pesquisa foi realizada em ratos devido ao seu tamanho, pela facilidade de acondicionamento em lugares menores, custo baixo de aquisição e manutenção, além de se adaptarem rapidamente a novos ambientes. No entanto, a escolha dos ratos é justificada principalmente pelo fato de que boa parte da literatura sobre o assunto também os utiliza (FARIA, 2015).

Com o objetivo de avaliar o processo de angiogênese na musculatura íntegra do quadríceps de ratos *Wistar* mediante estímulos mecânicos, foi utilizado neste

estudo um aparelho de ondas de choques radiais, ou seja, do tipo eletropneumático (KERTZMAN *et al.*, 2014) modelo *Swiss Dolorclast Smart*<sup>®</sup> 20 com a pistola *Evo Blue*<sup>®</sup>, devido à facilidade no manuseio, transporte, baixo ruído no momento da geração das ondas e reduzido custo da aplicação. Apesar de haver ainda controvérsia quanto aos aspectos de geração das ondas de choque, os dados encontrados na literatura indicam que podem ser usados geradores hidráulicos, magnéticos, piezoelétricos e pneumáticos. Existem divergências entre os autores: alguns preferem os hidráulicos, outros os magnéticos ou pneumáticos (KERTZMAN *et al.*, 2014). Quanto ao mecanismo de ação nos tecidos, existe concordância com o fundamento de que uma ação mecânica induz uma ação biológica – mecanotransdução (JAALOUK; LAMMERDING, 2009). Essa atividade altera a permeabilidade celular e promove o aumento da concentração de fatores de regeneração tecidual e de crescimento vascular (KOBAYASHI, 2018).

A equipe envolvida na aplicação de ondas de choque e no procedimento cirúrgico foi treinada e executada de forma padronizada seguindo princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP, 2005). A realização de três sessões foi baseada no protocolo do aparelho para uso em tecidos musculotendíneo (ANEXO B) e no estudo de Kisch *et al.* (2016), que obtiveram maior fluxo sanguíneo em aplicações repetitivas.

Nesse experimento houve demonstração da capacidade de angiogênese das ondas de choque do tipo eletropneumática na musculatura íntegra do quadríceps de ratos *Wistar*, o que é compatível com o estudo de Notarnicola *et al.* (2018). O presente estudo revelou proliferação fibrovascular com significância estatística nos membros submetidos a OCs radiais na avaliação feita pela microscopia óptica corada pela hematoxilina e eosina e protocolo de Gomori após três aplicações com intervalo semanal, seguindo as orientações do aparelho utilizado.

Vale a pena ressaltar e ratificar que os resultados podem apresentar algum viés, já que do ponto de vista metodológico foi testado apenas um modelo de equipamento radial, e que futuros trabalhos se fazem necessários para a melhor compreensão do efeito na musculatura íntegra estriada. Dessa forma, faz-se necessária a utilização de outras metodologias, entre elas a microscopia eletrônica e pesquisa de proteínas com VEGF, para aumentar a especificidade e sensibilidade da mensuração do grau de formação vascular.

## 6 CONCLUSÃO

O estímulo mecânico gerado pelas ondas de choque radiais promoveu aumento do número de fibras, de células satélites e vasos com significância estatística comparado com o lado não aplicado, o que conferiu capacidade angiogênica ao método na musculatura íntegra do quadríceps dos ratos *Wistar*.

Os achados encontrados podem ratificar a utilidade das ondas de choque para reduzir a fadiga muscular e melhorar o desempenho durante a temporada esportiva.



