

NATASCHA SAVERNINI LOPES

**EFICÁCIA ANTINOCICEPTIVA E ANTIEDEMATOGÊNICA DO
ULTRA-SOM TERAPÊUTICO (MODO PULSADO) NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA, EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional – Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Belo Horizonte
2006

NATASCHA SAVERNINI LOPES (ALUNA)
PROF^aDR^a MARIA SALETE DE ABREU CASTRO (ORIENTADORA)

**EFICÁCIA ANTINOCICEPTIVA E ANTIEDEMATOGÊNICA DO
ULTRA-SOM TERAPÊUTICO (MODO PULSADO) NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA, EM RATOS.**

Belo Horizonte
2006

***"Todo mundo é capaz de dominar
uma dor, exceto quem a sente."
(William Shakespeare - 1564-1616).***

AGRADECIMENTOS

Tenho muito que agradecer a Deus, e especialmente pelas pessoas maravilhosas que tenho o privilégio de conviver.

A professora Salete por ter sido uma querida amiga e Mestre que sempre esteve aberta a ouvir minhas dificuldades e me ajudar a superá-las. Com sua habitual paciência, carinho e firmeza, sempre nos ensinou muito além da Farmacologia. Querida Professora, obrigada pela convivência e pelo treinamento de “guerra”, você nos faz muita falta.

Ao professor Igor Dimitri Gama Duarte, do departamento de Farmacologia, professores Marcos Antônio Resende e Leani Máximo Pereira, do departamento de Fisioterapia da UFMG agradeço pela amizade e convívio que proporcionaram meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB-UFMG, Mauro Martins Teixeira e Danielle da Glória de Souza pelo apoio, incentivo e pela valiosa colaboração na análise das citocinas.

Aos funcionários do CEBIO/UFMG, Rinaldo e Jorge obrigada pelo carinho e ajuda durante todo o trabalho.

Ao Amor da Vida, Adebai que incentiva tudo que faço sempre presente em todos os momentos de minha vida. Você e nossa Anjinha da Guarda canina me sustentam com amor dando forças para superar quaisquer obstáculos. Vocês são meu porto seguro, amo vocês.

Aos meus pais Antônio e Sílvia, pelo exemplo de coragem e perseverança. Por todo amor e dedicação à nossa formação pessoal e profissional. Obrigada por compreender minha ausência, mas saiba que mesmo distante sinto a presença de vocês.

A toda minha família e aos meus irmãos: Antônio, pelo carinho de sempre. A minha Sister Querida Érika, mais que irmã é uma grande amiga e incentivadora. Ao Átila, nem tenho palavras para descrever o seu papel neste trabalho, só consigo dizer que é um privilégio conviver com você. Valeu Irmãos, amo vocês, não sei o que faria sem esta família.

A minha colega e amiga, Maria Teresa, que foi fundamental na execução deste trabalho. Pela amizade e paciência nas várias horas de experimentos que ficávamos longe de casa e da família, muito obrigada.

Agradecimentos especiais aos queridos colegas e amigos Vanessa, Beatriz, Cacildinha e professor Milton Malheiros pela motivação e estímulo, o apoio de vocês foi inestimável. Aos meus chefes Dr. Fábio Guerra e Michel Bertran, obrigada pelo apoio.

A todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

| | | |
|--------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 2 |
| 2 | OBJETIVO..... | 3 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 4 |
| 3.2. | Ultra-Som Terapêutico..... | 4 |
| 3.3. | Mecanismo de Ação do USt..... | 8 |
| 3.3.1. | Efeitos térmicos..... | 9 |
| 3.3.2. | Efeitos Não-térmicos..... | 10 |
| 3.4. | Resposta Inflamatória..... | 13 |
| 3.5. | Modelo de Hiperalgisia Térmica – Placa Quente..... | 16 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 4.2. | ANIMAIS UTILIZADOS..... | 20 |
| 4.3. | INDUÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA..... | 20 |
| 4.4. | MEDIDA DE HIPERALGESIA PELO MÉTODO DA PLACA QUENTE (PQ)..... | 21 |
| 4.4.1. | Informações gerais..... | 21 |
| 4.4.2. | Descrição do teste..... | 22 |
| 4.5. | MEDIDA PLETISMOMÉTRICA DO EDEMA DE PATA..... | 23 |
| 5.4.1. | Informações gerais..... | 23 |
| 5.4.2. | Descrição do teste..... | 24 |
| 4.6. | APLICAÇÃO DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO MODO PULSADO (USt)..... | 25 |
| 4.7. | PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS..... | 26 |
| 7.4.1. | Verificação da reprodutibilidade do valor do Tempo de Permanência em ausência de estímulo inflamatório..... | 26 |
| 7.4.2. | Escolha da dose de Carragenina (CG)..... | 27 |

| | | |
|----------|---|----|
| 7.4.3. | Verificação da influência de leituras prévias sobre a magnitude da hiperalgesia na 3ª hora pós-CG..... | 27 |
| 7.4.4. | Validação farmacológica do protocolo experimental..... | 28 |
| 4.7.4.1. | Drogas antiinflamatórias não esteroidais (Diclofenaco e Dipirona).... | 28 |
| 4.7.4.2. | Analgésicos opióides (Morfina)..... | 29 |
| 7.4.5. | Efeitos do Ultra-som (modo pulsado) sobre a resposta inflamatória aguda..... | 29 |
| 7.4.6. | Efeito do USt pulsado sobre o limiar de resposta de uma pata normal.. | 30 |
| 7.4.7. | Comparar a eficácia antinociceptiva e antiedematogênica do USt nos modos pulsado e contínuo..... | 31 |
| 7.4.8. | Influência da variação de alguns parâmetros da onda (frequência e intensidade) sobre os efeitos antinociceptivos e antiedematogênico do USt modo pulsado..... | 32 |
| 4.7.8.1. | Variação da frequência de repetição do pulso..... | 32 |
| 4.7.8.2. | Variação da Intensidade acústica da onda ultrasônica | 33 |
| 7.4.9. | Determinação do nível tecidual de citocinas após três aplicações de USt, em ratos, com resposta inflamatória induzida pela carragenina..... | 34 |
| 7.4.10. | Determinar a participação de opióides no efeito antinociceptivo promovido pela aplicação do USt pulsado na resposta inflamatória induzida pela carragenina..... | 35 |
| 5 | ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS..... | 36 |
| 6 | RESULTADOS..... | 37 |
| 6.2. | PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE MEDIDA..... | 37 |
| 2.6.1. | Verificação da reprodutibilidade do valor do tempo de permanência em ausência de estímulo inflamatório..... | 37 |
| 2.6.2. | Escolha da dose de Carragenina (CG)..... | 38 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.6.3. | Verificação da influência de leituras prévias sobre a magnitude da hiperalgesia na 3ª hora pós-CG..... | 39 |
| 2.6.4. | Validação farmacológica do protocolo experimental..... | 40 |
| 6.2.4.1. | Drogas antiinflamatórias não esteroidais (Diclofenaco e Dipirona).... | 40 |
| 6.2.4.2. | Analgésicos opióides (Morfina)..... | 41 |
| 2.6.5. | Efeitos do Ultra-som (modo pulsado) sobre a resposta inflamatória aguda..... | 42 |
| 2.6.6. | Efeito do USt pulsado sobre o limiar de resposta de uma pata normal..... | 46 |
| 2.6.7. | Comparar a eficácia antinociceptiva e antiedematogênica do USt nos modos pulsado e contínuo..... | 47 |
| 2.6.8. | Influência da variação de alguns parâmetros da onda (frequência e intensidade) sobre os efeitos antinociceptivos e antiedematogênico do USt modo pulsado..... | 50 |
| 6.2.8.1. | Variação da frequência de repetição do pulso..... | 50 |
| 6.2.8.2. | Variação da Intensidade acústica da onda ultrasônica..... | 53 |
| 2.6.9. | Determinação do nível tecidual de citocinas após três aplicações de USt, em ratos, com resposta inflamatória induzida pela carragenina..... | 56 |
| 2.6.10. | Determinar a participação de opióides endógenos no efeito antinociceptivo promovido pela aplicação do USt pulsado na resposta inflamatória induzida pela carragenina..... | 58 |
| 7 | DISCUSSÃO..... | 59 |
| 8 | CONCLUSÃO..... | 68 |
| 9 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |
| 10 | ANEXO..... | 84 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Adenil ciclase

AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina

ASC - Área sob a curva

CINC-1 - Fator neutrofílico
quimioatraente induzido por citocinas

CONT - Controle

COX - Ciclooxigenase

DAINEs - Drogas antiinflamatórias não-
esteroidais

E.P.M. - Erro padrão da média

ED - Edema

ERA - Área de emissão

FAP - Fibras aferentes primárias

GMPc - Monofostato cíclico de
Guanosina

i.pl. - Intraplantar

IL - Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo bacteriano

MHz - Megahertz

Min - Minutos

MORF - Morfina

NLX - Naloxona

NOS - Óxido Nítrico Sintase

Pg - Picograma

CAM-1 - Molécula de adesão vascular
intercelular-1

CG - Carragenina

CFA - Adjuvante Completo de Freund

PG - Prostaglandina

PGI - Prostaciclina

PK - Proteína quinase

PLA2 - Fosfolipase A2

PMN - Polimorfonucleares

PQ - Placa Quente

s - Segundos

SAL - Solução fisiológica estéril

SP - Substância P

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TXA2 - Tromboxana

US⁻ - Ultra-som desligado

US⁺ - Ultra-som ligado

US^c - Ultra-som modo contínuo

US^p - Ultra-som modo pulsado

US^t - Ultra-Som terapêutico

VCAM-1 - Molécula de adesão vascular
E-selectina

W/cm² - Watts por centímetro quadrado

μ g - Migro gramas

μ l - Micro litro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Injeção intra-plantar de Carragenina na pata posterior de rato.....21

Figura 2: Placa Quente “modificada”...23

Figura 3: Medida do volume da pata traseira de ratos, em hidropletismômetro.....24

Figura 4: Equipamento utilizado neste estudo: Ultra-som.....25

Figura 5: Protocolo geral dos experimentos.....26

Figura 6: Protocolo geral para o experimento: Drogas antiinflamatórias não-esteroidais (Diclofenaco e Dipirona).....28

Figura 7: Protocolo geral para o experimento: Analgésicos Opióides.....29

Figura 8: Protocolo geral dos experimentos: Efeito da aplicação do US modo pulsado sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda.....30

Figura 9: Protocolo para o experimento Efeito do USt pulsado sobre o limiar de resposta de uma pata normal.....31

Figura 10: Protocolo geral para o experimento de Comparação da eficácia do USt nos modos pulsado e contínuo.....32

Figura 11: Protocolo Geral para determinar o nível de citocinas tecidual após a aplicação do USt pulsado.....35

Figura 12: Protocolo Geral do experimento para determinar participação

de opióides no mecanismo da ação do USt pulsado.36

Figura 13: Medidas seqüenciais do Tempo de Permanência (s) na Placa Quente (PQ).....37

Figura 14: Influência da dose de CG sobre o Tempo de Permanência (s) na PQ.....38

Figura 15: Tempo de Permanência (s) na PQ, analisando a influência de múltiplas leituras sobre o desenvolvimento da hiperalgesia térmica.....39

Figura 16: Efeito do pré tratamento com DAINes sobre a hiperalgesia térmica...41

Figura 17 Efeito do pré-tratamento com um analgésico opióide sobre a hiperalgesia térmica e o edema.....42

Figura 18: Avaliação do efeito do USt modo pulsado sobre o desenvolvimento temporal da hiperalgesia térmica.....43

Figura 19: Avaliação do efeito do USt modo pulsado sobre o desenvolvimento temporal do edema.....44

Figura 20: Variações induzidas por três aplicações de USt modo pulsado sobre os valores da Área Sob a Curva (ASC) de desenvolvimento temporal da hiperalgesia térmica e do edema.....45

Figura 21: Efeito da aplicação do USt no modo pulsado sobre o Tempo de Permanência (s) na PQ a temperatura constante de 48° C, em patas normais.....46

Figura 22: Comparação do efeito do USt modo pulsado ou contínuo sobre a hiperalgesia térmica induzida.....**48**

Figura 23: Avaliação do efeito do USt modo contínuo sobre o edema.....**49**

Figura 24: Influência da frequência de repetição do pulso da onda ultrasônica sobre o efeito antinociceptivo.....**51**

Figura 25: Influência da alteração da frequência de repetição do pulso sobre o efeito antiedematogênico.....**52**

Figura 26: Influência da alteração da frequência de repetição do pulso determinado pela aplicação de US (modo pulsado) sobre os valores da Área sob a curva (ASC) de desenvolvimento temporal da hiperalgesia térmica e do edema.....**53**

Figura 27: Influência da intensidade acústica da onda ultrasônica sobre o efeito antinociceptivo.....**54**

Figura 28: Influência da intensidade acústica sobre o efeito sobre o efeito antiedematogênico.....**55**

Figura 29: Influência da alteração da intensidade acústica determinado pela aplicação de US (modo pulsado) sobre os valores da Área sob a curva (ASC) de desenvolvimento temporal da hiperalgesia térmica e do edema.....**56**

Figura 30: Determinação do efeito do USt pulsado sobre dos níveis tissulares das interleucinas TNF α e IL-10.....**57**

Figura 31: Determinação da participação de opióides endógenos no efeito antinociceptivo.....**58**

RESUMO

O ultra-som terapêutico (USt) é um dos muitos agentes eletrofísicos usados por Fisioterapeutas com objetivo de reduzir esta incapacidade funcional associada ao processo inflamatório. Na prática clínica o USt vem sendo frequentemente utilizado, promovendo alívio da dor e restabelecendo a mobilidade articular. No entanto, os benefícios percebidos na clínica com a aplicação deste recurso não possuem comprovação científica. Os achados da literatura são controversos a respeito da eficácia do USt sobre o tecido *in vivo*. Para resgatar uma importante ferramenta terapêutica o presente estudo teve como objetivo a verificação da eficácia terapêutica do USt modo pulsado em um quadro inflamatório agudo induzido pela injeção i.pl. de CG, em ratos.

Nossos resultados demonstram que a aplicação do USt pulsado promoveu um efeito de redução da hiperalgesia térmica avaliada pela Placa Quente-Modificada e a diminuição pletismométrica do volume da pata. Além disto, verificou-se a existência de um efeito hiponociceptivo tardio observado na 24^a hora, ou seja, 20 horas após a última aplicação.

Concluimos que o USt continua sendo uma importante recurso no tratamento de processos inflamatórios agudos, porém, seu efeito parece ser específico para determinadas condições. Mais pesquisas esclarecendo seu mecanismo de ação são necessárias para direcionar a utilização criteriosa.

ABSTRACT

Therapeutic ultrasound (TUS) has been used by Physical Therapists to reduce functional disability associated with the inflammatory process through pain relief and reestablishment of articular mobility. The present study aimed to assess the therapeutic efficacy of pulsed TUS in the experimental model of acute inflammation induced by intraplantar Carrageenan (i.pl) injection in rats.

Our results demonstrate that the application of pulsed TUS reduced the thermal hyperalgesia and the paw edema, characteristic of the model used. Furthermore, TUS application induced a late hyponociceptive effect, which reached maximum intensity 20 hours after the last application (24th h). Hyponociceptive effect was directly proportional to the repetition frequency and intensity of the ultrasonic wave.

We conclude that TUS is an important, efficient and safe method for the treatment of acute inflammatory process, although its effect seems to be specific for certain conditions. Further researches elucidating TUS mechanism of action are necessary to assist its judicious use.

1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório manifesta-se clinicamente por intermédio de cinco sinais clássicos, denominados de Sinais Cardinais, que são: tumor, calor, rubor, dor e perda da função. O tumor é causado pelo acúmulo de líquido no tecido intersticial. O calor é oriundo da fase vascular, em que se tem aumento da temperatura local decorrente da vasodilatação. O rubor ou eritema também é decorrente desse mesmo fenômeno. A dor, por sua vez, origina-se de mecanismos mais complexos que incluem a ação de mediadores inflamatórios sobre as terminações nervosas. A perda de função é decorrente do edema, da própria dor e da lesão tissular, dificultando as atividades e trazendo grande prejuízo funcional e sócio-econômico ao indivíduo.

O ultra-som terapêutico (USt) é um dos agentes eletrofísicos usados por Fisioterapeutas com objetivo de reduzir a incapacidade funcional associada ao processo inflamatório. Na prática clínica o USt vem sendo utilizado para promover alívio da dor em lesões intertegumentárias e restabelecer a mobilidade articular. No entanto, os benefícios percebidos na clínica com a aplicação deste recurso não possuem comprovação científica. Os achados da literatura são controversos a respeito da eficácia do USt sobre o tecido *in vivo*.

A dor é uma entidade sensorial múltipla que envolve aspectos emocionais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos. Ela invoca emoções e fantasias, muitas vezes incapacitantes, que traduzem o sofrimento, a incerteza, o medo da incapacidade, a preocupação com perdas materiais e sociais, dando a esta sensação um caráter individual, ou seja, cada indivíduo reage de maneira diferente à dor. Por sofrer estas influências individuais, não se pode traçar uma relação constante e previsível entre dor e lesão orgânica, apesar dessa relação parecer, geralmente, tão evidente. Há muitas situações onde a relação entre a intensidade da dor e a gravidade de uma lesão não existe, ou pode ocorrer a situação contrária em que a lesão ocorre sem dor ou a dor ocorre sem lesão identificável.

Apesar do grande interesse dos pesquisadores no conhecimento da dor, os estudos em humanos esbarram nas dificuldades para se controlar o fenômeno, pois em diversas situações clínicas, o fenômeno doloroso não é completamente controlado, uma vez que

muitos dos componentes não-nociceptivos, mas que afetam a percepção, como as limitações nas atividades profissionais, sociais e familiares, não são devidamente controladas. A sensação de dor não depende apenas de lesão orgânica e isto é um dos fatores que dificulta a pesquisa da dor em humanos. Assim, em diversas situações, a pesquisa experimental animal se faz necessária, pois neste modelo há um rigoroso controle do estímulo nociceptivo e da resposta avaliada.

2 OBJETIVO

O nosso objetivo principal será a verificação experimental da eficácia analgésica e antiedematogênica do tratamento com o USt em um quadro inflamatório agudo, através da avaliação das respostas induzidas pela injeção intraplantar de carragenina, em ratos.

Como objetivo secundário, pretendemos averiguar experimentalmente a influência da propagação do feixe da onda sonora contínua ou pulsada sobre o desenvolvimento da resposta nociceptiva e edematogênica na inflamação aguda.

Prosseguiremos verificando a influência dos parâmetros frequência de repetição e intensidade da onda sobre os efeitos determinados pelo USt.

Finalmente, iniciaremos os estudos sobre o mecanismo da ação antinociceptiva e antiedematogênica do USt, utilizando ferramentas farmacológicas e imunohistoquímicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.2. ULTRA-SOM TERAPÊUTICO

O Ultra-Som terapêutico (USt) é um agente eletrofísico amplamente usado por fisioterapeutas no tratamento das desordens musculoesqueléticas e intertegumentárias (TER HAAR e cols., 1987; GUIDE OF PHYSICAL THERAPY PRACTICE, 2001). O USt pode ser descrito como uma onda sonora ou de pressão com alta frequência, cuja propagação por um tecido está associada à transferência mecânica de energia para a região insonada (DOAN e cols., 1999).

Joseph Woo (2006) apresenta uma excelente revisão histórica sobre o início das aplicações clínicas do USt. Este autor reporta, por exemplo, que o interesse pelo emprego do USt na fisioterapia surgiu no início da década de 40, logo após a demonstração por Paul Langevin, em 1938, do efeito terapêutico sobre os tecidos e de sua proposta de que a utilização do Ust com intensidade alta preveniria os efeitos lesivos de várias doenças. Por esta época o emprego do USt tornou-se uma “panacéia”, com múltiplas indicações, tais como dores artríticas, úlceras gástricas, eczemas, asma, hemorróidas, incontinência urinária e até *angina pectoris*, todavia, inexistiam evidências científicas que justificassem tal uso. Simultaneamente, o criticismo e preocupação com os efeitos lesivos da utilização indiscriminada do USt também aumentaram.

No começo da década de 50 até meados de 60, o uso do USt alcançou grande popularidade no Estados Unidos e Europa, embora já fossem reconhecidas limitações de sua utilização e eficácia clínica. Por volta de 1953, o USt passou a ser amplamente utilizado na medicina física e de reabilitação, especialmente no tratamento de indivíduos portadores de artrite reumatóide e doença de Meniere. A compreensão de que a temperatura tecidual se eleva durante a insonação estimulou fisioterapeutas a explorar este efeito térmico para a redução da inflamação e aumento da mobilidade articular.

Apesar destas várias décadas de uso, a evidência científica da eficácia do USt no tratamento das desordens musculoesqueléticas ainda é empírica, existindo poucas evidências conclusivas sobre seu efeito, não obstante tenha sido demonstrado seu

impacto favorável sobre o desenvolvimento de algumas moléstias (GAM e JOHANNSEN, 1995; VOLPON e DIONÍSIO, 1999).

A revisão da literatura pertinente ao uso do Ultrassom terapêutico no tratamento de dores de diversas etiologias leva à conclusão quase unânime de que são necessários maiores estudos para que se possa indicar a inclusão ou aconselhar a exclusão do uso deste recurso fisioterapêutico (GAM e JOHANNSEN, 1995; PHILADELPHIA PANEL, 2001; ROBERTSON e BAKER, 2001; BROSSEAU e cols., 2006; HAY-SMITH, 2000; CASIMIRO e cols., 2006; ROBINSON, 2006; VAN DER WINDT, 2006). A análise cuidadosa destes trabalhos demonstra que, em certas circunstâncias, o USt apresenta importante efeito terapêutico, como é o caso da indicação para alguns quadros de dor no ombro (PANEL PHILADELPHIA, 2001); para dor perineal pós-parto (HAY-SMITH, 2000); aumento da força de preensão, redução no número de articulações doloridas e do inchaço na artrite reumatóide da mão (CASIMIRO e cols., 2006).