## REFERÊNCIAS

- ABREU, P.; CARDOSO, J.H.L.; CECATTO, V. Adaptação do musculoesquelético ao exercício físico: considerações moleculares e energéticas. **Rev Bras Med Esporte**, v. 23, n. 1, p. 60-65, jan-fev,, 2017.
- ASSALY, R. *et al.* Extracorporeal shock waves therapy delivered by aries improves erectile dysfunction in spontaneously hypertensive rats through penile tissue remodeling and neovascularization. **Sex Med**, v. 7, n. 4, p. 441-450, Dec. 2019. Doi: 10.1016/j.esxm.2019.08.006. Epub 2019 Sep 21.
- BLOOR, C.M. Angiogenesis during exercise and training. **Angiogenesis**, v. 8, n. 3, p. 263-71, 2005. Epub 2005 Nov 19. Review. PMID: 16328159.
- BRANDÃO, D.; COSTA, C.; MANSILHA, A. Angiogênese e arteriogênese na doença arterial periférica. **Angiol Circ Vasc**, v. 8, n. 2, p. 53-59, 2012.
- CHENG, J.H.; WANG, C.J. Biological mechanism of shockwave in bone. **Int J Surg**, 2015. PMID 26118613. Doi:10.1016/j.ijsu.2015.06.059.
- CHRIST, C. *et al.* Improvement in skin elasticity in the treatment of cellulite and connective tissue weakness by means of extracorporeal pulse activation therapy (PDF). **Aesth Surg J**, v. 28, n. 5, p. 538-544, 2008. ISSN 1090-820X. doi:10.1016/j.asj.200.
- CHUNG, B.; WILEY, J.P. Extracorporeal shockwave therapy. **Sports Medicine**, v. 32, n. 13, p. 851-865, 2002. ISSN 0112-1642. doi:10.2165/00007256-200232130-00004.
- CORMACK, D.H. *Ham histologia*, 9ª edição. Guanabara Koogan, 1991.
- FARIA, L.D. **Terapia por ondas de choque eletro hidráulicas aumenta a atividade de ERK-1/2 e Akt em tíbias íntegras de ratos por 21 dias após estímulo inicial**. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, 2015.
- FERREIRA, T.F. *et al.* Diabetes melito: hiperglicemia crônicas e suas complicações. **Arq Bras Ciênc Saúde**, v. 55, n. 3, p. 182-188, 2011.
- GLEITZ, M. **Myofascial syndromes & trigger points**. Heilbronn: Level 10, 2011.
- GUYTON, A.C.; ALL, J.E. **Tratado de Fisiologia médica**. 12. ed., 2ª tiragem. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- HAAS, T.L.; NWADOZI, E. Regulation of skeletal muscle capillary growth in exercise and disease. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 40, n. 12, p. 1221-32, Desc. 2015. Doi: 10.1139/apnm-2015-0336. Epub 2015 Sep 11. Review.PMID:26554747.

HEINZLOHRER, T.N.; VASILEIOS, K.; MALLIAROPOULOS, N. Historical ESWT paradigms are overcome: A narrative review. Review article. **Biomed Res Int**, 2016, article ID 3850461, 7 pages.

HITCHMAN LH, T.J.P. *et al.* Extracorporeal shockwave therapy for diabetic foot ulcers: a systematic review and a meta-analysis. **Ann Vasc Surg**, v. 56, p. 330-339, 2019 Apr. Doi: 10.1016/j.avsg.2018.10.013. Epub 2018 Nov 26. PMID: 30496896.

HOIER, B.; HELLSTEN, Y. Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. **Microcirculation**, v. 21, n. 4, p. 301-14, May, 2014. Doi: 10.1111/micc.12117. Review. PMID:24450403.

JAALOUK, D.E.,; LAMMERDING, J. Mechanotransduction gone awry. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, p. 63-73, 2009.

JIN-YOUN, L. *et al.* Effects of extracorporeal shock wave therapy on spasticity in patients after brain injury: A Meta- analysis. **J Phys Ther Sci**, v. 26, p. 1641-1647, 2014.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido muscular. Cap. 13. *In*: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KERTZMAN, P. *et al.* Tratamento por ondas de choque nas doenças musculoesqueléticas e consolidação óssea: análise qualitativa da literatura - artigo de atualização. **Rev Bras Ortop**, v. 50, n. 1, p. 3-8, 2014. [depto.icb.ufmg.br/dmor/pad-morf/histologicabasica.htm](http://depto.icb.ufmg.br/dmor/pad-morf/histologicabasica.htm).