Em diversas outras situações a recomendação do USt com finalidade analgésica é controversa, existindo tanto evidência de sua eficácia quanto de sua ineficácia para situações específicas, como é o caso de dores no pescoço (PANEL PHILADELPHIA, 2001b) ombro (KURTAIS e cols., 2004), lombar (PANEL PHILADELPHIA, 2001d), lesões nervosas (YANG e cols., 2005) e na osteoartrite de joelho (ROBINSON e cols, 2002). Evidentemente, mais pesquisas são necessárias para se identificar aqueles problemas clínicos onde o USt é eficaz, e então estabelecer protocolos experimentais de tratamento e métodos padronizados para assegurar resultados mais adequados.

É importante ressaltar que em nenhuma das revisões ou meta-análises encontramos a descrição de quaisquer contra-indicações absolutas ou efeitos colaterais relacionados ao uso criterioso do recurso.

As meta-análises e as revisões sistemáticas tropeçam em dificuldades para estabelecer comparações entre os estudos que tentam demonstrar a eficácia científica e clínica do USt. Alguns critérios são considerados necessários para que se possam classificar adequadamente estes estudos, tais como controle metodológico; necessidade da inclusão de tratamentos controle e alocação aleatória nos grupos; “cegamento” do pesquisador e indivíduos tratados; descrições das variáveis de tratamento, tais como os parâmetros

selecionados para a insonação e equipamento utilizado; técnicas adequadas para se detectar o resultado; tamanho da amostra e análise estatística adequada dos resultados. Outra fonte importante para a variabilidade encontrada na literatura refere-se à multiplicidade de entidades clínicas tratadas com USt, a sua gravidade e o estágio da patologia (GAM e JOHANNSEN, 1995; ROBERTSON e BAKER, 2001). A grande dificuldade encontrada neste processo de padronização dos estudos é que a alocação adequada dos pacientes em alguns dos critérios citados determina que outros critérios sejam desconsiderados, tornando extremamente difícil estabelecer um padrão comparativo entre os estudos realizados em humanos.

Muitas vezes os padrões comparativos são também inadequados. Por exemplo, a meta-análise que compara o efeito analgésico do USt com o efeito de drogas antiinflamatórias não-esteroidas (DAINEs) nas lesões musculoesqueléticas indica a menor eficácia do tratamento com o USt (GAM e JOHANNSEN, 1995). Contudo, existem alguns problemas na construção desta meta-análise como a multiplicidade de lesões relacionadas ao aparelho locomotor sem que se considere que o recurso poderá ter diferentes impactos sobre elas. Além disto, embora o efeito do USt tenha sido menor que o das drogas estudadas, nenhum efeito colateral foi associado ao uso do recurso fisioterapêutico, ao passo que alguns dos pacientes tratados com os DAINEs relataram queixas gastrointestinais ou de outra natureza.

Um exemplo do impacto da gravidade da patologia nas conclusões dos estudos sobre a indicação terapêutica do USt pode ser obtido da análise de duas das revisões sistemáticas realizadas pelo grupo Cochrane. Na revisão realizada por Robinson e cols.(2002), concernente ao uso do USt no tratamento de osteoartrite do joelho ou quadril, a terapia com USt não se mostrou superior ao emprego de placebos. Contudo, os autores relataram que, em decorrência de falhas metodológicas dos trabalhos analisados, esta conclusão está sujeita à críticas e não se aplica à eficácia do USt para patologias semelhantes envolvendo pequenas articulações como as do punho ou das mãos. Realmente, a revisão sistemática de Casimiro e cols. (2006), mostra que, embora também existam limitações metodológicas (padrão metodológico insuficiente de pacientes por estudo), o USt mostrou-se eficaz para aumentar a força de preensão e a mobilidade

articular, para a redução do edema e do número de articulações doloridas em casos de artrite reumatóide das mãos.

Apesar de toda contradição encontrada na literatura sobre a eficácia do USt alguns pesquisadores sugerem o impacto positivo do USt sobre algumas moléstias, como por exemplo a aceleração do processo de regeneração tecidual, com a diminuição significativa no tamanho de úlceras varicosas crônica tratadas com USt pulsado. Além disto, o USt auxilia na modulação de determinados sintomas associados à estas úlceras, como dor e o edema (DYSON e cols., 1976; CRAIG e cols., 1999). A aceleração da regeneração tecidual quando o USt é utilizado no tratamento de lesões intertegumentarias pode ser decorrente da sua capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos e osteoblastos associados ao aumento na síntese de colágeno, o que poderia conduzir à aceleração das fases inflamatória e proliferativa (YONG e DYSON, 1990; DOAN e cols., 1999; REHER e cols., 1999). A aplicação deste recurso nas feridas cirúrgicas, desde o primeiro dia de cirurgia, promove a elevação na taxa de cicatrização aliada à sua capacidade de proporcionar modificações morfológicas e morfométricas em nervos axotomizado. Estes achados sugerem a eficácia do USt pulsado na aceleração do processo de regeneração também de lesões teciduais agudas (BYL e cols., 1992; CRISCI e FERREIRA, 2002).

A observação de que o USt pode exercer um efeito quimiotático sobre macrófagos reforça a idéia que este recurso seja importante ferramenta no tratamento de moléstias inflamatórias, tanto na fase aguda quanto na fase crônica do processo (DE DEYNE e KIRSCH-VOLDERS, 1995).

As lesões inflamatórias musculoesqueléticas são freqüentes em indivíduos sejam eles atletas ou não. Independente do mecanismo de lesão, a fase de cicatrização é semelhante a todos. Portanto, modalidades terapêuticas que se propõe a acelerar a fase proliferativa da regeneração tecidual e, por conseguinte, promover o retorno precoce as atividades, são muito importantes (RANTANEM e cols., 1999).

Outra indicação clínica freqüente, embora controversa, do USt relaciona-se ao seu potencial efeito analgésico, no tratamento de lesões esqueléticas e intertegumentária de etiologia inflamatória ou traumatológica (BRAND e cols., 1999; CHANG e HSU, 2004;

LIRANI e LAZARETTI-CASTRO, 2005; GEBAUER e CORRELL, 2005; RASO e cols., 2005; BABA-AKBARI SARI e cols., 2006; BROUSSE e cols., 2002; D'VAZ e cols., 2006).

3.3. MECANISMO DE AÇÃO DO USt

A par destas observações clínicas, diversas investigações foram realizadas para se determinar o efeito biológico do USt. Embora muitas delas tenham sido realizadas em tecidos vivos, um grande número foi feito em condições *in vitro*, na qual o USt foi aplicado às suspensões de moléculas ou células. Embora os estudos *in vitro* sejam responsáveis por uma grande parcela do conhecimento atual sobre os mecanismos envolvidos no efeito biológico do USt, estudos em organismos vivos são essenciais para validar a ocorrência *in vivo* dos efeitos biofísicos descritos, definir a sua segurança e as aplicações clínicas do USt (FYFE E CHAHL, 1985; BAKER e cols., 2001; NYBORG e cols., 2001).

Fica claro, entretanto, que em última análise as alterações estruturais e morfológicas que ocorrem no tecido exposto ao feixe sonoro decorrem da interação entre tecido e as ondas sonoras através de mecanismos físicos térmicos ou não-térmicos (DEFINITIONS AND DESCRIPTION OF NONTHERMAL..., 2000). A propagação das ondas pode ocorrer em dois modos: contínuo ou pulsado. Se as ondas sonoras são contínuas e sem modulação, proporcionam maior efeito térmico. A principal diferença entre os dois modos está na interrupção da propagação da onda que ocorre no modo pulsado. Estas interrupções periódicas, intercalando pulsos com pausas, ajudam a dissipar o calor gerado durante o pulso. O modo contínuo determina aumento na temperatura mais rápido e de maior magnitude em relação ao pulsado.

Além do modo de propagação das ondas, o aquecimento tecidual depende de parâmetros como a intensidade, frequência da onda e, caso se esteja utilizado o modo pulsado, a frequência de repetição de pulso (16 -100 Hz), que permite maior controle do efeito térmico através da modulação dos pulsos (FYFE e CHAHL, 1985; CAMBIER e cols., 2001; DEMMINK e cols., 2003). Apesar de na clínica haver distinção entre os efeitos térmicos e não-térmicos do USt parece que esta distinção é empregada basicamente como critério de classificação, porque em organismos vivos é impossível a obtenção de uma completa dissociação entre eles (DEMMINK e cols., 2003; GAM e JOHANNSEN, 1995).

3.3.1. Efeitos Térmicos

Em situações *in vivo*, a porção de energia da onda sonora que é absorvida pelo tecido é convertida em calor, levando ao aquecimento tecidual. Este aquecimento é determinado pela frequência e intensidade da onda e pelo tipo de tecido exposto a energia acústica. Foi demonstrada uma relação direta entre a absorção do ultra-som e quantidade de proteína no tecido. Ou seja, quanto maior a concentração de proteína, maior será a absorção da onda sonora e maior o calor gerado (JOHNS, 2002).

O aumento da temperatura que determinará os efeitos térmicos deriva basicamente dos fenômenos de atenuação e absorção da onda sonora. O fenômeno da atenuação é descrito como a dissipação da energia sonora ao atravessar um tecido, sendo um dos fatores responsáveis pelo aquecimento tecidual. Por sua vez, a absorção refere-se à conversão da energia acústica em calor (DOAN e cols., 1999; TER HARR, 1999; HSIEH, 2005; FISHER e cols., 2003). O aumento da temperatura induzida pelo USt depende também dos parâmetros de insonação como frequência, duração do pulso, intensidade e tempo de exposição, aliados à propriedades do tecido insonado, como o coeficiente de absorção e a taxa de perfusão tecidual. De maneira geral, o efeito térmico está associado a altas intensidades de onda e ao modo contínuo (DALECKI, 2004).

As lesões passíveis de serem causadas pelo efeito térmico do USt são descritas desde 1935. O dano tecidual que pode ser induzido pelo efeito térmico é decorrente da combinação entre a intensidade e tempo de exposição ao feixe sonoro. Assim, o controle destas variáveis pode levar à ocorrência de lesões controladas que assumem um caráter seletivo, localizado, reversível ou irreversível de acordo com a necessidade. A possibilidade de controlar as lesões induzidas por altas intensidade de onda deu origem às recentes aplicações do USt no tratamento de neoplasias (NYBORG e cols., 2001; FRENKEL e cols., 2006; TOYOAKI e cols., 2006), assunto que está além do objetivo desta revisão.

Na prática fisioterapêutica, os efeitos térmicos são requeridos quando se deseja promover o aumento da elasticidade de estruturas colagenosas, redução do espasmo muscular com conseqüente alívio nos quadros algícos ou quando se quer promover o aumento do fluxo sanguíneo local. Dyson (1987) sugeriu que a temperatura tecidual deve ser mantida em

40-45 °C por pelo menos 5 minutos para que sejam evidenciados os benefícios do efeito térmico. Exigências similares foram propostas por vários outros autores (MERRICK e cols., 2002; GALLO e cols., 2004). Experimentos realizados em tecidos não perfundidos mostraram que o USt modo contínuo (1 MHz; 1W/cm²) eleva a temperatura tecidual na razão de 0,86 °C/min (WILLIAMS, 1987). Estes resultados são dificilmente extrapolados para uma situação *in vivo*, onde a perfusão sanguínea normal contribui para a dissipação do calor. Estudos que utilizaram termistores inseridos em diferentes profundidades revelaram que o tratamento com USt modo contínuo (1 ou 3MHz) resulta em aumento da temperatura tissular diretamente proporcional ao tempo e à frequência de onda (DRAPER e cols., 1995; CHAN e cols., 1998).