KISH T. *et al.* Repetitive shock wave therapy improves muscular microcirculation. **J Surg Res**, v. 201, n. 2, p. 440-5, Apr., 2016. Doi:10.1016.

KOBAYASHI, R. **Estudo prospectivo, comparativo, randomizado, duplamente coberto, controlado com placebo sobre a eficácia das ondas de choque no tratamento da síndrome dolorosa miofascial das regiões lombar e glútea**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2018.

LOHRER, H. *et al.* Historical ESWT paradigms are overcome: a narrative review. **Biomed Res Int**, p. 3850461, 2016.

LOUWERENS, J.K. *et al.* Evidence for minimally invasive therapies in the management of chronic calcific tendinopathy of the rotator cuff: a systematic review and meta-analysis. **J Should Elbow Surg**, v. 23, n. 8, p. 1240–9, 2014. 24774621. Doi: 0.1016/j.jse.2014.02.002.

MAFFULLI, I G.; HEMMINGS, S.; MAFFULLI, N. Assessment of the effectiveness of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for soft tissue injuries (ASSERT): An online database protocol. **Translat Med**, v. 10, p. 46–51, 2014. PMC 4140430. PMID 25147767.

MONTANARI, T. **Histologia texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3. ed., Porto Alegre: Autor, 2016, p. 102 -106.

NOTARNICOLA, A. *et al* Extracorporeal shockwave therapy on muscle tissue: the effects on healthy athletes. **J Biol Reg Homeost Agents**, v. 32, n. 1, p. 185-193, Jan-Feb., 2018. PMID: 29504386.

OVALLE, W.K.; NAHIRNEY, P.C.; NETTER, F.H. **Tecidos musculares Netter bases da histologia**. 2. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

PAZZINI, J.M. *et al*. Histochemical and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesq Vet Bras**, v. 37, n. 12, p. 1519-1525, Dec., 2017. DOI: 10.1590/S0100-736X2017001200026.

R CORE TEAM, R. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2017.

SCHADEN, W. *et al*. Extracorporeal shockwave therapy (ESWT): First choice treatment of fracture non-unions? **Int J Surg**, 2015. PMID 26454164. Doi: 10.1016/j.ijsu.2015.10.003.

SILVA, E. *et al*. Angiogênese no musculoesquelético de ratos após exercício aeróbico de natação e exercício exaustivo. **Rev Digital**, ano 14, n. 136, set., 2009.

THIELE, S.; THIELE, R.; GERDESMEYER, L. Lateral epicondylitis: This is still a main indication for extracorporeal shockwave therapy. **Int J Surg**, 2015. PMID 26455532. Doi: 10.1016/j.ijsu.2015.09.034.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP, 2005.

VAHDATPOUR, B. *et al*. Efficacy of extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic pelvic pain syndrome: a randomized, controlled trial. **ISRN Urology**, 2013. 972601. PMC 3755541 . PMID 24000311. Doi:10.1155/2013/972601.

VALIATTI, F.B. *et al*. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, n. 2, p. 106-113, 2011.

WANG, C.J. *et al*. Long-term results of extracorporeal shockwave treatment for plantar fasciitis. **Am J Sports Med**, v. 34, n. 4, p. 592–6, 2006. PMID 16556754. Doi: 10.1177/0363546505281811.

WANG, C.J. Extracorporeal shockwave therapy in musculoskeletal disorders. **J Orthop Surg Res**, v. 7, n. 1, p. 2012. 11. ISSN 1749-799X. doi:10.1186/1749-799X-7-11.

WANG, C.J.; WANG, F.S.; YANG, K.D. Biological effects of extracorporeal shockwave in bone healing: a study in rabbits. **Arch Orthop Trauma Surg August**, v. 128, n. 8, p. 879-84, 2008. Doi: 10.1007 . PMID : 18560855.