Assim, quando o USt é aplicado no modo contínuo com a frequência de 1 MHz, um acréscimo efetivo na temperatura tecidual só será atingido quando se utilizam intensidades maiores ou iguais a 1,5 W/cm² durante pelo menos 6-10 minutos (DRAPER e cols., 1995; OSHIKOYA e cols., 2000). Intensidades menores do que 0,5 W/cm² determinam um aumento na temperatura inferior a 1°C, mesmo quando a aplicação prolonga-se por 10 ou mais minutos (DRAPER e cols., 1995).

Desta forma a idéia de que devem existir outros mecanismos, além do aquecimento tecidual, envolvidos no efeito analgésico do USt, ganha consistência mesmo que se esteja utilizando o modo contínuo, uma vez que vários trabalhos onde são evidenciados os efeitos analgésicos e/ou antiinflamatórios do USt usam parâmetros e tempo de insonação insuficientes para causar este aumento de temperatura tecidual (MERRICK e cols., 2002, 2003; HSIEH, 2005, 2006).

3.3.2. Efeitos Não-Térmicos

Como mecanismos não-térmicos entende-se a produção de efeitos biológicos sem um significativo grau de aquecimento tecidual (aumento na temperatura <1 °C) (CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS, 2000). Os mecanismos envolvidos nos efeitos não-térmicos foram divididos por Ter Harr (1989) em cavitacionais ou derivados do fluxo acústico.

Ao se propagarem através do tecido as ondas sonoras provocam um efeito de compressão seguido de rarefação, levando à formação de bolhas de gás no fluido tecidual. É esta formação de bolhas gasosas, resultantes da vibração causada pelo USt, que é denominada cavitação acústica. O fluxo acústico é um fenômeno secundário à cavitação, sendo definido como a movimentação do líquido localizado ao redor da bolha. Juntos, o fluxo acústico e a cavitação podem levar à rápida mudança de pressão dentro e em torno da célula e à mudança transitória da temperatura em torno da bolha. Embora grande parte destes resultados tenha sido obtida em estudos *in vitro*, estudos vêm sendo realizados em modelos experimentais animais para investigar este fenômeno sobre organismos vivos, em função das características e do tempo de exposição do feixe (NYBORG e cols., 2001; DALECKI, 2004; FISHER, 2003).

Vários estudos demonstraram que o ultra-som altera as células envolvidas na inflamação. Especificamente, o USt parece modular os efeitos de vasoconstrição, propriedades da adesão do linfócito ao endotélio, degranulação de mastócitos, fagocitose e produção de fatores do crescimento por macrófagos; modificar o fluxo de cálcio nos fibroblastos; estimular a angiogênese; favorecer a proliferação de células-T, dos osteoblastos, dos fibroblastos e de proteínas associadas com a inflamação e regeneração tecidual (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, interferon- γ , fator de crescimento do fibroblasto fator-b, fator de crescimento vascular endotelial e colágeno) e acelerar a trombólise. Em general, a maioria destas investigações usou uma frequência de 1 ou 3 MHz e as intensidades variaram de 0.1 a 1.5 W/cm² (JONHS, 2002).

Já outros estudos sugerem que o ultra-som pode modificar propriedades da membrana celular, como adesão celular, permeabilidade de membrana, fluxo de cálcio e proliferação celular. Isto ocorreria provavelmente, pela ativação de vias de transdução que levam a regulação da expressão gênica. É importante destacar que a exposição ao ultra-som promove um aumento intracelular de cálcio nos fibroblastos, sugerindo uma alteração na permeabilidade da membrana, permitindo a passagem de cálcio para dentro da célula. Após a exposição ao ultra-som, as células expõem rapidamente o cálcio, retornado ao estado de homeostasia. Os efeitos de cavitação transiente e aquecimento foram eliminados como mecanismos possíveis para os aumentos intracelular de cálcio. As células utilizam o cálcio como um cofactor para a regulação da atividade enzimática,

muitas das quais estão associadas a vias de transdução de respostas celulares. A ativação da via de transdução sensível ao cálcio (proteína quinase C e o AMPc) resulta geralmente na ativação gênica. A proteína resultante pode modular funções intracelulares e a atividade de células adjacentes (JONHS, 2002).

Huang e cols.(2005) verificaram, através de estudos eletroneuromiográficos, que a aplicação do USt não modifica a velocidade da condução nervosa em fibras nociceptivas aferentes. Apesar disto, estudos recentes demonstram que a aplicação periférica do USt modo pulsado, em patas de ratos inflamadas pela injeção de Adjuvante Completo de Freund (CFA), determina a redução no número de células expressando NOS neuronal nas lâminas um e dois da medula espinal (HSIEH, 2005, 2006).

Em síntese, estes resultados sugerem que o USt pode modular vários mecanismos e sistemas de transdução de respostas biológicas envolvidas no processo inflamatório. Assim, deste mosaico de informações, emerge a possibilidade que o USt possua habilidades analgésicas e antiinflamatórias apenas em condições que possam ser alteradas por um dos múltiplos efeitos biológicos causados pela sua aplicação. Ter Haar e cols (1987) ratificam a necessidade de maiores esclarecimentos tanto da eficácia quanto da ineficácia do USt como um potencial recurso terapêutico, uma vez que a decisão clínica racional para a escolha de um tratamento deve partir do conhecimento sobre os recursos utilizados.

3.4. A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A Inflamação em seu sentido mais amplo é uma resposta tecidual a uma injúria. Os sinais clássicos da inflamação são eritema, calor, edema e dor. Estes sinais clínicos advém de processos celulares e moleculares, muitos dos quais foram definidos no último século, e que podem ser reproduzidos em sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Dentre as várias vias celulares e moleculares que constituem a inflamação, algumas tem recebido grande atenção por sua relevância no estabelecimento da resposta inflamatória. Uma destas vias é iniciada pela estimulação de células endoteliais por citocinas proinflamatórias tais como Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1). A exposição à estas citocinas proinflamatórias resulta na ativação da cascata que leva a

produção dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B e à indução dos genes que são controlados por eles, tais como genes para citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas indutíveis que produzem mediadores inflamatórios (iNOS e COX-2)(para revisão, veja WINYARD, 2003; CUNHA e cols., 2005).

Uma característica chave das doenças inflamatórias é a expressão aumentada de determinados genes que codificam proteínas inflamatórias. A indução da expressão de diversas moléculas da adesão, tais como a Molécula de Adesão Vascular Intercelular-1(ICAM-1), e Moléculas de Adesão Vascular E-Selectina (VCAM-1) representam um importante evento inflamatório e um potencial alvo terapêutico. A transcrição destas proteínas resulta em sua ativação na superfície da membrana das células endoteliais. A expressão aumentada destas moléculas de adesão, por sua vez, facilita o “rolamento” e a adesão de células fagocíticas ao endotélio vascular adjacentes ao local da inflamação. As células fagocíticas, como os neutrófilos, migram através da parede do vaso por diapedese, chegando assim ao foco da inflamação aguda. Posteriormente, na fase crônica da inflamação, outros tipos de célula como os macrófagos e linfócitos serão recrutados ao local da inflamação por um processo semelhante.

O óxido nítrico (NO), o superóxido e o seu produto peroxinitrito, desempenham papel fundamental na reação inflamatória. A descoberta de métodos para detectar a presença e/ou bloquear os efeitos destas moléculas, permitiu que se estudasse sua participação no desenvolvimento da resposta inflamatória. O NO é sintetizado à partir da L-arginina por enzimas da família das Óxido Nítrico Sintases (NOS). Três isoformas foram descritas e clonadas: NOS nas células endoteliais (eNOS ou tipo 3), NOS cerebral (bNOS, nNOS, ou tipo 1), e o tipo indutível (iNOS ou tipo 2). A produção de óxido nítrico pelas duas formas constitutíveis (cNOS) é cálcio-dependente, já a produção pela iNOS não requer aumento na concentração intracelular de cálcio. Assim sendo, a iNOS é induzida por agentes proinflamatórios tais como a endotoxina (lipopolissacarídeo bacteriano; LPS), a interleucina-1 β (IL-1 β), a TNF- α e o interferon- γ , tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MONCADA, 1999).

O anion superóxido envolvido na resposta inflamatória é produzido pela redução do elétron da molécula de oxigênio. Ele é formado por células inflamatórias a partir de várias vias, como por exemplo, a que envolve o metabolismo do ácido araquidônico e formação

de eicosanóides. Destacam-se, como importantes funções proinflamatórias do ânion superóxido, os danos às células endoteliais e aumento da permeabilidade microvascular, formação de fatores quimiotáticos como o leucotrieno B₄ e recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação. Além disto, o Superóxido reage com o Óxido Nítrico para formar o Peroxinitrito, que é um oxidante altamente reativo e próinflamatório (para revisão, veja SALVEMINI e cols., 2003).

Dependendo do tipo de estímulo nocivo ou do tecido envolvido, o conjunto de mediadores inflamatórios podem diferir. Todavia, os eicosanóides são, com certeza, os mediadores mais universais, estando envolvidos, direta ou indiretamente, na gênese de todos os sinais e sintomas clássicos da inflamação. Eles participam, por exemplo, do desenvolvimento da dor inflamatória, sendo responsáveis pela sensibilização dos nociceptores, caracterizando o processo de hiperalgesia (FERREIRA, 2002). A síntese dos eicosanóides envolvidos na hiperalgesia é iniciada por estímulos que levam ao aumento da concentração de cálcio intracelular, resultando na ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂). Esta enzima cliva fragmentos dos fosfolípidos da membrana celular, liberando ácido araquidônico (MILLAN, 1999). Este ácido eicosatetraenóico é então ciclizado e oxidado por ciclooxigenases (COXs) dando origem às prostaglandinas clássicas (PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂), à prostaciclina (PGI₂) e à tromboxana (TXA₂). Existem várias isoformas de COX: a constitutiva (COX-1), cuja função é a formação das prostaglandinas responsáveis por várias funções fisiológicas; a indutível (COX-2) que pode ser constitutivamente encontrada em neurônios e a COX-3, localizada principalmente no hipotálamo (MILLAN, 1999; BOTTING, 2003).

O aumento da concentração de cálcio intracelular pode ser levada à efeito pela ativação tanto de receptores cininérgicos quanto de receptores de NMDA (BREDEE e cols., 1995; BEICHE e cols., 1996; WILLINGALE e cols., 1997). A hiperalgesia induzida pelas prostaglandinas potencia a liberação de Glutamato (GLU) e substância P (SP) na sinapse medular das fibras aferentes primárias (FAP), em decorrência do aumento de monofosfato-cíclico de adenosina (AMPc) e do aumento da condutância de Sódio e Cálcio na fibra aferente primária (SVENSSON e YAKSH, 2002).

São vários os receptores de prostanóides que estão envolvidos na atividade pró-nociceptiva. Por exemplo, a PGD_2 e a PGI_2 ativam os receptores DP e IP que estão associados ao aumento da atividade da Adenil Ciclase (AC); a $PGF_{2\alpha}$ leva à ativação dos receptores FP que produzem IP_3 responsável pelo aumento da concentração de cálcio intracelular (FERREIRA e LORENZETTI, 1996; MINAMI e cols., 1997). A PGE_2 é o principal prostanóide envolvido na nocicepção periférica, atuando em quatro subtipos de receptores, a saber: EP_1 (elevação de cálcio); EP_2 , EP_3 (inibição da AC) e EP_4 (ativação da AC) (COLEMAN e cols., 1994; BOIE e cols., 1997).

A dor inflamatória aguda é caracterizada pela hipernocicepção decorrente da sensibilização de neurônios sensoriais nociceptivos primários, o que leva à hiperalgesia e alodínia. Após a injúria tecidual, mediadores específicos são liberados e atuam em receptores metabotrópicos da membrana neuronal, promovendo a ativação de segundos mensageiros. A bradicinina, os eicosanóides e as aminas simpáticas são mediadores extremamente importantes na gênese da hipernocicepção mecânica em ratos, sendo responsáveis pela ativação de segundos mensageiros como o AMPc, proteína quinase A e C (PKA e PKC, respectivamente), responsáveis por reduzir o limiar dos nociceptores e aumentar a excitabilidade da membrana neuronal. Deste modo, a ativação do nociceptor e a transmissão do impulso pelos neurônios nociceptivos primários são facilitadas (CUNHA e cols., 2005).

Na última década mostrou-se que muitos estímulos inflamatórios não estimulam diretamente a liberação dos mediadores hipernociceptivos, mas que sua liberação é precedida por uma cascata de citocinas. As citocinas são produzidas por vários tipos de células em resposta a uma variedade de estímulos, constituindo a ligação entre a injúria, o reconhecimento de estruturas estranhas ao meio celular e o desenvolvimento de sinais e sintomas da inflamação, sejam eles locais ou sistêmicos (CUNHA e cols., 2005)..

Neste contexto, desenvolveu-se o conceito de que os estímulos inflamatórios causam hipernocicepção primariamente através da liberação seqüencial de citocinas. É sabido que a Carragenina (CG) induz hipernocicepção mecânica através de uma cascata de citocinas liberadas por células residentes ou migratórias, estimuladas primariamente pela bradicinina. A primeira citocina liberada é o $TNF-\alpha$, que promove a liberação de IL-6,

IL-1 β e do fator neutrofílico quimioatraente induzido por citocina (CINC-1), responsáveis pelo desencadeamento da síntese das prostaglandinas e liberação de aminas simpáticas (UTSUNOMIYA e cols., 1998; CUNHA e cols., 1999a; CUNHA e cols., 2000; PINHEIRO e CALIXTO, 2002). Este conceito nos permite entender porque a inibição de uma única citocina (IL-1 β ou TNF- α) pode acarretar a analgesia. O sucesso clínico do agente anti-TNF- α na artrite reumatóide exemplifica este conceito que, aliás, opõe-se à idéia clássica de que a hiperalgesia inflamatória seja resultado da ação direta de uma “sopa de mediadores” (CUNHA e cols., 2005).

3.5. MODELO DE HIPERALGESIA TÉRMICA - PLACA QUENTE

Um importante aspecto da dor inflamatória é a hiperalgesia, que envolve tanto a sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas quanto à facilitação da transmissão central a nível do corno dorsal da medula espinhal. O seu componente periférico reflete a ação de mediadores inflamatórios que atuam sobre as terminações nervosas, enquanto a central decorre da facilitação da transmissão sináptica (MORRIS e cols., 2004).

Muito do que se sabe sobre os mecanismos da dor derivam de modelos experimentais. Em geral, os testes algesimétricos inflamatórios são baseados na análise de respostas comportamentais desencadeados diretamente por um processo inflamatório, como os modelos de contorção abdominal e incapacitação articular, ou que são deflagradas indiretamente por um estímulo exógeno primário ou associado ao processo inflamatório como os testes de retirada da pata evocada por pressão ou calor (LAVICH e cols., 2005).

Em animais, a resposta nociceptiva pode ser detectada através de uma resposta de fuga ao estímulo nocivo. Além disto, manifestações fisiológicas de nocicepção medular ou supramedular podem ser utilizadas na avaliação de possíveis efeitos analgésicos de drogas e seus mecanismos de ação, bem como no entendimento do processo doloroso. Muitos métodos para a avaliação da atividade analgésica em animais têm sido idealizados. Esses testes envolvem a aplicação de estímulos dolorosos padronizados e a observação da resposta do animal e, então, verificando-se a capacidade de uma droga ou

procedimento alterar a intensidade da resposta ao estímulo nocivo. Nestes testes, o estímulo mínimo em intensidade e duração deve ser preferencialmente usado de modo que os animais experimentais não sejam submetidos a sofrimento injustificado ou a traumatismos físicos (ZIMMERMANN, 1983).

A escolha do método mais apropriado para avaliação da resposta nociceptiva é fundamental para a correta interpretação e estudo dos mecanismos envolvidos na transmissão da resposta dolorosa e dos agentes que interferem nestas vias. As características desejáveis de um método de avaliação é que seja reproduzível, não-invasivo e permita a quantificação do fenômeno (LE BARS e cols., 2001). A habilidade de medir o limiar termociceptivo em roedores é uma ferramenta importante na pesquisa da dor, já que é considerada uma indicação direta da condição nociceptiva (GALBRAITH e cols., 1993). A utilização de um teste térmico traz algumas vantagens sobre estímulos mecânicos, pelo fato serem ativados basicamente os nociceptores específicos, enquanto a estimulação mecânica pode ativar também mecanocetores de baixo limiar (fibras A β) (LE BARS e cols., 2001).

O modelo da Placa Quente (PQ) é um dos testes termo-algesimétricos comumente utilizados para investigação de nocicepção e analgesia em roedores. Este método foi originalmente descrito por Woolfe e MacDonald (1944). Posteriormente, foram propostas adaptações ao teste visando uniformizar e aumentar sua reprodutibilidade (EDDY e LEIMBACH, 1953). Estes autores propuseram que fossem utilizadas temperaturas entre de 50 e 55 °C, caracterizando melhor a resposta observada. A técnica consiste no registro temporal do início da resposta nociceptiva dos animais colocados sobre uma superfície com temperatura constante. Decorridos alguns segundos o estímulo térmico se torna aversivo e os animais reagem com um padrão consistente de comportamento. As respostas observadas incluem salto, pontapés, sapateio, sacudida da pata, lambida ou até mesmo a contenção da pata junto ao corpo. A observação de um destes comportamentos determina o final do teste. Parte da confiabilidade deste teste reside no fato de que estes comportamentos raramente são manifestados pelo animal na ausência do estímulo térmico (EDDY e cols., 1950).

Este teste é capaz de detectar e quantificar os efeitos analgésicos de drogas opioidérgicas e não-opioidérgicas, sendo sensível ao efeito de analgésicos não-

esteroidais como paracetamol e ácido acetilsalicílico. A temperatura da placa quente em torno de 50 °C é suficiente para desencadear resposta nociceptiva sem causar lesões na pata do roedor, quando o teste é bem conduzido (TJØLSEN e cols., 1991).

Os testes onde a temperatura da PQ é inferior a 50 °C apresentam maior tempo de latência, porém com a desvantagem de aumentar a variabilidade das leituras. Mesmo assim, o aumento da sensibilidade do teste compensa esta desvantagem, originando um procedimento simples, que fornece resultados quantitativos e reprodutíveis, permitindo a avaliação segura da interferência da droga ou procedimento sobre a resposta nociceptiva de ratos e camundongos (O'CALLAGHAN e HOLTZMAN, 1975, HANDWERKER, 1983; HUNSKAAR e cols., 1986).

A descrição do teste da PQ-modificado prevê a colocação do animal, individualmente, em uma caixa de acrílico, sobre uma superfície metálica aquecida à temperatura constante. Após a obtenção de um valor basal o animal recebe a injeção intraplantar de um estímulo inflamatório, normalmente carragenina (CG), em doses suficientemente baixas para que o animal continue apoiando a pata injetada sobre a superfície aquecida. O período transcorrido entre o contato com a superfície e a ocorrência da resposta descrita é medido com um cronômetro manual. A redução neste tempo de latência é entendida como um índice da hiperalgesia inflamatória (MENÉNDEZ e cols., 2002).

A Carragenina (CG) é um polissacarídeo extraído de algumas espécies de algas vermelhas. O termo carragenina veio da palavra "carragin" de origem Irlandesa que significa musgo. Refere-se não somente a uma espécie de alga vermelha *Chondrus crispus*, mas também ao extrato mucopolissacarídeo descoberto por um farmacêutico inglês em 1862. O nome foi alterado posteriormente para carrageenan (carragenina) com a adição do sufixo "-an" para polissacarídeos. Estruturalmente, a carragenina é um grupo complexo de polissacarídeos composto por monômeros relacionados a galactose, sendo de três tipos principais: lambda, kappa e iota. Cada uma delas tem sua própria característica de gelificação termicamente reversível. A forma lambda dá origem a um gel pouco firme à temperatura ambiente e é capaz de induzir uma resposta inflamatória quando injetado subcutaneamente (MORRIS, 2003).

A inflamação induzida pela carragenina foi descrita originalmente por Winter (1962), como sendo uma resposta aguda, não-imune, bem pesquisada e altamente reprodutível. Os sinais cardinais da inflamação – edema, hiperalgisia, dor e eritema desenvolvem-se após a injeção subcutânea, resultando da ação de agentes proinflamatórios como a bradicinina, histamina, eicosanóides, sistema do complemento, radicais livres do oxigênio, etc. Tais agentes podem ser gerados no local da lesão ou por células migratórias. Segundo Lavich e cols (2005), a estimulação plantar de ratos com a carragenina (250 e 50 µg/pata) leva a uma rápida resposta hiperalgésica na pata injetada que pode ser avaliada pelo teste da PQ-modificada. Neste teste, foi visto que esta resposta alcança o platô entre 15 e 360 minutos após a indução inflamatória. O pré-tratamento com indometacina (4mg/kg,ip) inibe o fenômeno, demonstrando que a CG desencadeia uma resposta hiperalgésica aguda, sensível ao tratamento por drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs).



Face ao exposto, pretendemos avaliar experimentalmente a eficácia antinociceptiva e antiinflamatória da aplicação local do USt modo pulsado, em um modelo de inflamação aguda induzida pela injeção intraplantar de CG na pata posterior de ratos. Avaliaremos a resposta nociceptiva pelo método da PQ-modificado e o edema será medido pletismométricamente. Após a verificação da influência de alguns parâmetros relacionados à onda ultrasônica, pretendemos iniciar os estudos sobre o possível mecanismo da ação antinociceptiva e antiedematogênica deste recurso fisioterapêutico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.2. ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, 130-190 g, adquiridos junto ao Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram mantidos no laboratório para ambientação, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura ambiente média de 25° C, em caixas plásticas com cama de maravalha, contendo no máximo seis animais, com água comum e ração *ad libitum* até a véspera do experimento. Na véspera do experimento os animais eram pesados, marcados, levados para sala reservada no laboratório, e colocados em jejum por cerca de 12 horas, mantendo-se água *ad libitum*.