ZUOZIENE, G. *et al.* Multimodality imaging of myocardial revascularization using cardiac shock wave therapy. **Int J Cardiol**, v. 187, p. 229–30, 2008. PMID 25838218. Doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.306.

<https://www.swissdolorclast.com> – último acesso em 25-09-2020.

## ANEXOS E APÊNDICES

### Anexo A - Protocolo de CEUA 01/2017 da FAME Barbacena



FUNDAÇÃO JOSÉ BONIFÁCIO LAFAYETTE DE ANDRADA - FUNJOBE  
 FACULDADE DE MEDICINA DE BARBACENA - FAME  
 Praça Presidente Antônio Carlos, 08 São Sebastião Barbacena – MG  
 CEP 36202-336 Telefone: 32 3339-2950

Barbacena, 06 de novembro de 2018.

### À coordenação do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF

Certificamos que o Protocolo n° **CEUA/01/2017** sobre “**Efeito do tratamento por ondas de choque extracorpóreas sobre a integridade do músculo quadríceps de ratos**”, sob a responsabilidade de **Rodrigo Santos Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animais (CONCEA) e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Barbacena – CEUA-FAME, em **07/12/2017**.

Sendo assim, solicitamos a compra dos animais conforme dados tabela abaixo:

Espécie:	Ratos <i>wistar</i>
Sexo:	Macho
Quantidade de animais por entrega:	12 animais
Total de animais:	12 animais
Idade:	07 semanas
Data da entrega:	20/11/2018
Nome ou razão social (GRU):	FUNDAÇÃO JOSÉ BONIFÁCIO LAFAYETTE DE ANDRADA – FUNJOBE
CNPJ:	195590120009-36
Endereço:	Praça Presidente Antônio Carlos, 08 – Bairro São Sebastião Barbacena – MG CEP 36202-336

Atenciosamente,

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Brandão Machado Carneiro  
 Coordenadora CEUA-FAME

## Anexo B - Protocolo de aplicação – *Swiss DolorClast* – Gerador *EVO-BLUE*

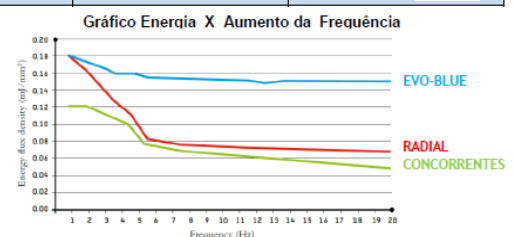
<b>SWISS DOLORCLAST® - PROTOCOLO RECOMENDÁVEL DE APLICAÇÃO COM GERADOR <i>EVO-BLUE</i></b>								
<b>PREPARAÇÃO:</b>			<b>PARÂMETROS E MÉTODO DE APLICAÇÃO</b>					
<p>a) <u>Partes Moles / Pts. de Gatilho</u>: Localizar a zona de mais dor por palpação em diálogo com o paciente e marcar o local;</p> <p>b) <u>Gel</u>: Sempre aplicar gel de contato no local da aplicação. O Gel não pode apresentar consistência muito aguada.</p> <p>Atenção: Verificar as contra-indicações no Manual do Usuário antes da aplicação</p> <p>Obs.: trabalhe no limite da dor do paciente</p>			<p>1. <u>Números de Ondas</u>: Em certas patologias há uma variação do número de impulsos que é decorrente ao tempo da lesão e avaliação médica.</p> <p>2. <u>Número de Aplicações</u>: mínimo 3 sessões, podendo fazer mais 2 sessões 30 – 60 dias se necessário</p> <p>3. <u>Intervalo</u>: 5 – 10 dias para partes moles; Pontos de Gatilho 2 – 3 dias sendo até 10 sessões;</p> <p>4. <u>Forma de Aplicar</u>: Aplicar os primeiros 500 impulsos em movimentos circulares do ponto de maior dor e o Gerador perpendicular a superfície. Inicialmente use a menor potência (bar) do protocolo;</p> <p>5. <u>Analgesia</u>: Após os 500 impulsos a analgesia deve fazer efeito. Circule mais próximo ou se possível manter o gerador em cima do ponto de maior dor e gradativamente aumentar a potência.</p>					
Patologia Primária	Posição do paciente	Localização	Nº de Ondas por Aplicação	Nº de Aplicações	Intervalo	Tipo de Aplicador	Frequência (Hz) / Potência (bar)	Força da Aplicação
FASCITES PLANTAR (c/ou sem esporão)	Posição supina, colocando um suporte por debaixo do tornozelo	Palpação ou Raio-X	2.000	3	Semanal	R 15 mm	6 – 10 Hz 2,0 – 4,0 bar	média / forte
EPICONDILITES Síndrome do cotovelo de tenista	Posição supina com o braço dobrado em 90°	Palpação	2.000	3	Semanal	R 15 mm	8 – 12 Hz 2,0 – 3,0 bar	suave
TEND. do OMBRO	Posição supina	Palpação	2.000	3	Semanal	R 15 mm F 15 mm	6 – 10 Hz 2,0 – 4,0 bar	média / forte
TEND. do AQUILES	Posição ventral, colocando um suporte por debaixo do tornozelo	Palpação	2.000	3	Semanal	R 15 mm	6 – 10 Hz 2,0 – 3,5 bar	suave / média
SÍND. da TÍBIA	Posição Supina	Palpação	2.000	3	Semanal	R 15 mm	6 – 10 Hz 2,0 – 3,5 bar	suave
OSGOOD-SCHLATER	Posição Supina	Palpação	2.000	3	Semanal	R 15 mm	6 – 10 Hz 2,0 – 4,0 bar	suave / média
BURSITES TROCANTERICA	Posição lateral	Palpação	2.000 – 2.500	3	Semanal	R 15 mm R 36 mm	6 – 10 Hz 2,0 – 4,0 bar 2,0 – 4,0 bar	média / forte
Tendão Proximal do ISQUIÁTICO – „Hamstring“	Posição supina; levantando a perna em 90°	Palpação	2.500	4	Semanal	R 15 mm	6 – 10 Hz 2,0 – 4,0 bar	média / forte

Obs.: Os parâmetros do protocolo podem ser alterados pelo médico conforme sua avaliação e experiência. O médico é responsável pela aplicação.

Rev. 1.2

Patologia Primária	Posição do paciente	Localização	Nº de Ondas por Aplicação	Nº de Aplicações	Intervalo	Tipo de Aplicador	Frequência (Hz) / Potência (bar)	Força da Aplicação
Úlceras de Pele	A ferida deve ficar exposta e cobrir com filme PVC	Visual	500 / 2 cm²	3 - 8	Semanal	R 36 mm	6 – 10 Hz 2,0 – 4,0 bar	Suave
Linfedema	Posição Supina ou Ventral	Visual	2.500 – 5.000	3 - 8	Semanal	R 36 mm	8 – 12 Hz 2,0 – 4,0 bar	suave
Pontos de Gatilho TRIGGER POINTS	Posição Supina ou Ventral	Palpação	500 p/ponto 1.000 na banda muscular	3 – 8	2 – 3x Semana	R 15 mm R 36 mm Trigger 15 mm	8 – 12 Hz 1,8 – 4,0 bar 2,0 – 4,0 bar 2,0 – 4,0 bar	suave - forte
LOMBALGIA	Posição Supina ou Ventral	Palpação	Total 1.500; inicial 200 p/ponto; depois 300	3 – 8	1 – 3x Semana	Planar 36mm	8 – 20 Hz 2,5 – 4,0 bar	suave - média
CERVICALGIA	Posição Supina	Palpação	Total 500; inicial 200 p/ponto; depois 300	3 – 8	1 – 3x Semana	Planar 36mm	8 – 20 Hz 2,0 – 4,0 bar	suave - média
Síndrome pseudo-radicular	Posição Supina ou Ventral	Palpação	300 – 500	3 – 8	1 – 3x Semana	R 15 mm R 36 mm Trigger 15 mm	8 – 20 Hz 2,0 – 4,0 bar 2,0 – 4,0 bar	suave - forte
DE QUERVAIN	Posição Supina	Palpação	Total 400; inicial 100 p/ponto; depois 100; e mais 200	3	Semanal	R 10 mm	16 – 18 Hz 2,0 – 3,5 bar	Suave
Doenças de PEYRONIE	Posição Supina	Visual	2.000	3	Semanal	R 15 mm	8 – 12 Hz 2,0 – 3,0 bar	suave