A maioria dos testes algesimétricos envolve a quantificação de respostas motoras e/ou comportamentais, sendo, portanto, passíveis de influências como estresse do animal e variabilidade nos critérios de avaliação do examinador. A fim de minimizar este efeito apenas um examinador realizou as medidas na PQ e tentou-se reduzir variações no ambiente durante o experimento (movimento, som, odores, temperatura, luz, etc.).

4.3. INDUÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA

A resposta inflamatória aguda foi induzida pela injeção intra-plantar (i.pl.) de Carragenina (CG). A carragenina, na concentração de 1% em salina fisiológica estéril, foi injetada subcutaneamente, na região subplantar de uma das patas posteriores dos ratos, num volume constante de 50 µl/pata. Para esta injeção, a agulha acoplada à uma seringa descartável de 0,3 ml foi inserida cuidadosamente através de um dos coxins plantares, com o bisel voltado para cima. A visualização da agulha através da pele permitiu que a CG fosse injetada sempre na mesma região central da pata. A agulha foi retirada com leve rotação da seringa, evitando-se o refluxo do volume injetado. O método usado para a imobilização dos animais durante este procedimento está ilustrado na Figura 1.

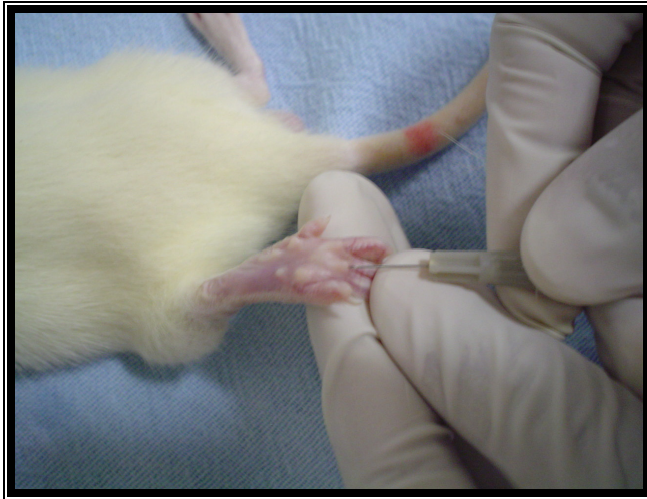


Figura 1: Injeção intra-plantar de Carragenina na pata posterior de rato

4.4. MEDIDA DE HIPERALGESIA PELO MÉTODO DA PLACA QUENTE (PQ)

4.4.1. Informações gerais

Para acompanhar as variações induzidas pelo Ultra-som terapêutico (USt) sobre o desenvolvimento da hiperalgesia, foi avaliado o tempo de permanência (s) dos ratos na Placa Quente (PQ) a uma temperatura de 48° C, numa adaptação do modelo proposto por Lavich e cols.(2005). Uma das vantagens deste teste é que o animal não fica contido durante a avaliação, além de ser descrito como um método reprodutível, sensível e simples para detectar hiperalgesia de origem central e periférica (LAVICH e cols., 2005).

Com objetivo de reduzir o estresse do animal, utilizamos o teste com estímulo térmico de intensidade constante de 48° C, apesar do fato de que temperaturas inferiores à 55° C apresentam maior variabilidade nas respostas. Todavia, conforme demonstrado por Menéndez e cols. (2002), a confiabilidade e a reprodutibilidade dos testes que utilizam temperaturas menores são adequados aos nossos propósitos, com a vantagem de induzirem injúria mínima para o animal.

Neste teste, o limiar nociceptivo é determinado pelo reflexo de “retirada” da pata da PQ ou pela resposta motora mais complexa que acompanha este ato. Lavich e cols. (2005) descreveram em seu estudo que doses baixas de agentes nociceptivos como a

carragenina (CG) são capazes de reduzir o tempo para a retirada da pata, permitindo a avaliação reprodutível da hiperalgesia inflamatória. A vantagem desta observação é que a resposta nociceptiva pode ser detectada com menores doses de agentes flogísticos, com injúria tecidual mínima e maior sensibilidade a agentes analgésicos.

4.4.2. Descrição do teste

Neste estudo, o animal foi colocado individualmente em uma caixa de acrílico transparente com fundo de alumínio (HARGREAVES, 1988), sendo estabelecido um período mínimo de 02 minutos de ambientação dentro desta caixa, para minimizar efeito do estresse. Este tempo foi suficiente para que o animal parasse de explorar o ambiente. Após este período a caixa foi colocada em um “banho-maria” com termostato ajustado para temperatura constante de 48º C. A movimentação da caixa foi feita cuidadosamente, evitando-se assustar o animal.

O limiar nociceptivo foi avaliado pelo tempo de permanência na PQ até o aparecimento de uma das seguintes respostas característica do animal: troca de apoio dos pés como um “sapateio”, o animal “agita” ou lambe a pata injetada. O tempo de permanência foi aferido em segundos, com um cronômetro manual (Technos, mod.TE898/8) graduado ao centésimo de segundos. As medidas foram realizadas nos tempos Basal^(*), 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas pós-injeção de CG. Estabelecemos um tempo de corte de 50 s, que equivale aproximadamente a 2,5 vezes o valor basal médio.

Reduções no tempo de permanência basal, observadas nos diferentes tempos após a injeção de CG, foram tomadas como indicativo do desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. Alterações no perfil temporal destas reduções foram interpretadas como um efeito pró ou antinociceptivo (redução ou aumento do tempo de permanência, respectivamente).

(*) Tempo Basal = medida realizada antes de qualquer procedimento.

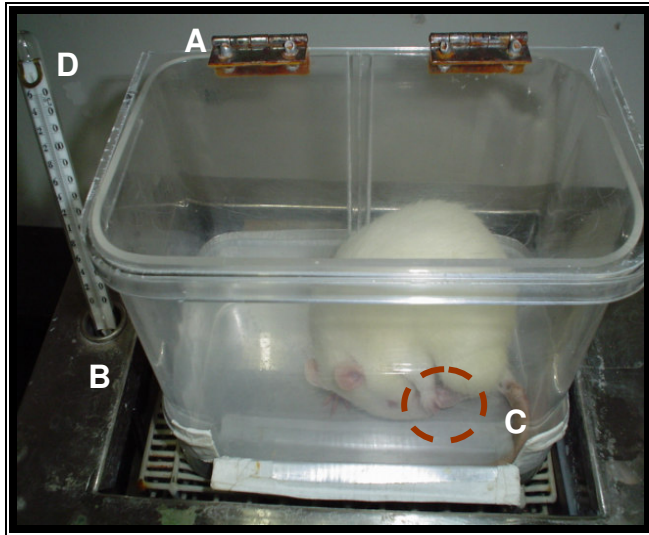


Figura 2: Placa Quente "modificada".

Caixa de acrílico transparente com fundo de alumínio (A) colocada sobre um "banho-maria" à temperatura constante de 48 °C (B). Visualização da resposta nociceptiva característica (animal lambendo a pata posterior esquerda) (C). Termômetro (D).

4.5. MEDIDA PLETISMOMÉTRICA DO EDEMA DE PATA

5.4.1. Informações gerais

Em sua revisão, Morris (2003) relata que a resposta inflamatória induzida pela CG é usualmente quantificada pelo aumento no volume da pata (edema) o qual atinge um pico em torno da 5ª hora pós-injeção e é modulado por inibidores específicos da cascata inflamatória, entre os quais as drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs), como a indometacina. O modelo teve e continua tendo um papel vital na avaliação do efeito antiinflamatório de novas drogas ou de recursos fisioterapêuticos.

A injeção subcutânea de carragenina na pata de ratos ou camundongos induz aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada. Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória. Uma das maneiras de avaliar o volume das patas que receberam a injeção de CG é através de um hidropletismômetro como o fornecido pela Ugo Basile (mod. 7150; Itália). Este aparelho especialmente desenhado para medidas precisas do volume da pata de rato ou camundongo, consiste de duas câmaras transparentes, ligadas em um sistema de vasos comunicantes e preenchidas com uma solução salina contendo um agente para reduzir a tensão superficial (Extran 1%). A imersão da pata do animal em uma das câmaras determina o deslocamento do líquido na

segunda câmara. Transdutores captam este deslocamento do líquido, proporcionando a medida de volume. O exato volume da pata (em μl) é visualizado em um visor digital.

5.4.2. Descrição do teste

O desenvolvimento da resposta edematogênica (μl ; pletismômetro Ugo Basile mod 7140) foi avaliado imediatamente após a retirada do animal da PQ, mantendo os mesmos tempos já mencionados. A pata dos animais, previamente umedecida em solução de Extran (1% em salina), foi imersa até a articulação tíbio-társica, na cuba do aparelho, registrando-se o volume deslocado. Medidas duplas ou triplas asseguraram a constância do resultado. O valor do edema foi calculado como delta (Δ) do volume das patas traseiras, determinado pela diferença (μl) entre o volume da pata injetada e o volume da pata contralateral ($\Delta = \text{volume da pata injetada} - \text{volume da pata contralateral}$). Para aumentar a confiabilidade, apenas um examinador, treinado previamente, realizou estas medidas.

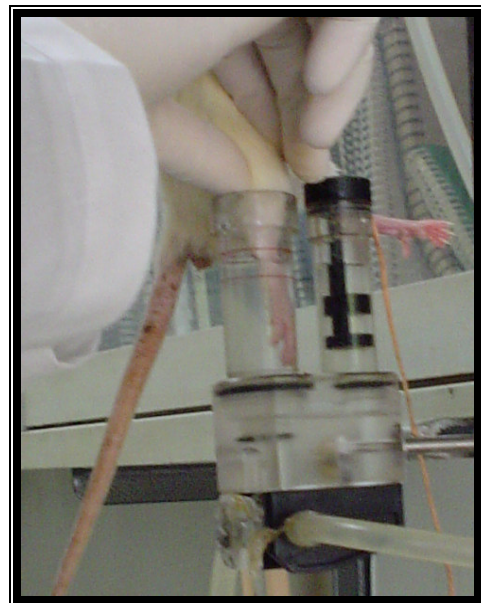
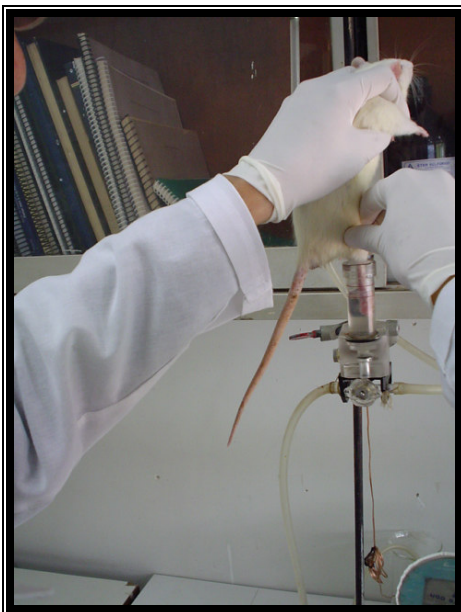


Figura 3: Medida do volume da pata traseira de ratos, em hidropletismômetro Ugo Basile mod. 7140.

4.6. APLICAÇÃO DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO MODO PULSADO (USt)

O equipamento utilizado foi um Ultra-som *SONOPULSE II*, *IBRAMED*, previamente aferido e calibrado a cada três meses, por empresa especializada. Foram utilizados os seguintes parâmetros: Área de Emissão (ERA) 1 cm²; frequência da onda de 1 MHz; onda pulsátil; frequência de repetição do pulso de 16 a 100 Hz; relação pulso/pausa de 1/5; intensidade de 0,1 a 0,4 W/cm², tempo de aplicação de 2 minutos.

A aplicação foi feita sobre a região plantar da pata que recebeu CG, imediatamente após as medidas de hiperalgesia e edema nos tempos “zero”, 2 e 4 horas. Para melhorar a adaptação do cabeçote do equipamento com a área tratada foi utilizado um gel hidrossolúvel inerte. A aplicação foi realizada com movimentos circulares, evitando ondas estacionárias. Durante a aplicação o animal foi levemente contido por um experimentador treinado, de forma a induzir o mínimo possível de estresse ao animal. Ao todo o animal recebeu três aplicações de USt com intervalo de duas horas entre um tratamento e outro, conforme protocolo geral apresentado à seguir (Figura 5).

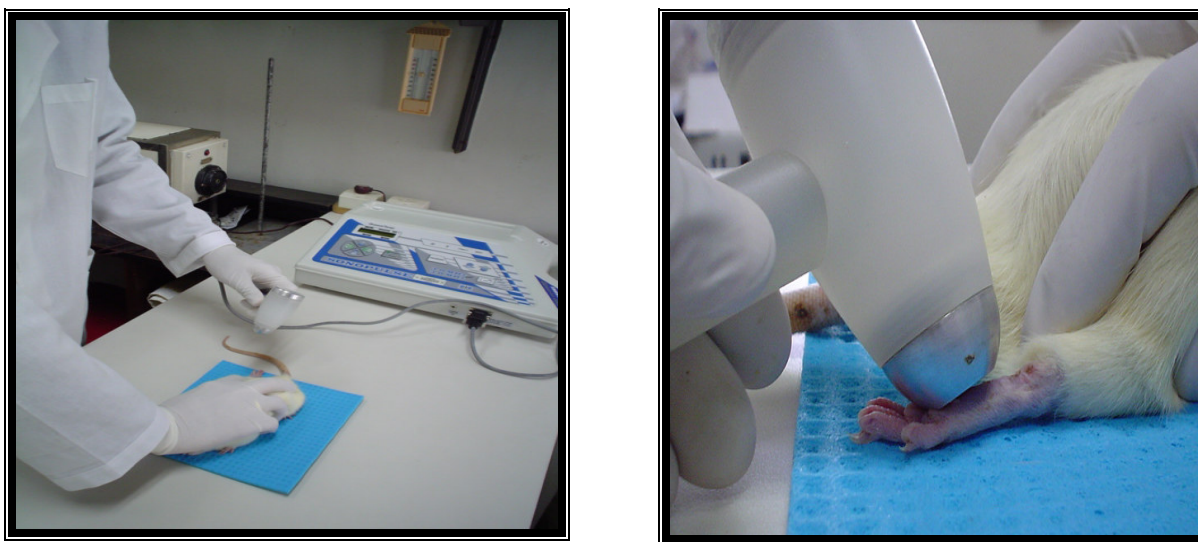


Figura 4: Equipamento utilizado neste estudo: Ultra-som *SONOPULSE II*, *IBRAMED*, ERA 1 cm². Visualização da aplicação do USt sendo realizada na pata injetada com CG (posterior esquerda), com o animal levemente contido.

4.7. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Visando facilitar a leitura e a clareza na exposição, as modificações do protocolo básico apresentado, a seguir determinadas pelos diferentes objetivos de nossos experimentos são descritas nos itens “Operacionalização”. O protocolo geral contém os períodos das medidas de Placa Quente (PQ), edema (ED) e as três aplicações do USt (Figura 5).

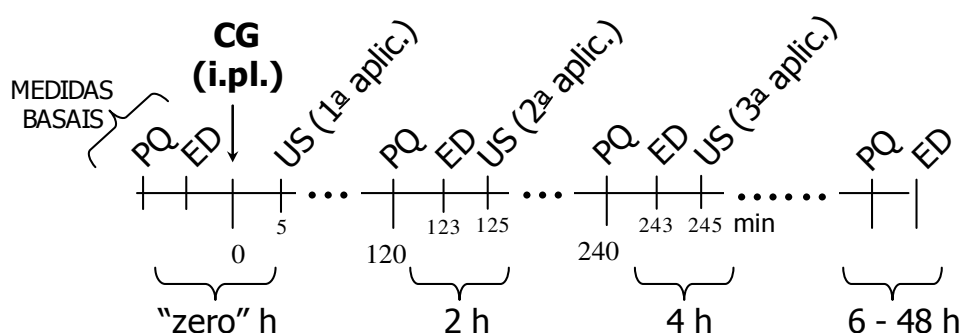


Figura 5: Protocolo geral dos experimentos.

7.4.1. Verificação da reprodutibilidade do valor do Tempo de Permanência em ausência de estímulo inflamatório.

Objetivo: realizar medidas seqüenciais do Tempo de Permanência (s) na placa quente (PQ), avaliando a possibilidade da multiplicidade de leituras determinarem alterações da resposta basal, em ausência de estímulo inflamatório.

Operacionalização: foram realizadas várias medidas do Tempo de Permanência (s) na PQ mantida a uma temperatura constante de 48º C. Os animais (n=5) foram submetidos à avaliação nos tempos “zero”, 30, 60, 75 e 90 minutos. Estes animais não sofreram qualquer intervenção prévia às medidas na PQ.

7.4.2. Escolha da dose de Carragenina (CG)

Objetivo: identificar a dose de carragenina suficiente para induzir respostas edematogênica e hiperalgésica, sem promover postura antálgica de elevação do membro injetado.

Operacionalização: Os animais (n=20) foram divididos em quatro grupos experimentais. O processo inflamatório foi induzido pela injeção intraplantar (i.pl.) de CG. Cada grupo recebeu uma dose distinta de CG (125, 500 ou 750 µg/pata) ou de seu veículo (Salina Fisiológica Estéril, SAL), sempre em volume constante de 50 µl/pata.

A hiperalgesia térmica foi avaliada pelo método da PQ com temperatura constante de 48°C. As medidas foram realizadas nos tempos: basal (imediatamente antes da injeção de CG) e 180 minutos após esta injeção. O desenvolvimento do edema foi avaliado em hidropletismômetro, sendo as leituras pletismométricas realizadas imediatamente após o procedimento na PQ. O tempo de 180 minutos foi escolhido por ser suficiente para a indução de respostas próximas à resposta máxima, conforme dados obtidos em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório.

7.4.3. Verificação da influência de leituras prévias sobre a magnitude da hiperalgesia na 3ª hora pós-CG

Objetivo: analisar a interferência de múltiplas leituras na Placa Quente (PQ) sobre o desenvolvimento da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina (CG)

Operacionalização: os animais (n=12) foram divididos em dois grupos. Todos os animais receberam uma injeção i.pl. de CG 1% (50 µl/pata), após a realização de uma medida basal do Tempo de Permanência (s) na PQ. Os animais do primeiro grupo foram submetidos a outras cinco medidas, nos tempos 30, 60, 90, 120 e 180 minutos pós-CG. Os animais do segundo grupo foram submetidos à apenas uma medida, aos 180 minutos pós-CG.

7.4.4. Validação farmacológica do protocolo experimental

Objetivo: validar o procedimento experimental para avaliação da hiperalgesia e do edema inflamatório (múltiplas leituras do tempo de Permanência na PQ, seguidas das leituras pletismométricas), através da observação dos efeitos de drogas analgésicas e/ou antiinflamatórias bem conhecidas.

4.7.4.1. Drogas antiinflamatórias não esteroidais (Diclofenaco e Dipirona)

Operacionalização: após a obtenção dos valores basais na placa quente e no pletismômetro, quinze animais foram divididos em três grupos (n=5/grupo). Cada grupo recebeu um dos tratamentos descritos a seguir, por via oral (gavagem), 60 minutos antes da indução do processo inflamatório pela injeção i.pl. de 500 µg/pata de CG. Os dois grupos experimentais foram tratados com Diclofenaco (Diclo; 10 mg/Kg; p.o.) ou Dipirona (Dipi; 5 mg/Kg; p.o.), ao passo que o grupo controle recebeu o veículo utilizado (água comum; 10 ml/Kg; p.o.).

A hiperalgesia térmica e o edema foram reavaliados aos 180 minutos pós-CG. As medidas pletismométricas do edema foram realizadas logo após a avaliação na PQ, conforme Protocolo geral para o experimento (Figura 6).

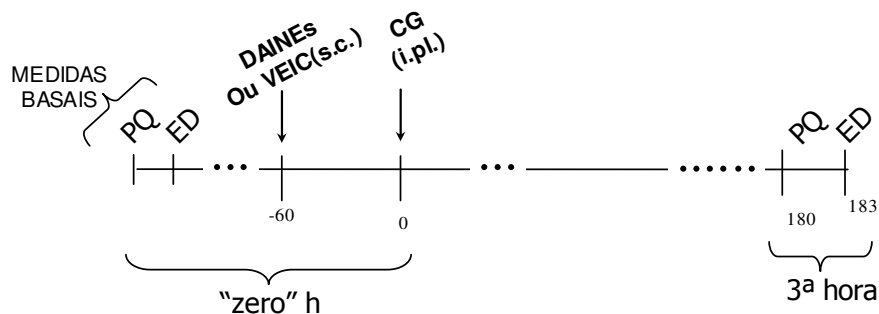


Figura 6: Protocolo geral para o experimento: Drogas antiinflamatórias não-esteroidais (Diclofenaco e Dipirona)

4.7.4.2. Analgésicos opióides (Morfina).

Operacionalização: um grupo de animais (n=11) recebeu injeção intraplantar de CG (dose de 500 µg/pata) para indução de um processo inflamatório agudo. Após a obtenção dos valores basais da hiperalgisia térmica e do edema, o grupo experimental (n=6) foi pré-tratado com Morfina (MORF; 5mg/Kg, s.c) ao passo que o grupo controle (n=5) recebeu o veículo utilizado (SAL; 10ml/Kg, s.c.). Decorridos 30 minutos todos os animais receberam uma injeção i.pl. de CG (500 µl/pata).

Foram avaliados edema e hiperalgisia nos tempos basal, 30 e 180 minutos após a injeção de CG. Estes tempos foram selecionados a partir de um estudo prévio para corresponderem a analgesia máxima induzida pela Morfina (30 min) e ao pico do edema da CG (180 min) (Figura 7).

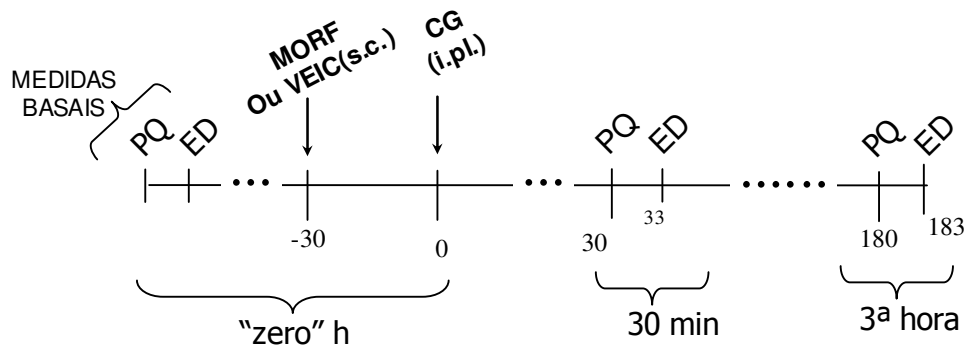


Figura 7: Protocolo geral para o experimento: Analgésicos Opióides.