ENERGIA TRANSMITIDA, 4 BAR À 1 Hz <i>EVO-BLUE</i> mJ / mm² [EFD+]		
Bar	Aplicador R15mm	Aplicador F15mm “Focus”
2	0,10	0,12
3	0,14	0,18
3,5	0,16	0,22
4	0,18	0,28



Obs.: Os parâmetros do protocolo podem ser alterados pelo médico conforme sua avaliação e experiência. O médico é responsável pela aplicação.

Rev. 1.2

## Apêndice A - Trabalho em fase de pré-impressão em revista B1



Preprints are preliminary reports that have not undergone peer review.  
They should not be considered conclusive, used to inform clinical practice,  
or referenced by the media as validated information.

### *Analysis of the Histological Effect of the Shock Waves on the Integrated Musculature of the Quadriceps of Wistar Rats*

Rodrigo Santos Almeida

*School of Medicine of Federal University of Minas Gerais*

Raquel Ida Ferreira ( à [raquelferreiraida@yahoo.com](mailto:raquelferreiraida@yahoo.com) ) *University of Medicine of Barbacena - José Bonifácio Lafayette de Andrada Foundation* <https://orcid.org/0000-0003-1533-8971>

Ítalo Guilherme Giarola de Freitas Mariano

*University of Medicine Of Barbacena - José Bonifácio Lafayette de Andrada Foundation*

Newton Fonseca da Silveira

*Institute of Orthopedics and Traumatology of Barbacena*

Marco Antônio Percopo de Andrade

*School of Medicine of Federal University of Minas Gerais*

## Apêndice B - Fórmula do cálculo da amostragem

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{(N-1) \cdot e^2 + Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}$$

n - tamanho da amostra

N - tamanho do Universo

Z - é o desvio do valor médio para o nível de confiança

e - margem de erro

p - proporção desejada

Foi utilizado o *Software R* versão 3.5.2

log: C:\bases\TCC2\egresso\rodrigo\resul01.txt

log type: text

opened on: 6 Nov 2017, 17:46:26

.

.

.

. tabulate lado resultado, row col exact exp chi2

variable resultado not found

r(111);

.

. tabulate infiltrado lado, row col exact exp chi2

+-----+

| Key |

|-----|

| frequency |



| expected frequency |

| row percentage |

| column percentage |

+-----+

	lado		
infiltrado	d	e	Total
S	12	12	24
	12.0	12.0	24.0
	50.00	50.00	100.00
	100.00	100.00	100.00
Total	12	12	24
	12.0	12.0	24.0
	50.00	50.00	100.00
	100.00	100.00	100.00

.

. tabulate edema lado, row col exact exp chi2

+-----+

| Key |

|-----|

| frequency |

| expected frequency |

| row percentage |

| column percentage |

+-----+

	lado		Total
edema	d	e	
-----+-----+			
N	0	12	12
	6.0	6.0	12.0
	0.00	100.00	100.00
	0.00	100.00	50.00
-----+-----+			
S	12	0	12
	6.0	6.0	12.0
	100.00	0.00	100.00
	100.00	0.00	50.00
-----+-----+			
Total	12	12	24
	12.0	12.0	24.0
	50.00	50.00	100.00
	100.00	100.00	100.00

Pearson chi2(1) = 24.0000 Pr = 0.000

Fisher's exact = 0.000

1-sided Fisher's exact = 0.000

.

. tabulate prolif lado, row col exact exp chi2

+-----+

| Key |

|-----|

| frequency |

| expected frequency |

| row percentage |

| column percentage |

+-----+

	lado		
prolif	d	e	Total
N	2	12	14
	7.0	7.0	14.0
	14.29	85.71	100.00
	16.67	100.00	58.33
S	10	0	10
	5.0	5.0	10.0
	100.00	0.00	100.00

		83.33	0.00		41.67
-----+-----+-----					
Total		12	12		24
		12.0	12.0		24.0
		50.00	50.00		100.00
		100.00	100.00		100.00

Pearson chi2(1) = 17.1429 Pr = 0.000

Fisher's exact = 0.000

1-sided Fisher's exact = 0.000

. tabulate picnoticos lado, row col exact exp chi2

+-----+					
		Key			
-----					
		frequency			
		expected frequency			
		row percentage			
		column percentage			
+-----+					
		lado			
picnoticos		d	e		Total

```

-----+-----+-----
S |   12   12 |   24
  |  12.0 12.0 |  24.0
  |  50.00 50.00 | 100.00
  | 100.00 100.00 | 100.00

```

```

-----+-----+-----
Total |   12   12 |   24
      |  12.0 12.0 |  24.0
      |  50.00 50.00 | 100.00
      | 100.00 100.00 | 100.00

```

.

. tabulate maligno lado, row col exact exp chi2

```

+-----+
| Key      |
|-----|
| frequency |
| expected frequency |
| row percentage |
| column percentage |
+-----+

      |   lado
maligno |   d   e | Total

```

```
-----+-----+-----
N |    12    12 |    24
  |    12.0  12.0 |    24.0
  |    50.00 50.00 | 100.00
  |   100.00 100.00 | 100.00
```

```
-----+-----+-----
Total |    12    12 |    24
      |    12.0  12.0 |    24.0
      |    50.00 50.00 | 100.00
      |   100.00 100.00 | 100.00
```

.

.

.

. tabulate animal

```
animal |   Freq.   Percent   Cum.
-----+-----+-----
1 |     2     8.33     8.33
2 |     2     8.33    16.67
3 |     2     8.33    25.00
4 |     2     8.33    33.33
5 |     2     8.33    41.67
6 |     2     8.33    50.00
7 |     2     8.33    58.33
```

8	2	8.33	66.67
9	2	8.33	75.00
10	2	8.33	83.33
11	2	8.33	91.67
12	2	8.33	100.00

-----+-----

Total	24	100.00	
-------	----	--------	--

.

. tabulate lado

lado	Freq.	Percent	Cum.
------	-------	---------	------

-----+-----

d	12	50.00	50.00
---	----	-------	-------

e	12	50.00	100.00
---	----	-------	--------

-----+-----

Total	24	100.00	
-------	----	--------	--

.

. tabulate infiltrado

infiltrado	Freq.	Percent	Cum.
------------	-------	---------	------

-----+-----

S	24	100.00	100.00
---	----	--------	--------

-----+-----

Total	24	100.00	
-------	----	--------	--



. tabulate edema

edema	Freq.	Percent	Cum.
-----+-----			
N	12	50.00	50.00
S	12	50.00	100.00
-----+-----			
Total	24	100.00	

. tabulate prolif

prolif	Freq.	Percent	Cum.
-----+-----			
N	14	58.33	58.33
S	10	41.67	100.00
-----+-----			
Total	24	100.00	

. tabulate picnoticos

picnoticos	Freq.	Percent	Cum.
-----+-----			

S	24	100.00	100.00
---	----	--------	--------

-----+-----

Total	24	100.00	
-------	----	--------	--

.

. tabulate maligno

maligno	Freq.	Percent	Cum.
---------	-------	---------	------

-----+-----

N	24	100.00	100.00
---	----	--------	--------

-----+-----

Total	24	100.00	
-------	----	--------	--

.

.

.

. log close

log: C:\bases\TCC2\egresso\rodrigo\resul01.txt

log type: text

closed on: 6 May 2019, 17:46:26