7.4.5. Efeitos do Ultra-som (modo pulsado) sobre a resposta inflamatória aguda.

Objetivo: Avaliar se a aplicação do Ultra-som (USt) no modo pulsado alteraria a hiperalgisia térmica e o edema induzidos pela injeção i.pl. de CG.

Operacionalização: Após a obtenção dos valores basais, os animais (n=24) foram divididos em quatro grupos (n=6/grupo). Todos os grupos receberam uma injeção i.pl. de CG na pata posterior esquerda, no tempo "zero". Os animais do primeiro grupo (US+)

receberam três aplicações de USt (*SONOPULSE II*; ERA 1 cm², frequência da onda de 1MHz; frequência de repetição do pulso de 100 Hz, relação pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², duração do tratamento de 2 min) aplicado sobre a região plantar, imediatamente após as medidas de hiperalgesia e edema nos tempos “zero”, 2 e 4 horas. No segundo grupo (US-) o equipamento permaneceu desligado, de forma que os animais receberam apenas massagem com o cabeçote do USt por um período cronometrado de 2 minutos, nos mesmos períodos do grupo anterior. O grupo controle (GEL) recebeu apenas a aplicação do gel de contato nos tempos determinados. Um quarto grupo (CONT) recebeu apenas a injeção i.pl. de CG, sem ter sido submetido a tratamento algum. A hiperalgesia térmica e o edema foram avaliados até a 48^a hora após a injeção i.pl. de CG (“zero”, 2, 4, 6, 24 e 48 horas) (Figura 8).

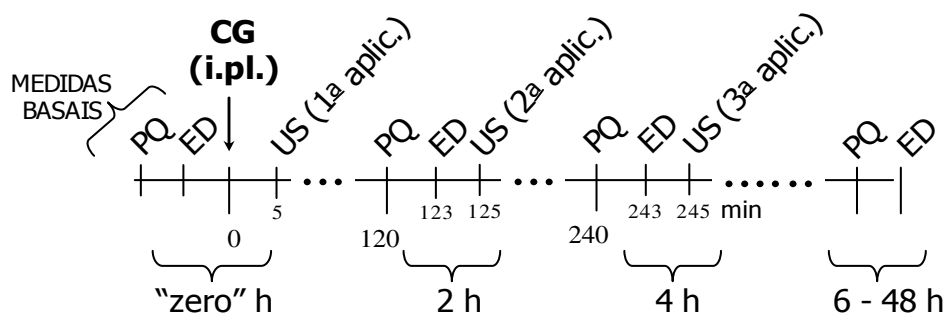


Figura 8: Protocolo geral dos experimentos: Efeito da aplicação do USt modo pulsado sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda.

7.4.6. Efeito do USt pulsado sobre o limiar de resposta de uma pata normal

Objetivo: avaliar se a aplicação do USt no modo pulsado alteraria o Tempo de Permanência na Placa Quente, em ausência de resposta inflamatória.

Operacionalização: após a realização de uma medida basal na PQ os animais (n=18) foram divididos em três grupos (n=6/grupo). No primeiro grupo (NAÏVE) foram feitas apenas as medidas de tempo de permanência na PQ, em ausência de qualquer tratamento ou procedimento prévio. Os animais do segundo grupo (US+) receberam

aplicação do USt com os parâmetros já descritos, enquanto os animais do terceiro grupo receberam apenas a massagem com o cabeçote do aparelho desligado. Nenhum dos animais recebeu qualquer injeção i.pl.. A massagem com o cabeçote ligado ou desligado foi feita nos tempos “zero”, 2 e 4 h. As medidas foram realizadas sempre imediatamente antes do USt , nos tempos “zero”, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas (Figura 9).

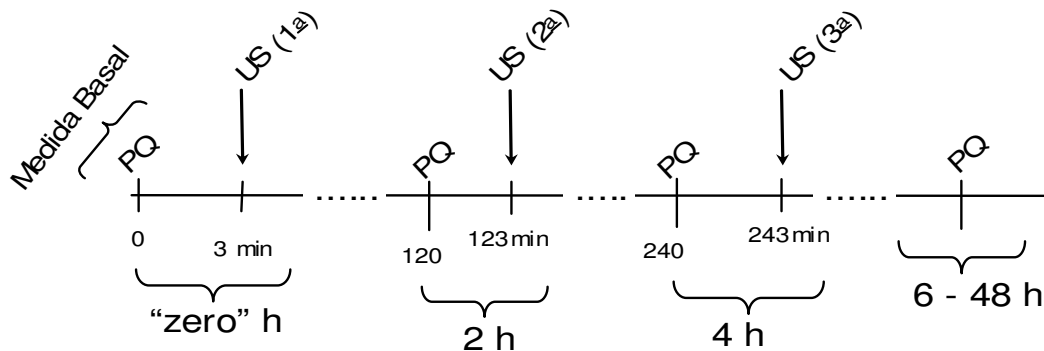


Figura 9: Protocolo para o experimento Efeito do USt pulsado sobre o limiar de resposta de uma pata normal.

7.4.7. Comparar a eficácia antinociceptiva e antiedematogênica do USt nos modos pulsado e contínuo.

Objetivo: Avaliar se a aplicação do USt no modo contínuo alteraria a hiperalgesia térmica e o edema induzidos pela injeção i.pl. de CG em ratos.

Operacionalização: após a obtenção dos valores basais do tempo de Permanência na PQ e do volume da pata, os animais (n=18) receberam uma injeção i.pl. de CG (500 µg/pata) e os animais do grupo controle não receberam qualquer outro tratamento. No segundo grupo (US⁺_p) os animais receberam o USt modo pulsado (ERA 1 cm², 1 MHz; 100 Hz, pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², tempo de aplicação 2 min), aplicado sobre a região plantar, nos tempos “zero”, 2 e 4 horas, enquanto os animais do terceiro grupo (US⁺_c) receberam aplicação de USt modo contínuo (ERA 1 cm², freqüência da onda

de 1MHz; intensidade de 0,5 W/cm², tempo de aplicação 2 min), aplicado sobre a região plantar, nos mesmos tempos.

As medidas subseqüentes da hiperalgesia térmica e do edema, nos três grupos foram feitas às 2, 4, 6, 8, 24 e 48 hs pós-CG (Figura 10).

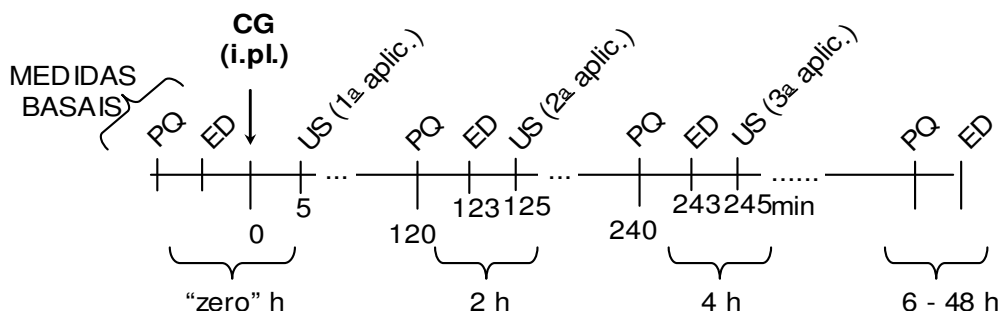


Figura 10: Protocolo geral para o experimento de Comparação da eficácia do USt nos modos pulsado e contínuo

7.4.8. Influência da variação de alguns parâmetros da onda (frequência e intensidade) sobre os efeitos antinociceptivos e antiedematogênico do USt modo pulsado

4.7.8.1. Variação da frequência de repetição do pulso

Objetivo: Avaliar a influência da alteração da frequência de repetição do pulso da onda ultrassônica sobre os efeitos antinociceptivo e antiedematogênico observados após aplicação do USt modo pulsado, no modelo de inflamação aguda induzida pela injeção i.pl. de CG (500 µg/pata), em ratos.

Operacionalização: após o procedimento padrão de obtenção das medidas basais (Tempo de Permanência e Volume da pata) e da injeção i.pl. de CG (500 µg/pata), os animais (n=24) foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo recebeu apenas a massagem com o cabeçote do aparelho desligado, enquanto os outros três grupos receberam as aplicações de USt mantendo parâmetros citados anteriormente (ERA 1

cm², freqüência da onda 1MHz; freqüência de repetição do pulso de 100 Hz, pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², tempo de aplicação 2 min), nos mesmos intervalos de tempo, porém com a utilização de uma freqüência de repetição do pulso de onda diferente em cada grupo (6, 48 e 100 Hz).

Nesta seqüência experimental e na próxima excluimos o grupo controle (nenhum procedimento além da injeção de CG), tendo em vista que este grupo consistentemente mostrou-se igual ao grupo US⁻.

Neste conjunto de experimentos foi seguido o protocolo geral (Figura 8).

4.7.8.2. Variação da Intensidade acústica da onda ultrasônica

Objetivo: Avaliar a influência da alteração da intensidade acústica da onda sobre os efeitos antinociceptivo e antiedematogênico observados após aplicação do US^t modo pulsado, no modelo de inflamação induzida pela injeção i.pl. de CG (500µg/pata), em ratos.

Operacionalização: após o procedimento padrão de obtenção das medidas basais (Tempo de Permanência e Volume da pata) e da injeção i.pl. de CG (500 µg/pata), os animais (n=30) foram divididos em cinco grupos. O primeiro grupo recebeu apenas massagem com o cabeçote do aparelho desligado, enquanto os outros três grupos receberam as aplicações de US^t mantendo parâmetros citados anteriores (ERA 1 cm², freqüência da onda 1 MHz; freqüência de repetição do pulso de 100 Hz, pulso-pausa de 1/5, tempo de aplicação 2 min), nos mesmos intervalos de tempo, porém com a utilização de uma intensidade diferente em cada grupo. (0,1; 0,2; 0,3 ou 0,4 W/cm²).

Também nestes experimentos foi seguido o protocolo geral (Figura 8), respeitando-se as diferentes intensidades da onda ultrasônica aplicadas a cada grupo.

7.4.9. Determinação do nível tecidual de citocinas após três aplicações de USt, durante uma resposta inflamatória induzida pela carragenina, em ratos.

Objetivo: determinar o nível de duas citocinas, o TNF α (proinflamatória) e a IL-10 (antiinflamatória) no coxim plantar de rato após três aplicações de USt, durante resposta inflamatória aguda induzida pela injeção i.pl. de CG

Operacionalização: inicialmente obtivemos os níveis de TNF α e IL-10 após a resposta inflamatória induzida pela injeção i.pl. de CG (500 μ g/pata), para determinar o nível destas citocinas em nosso modelo inflamatório. Os animais (n=21) foram divididos em sete grupos (n=3/grupo), a coleta do tecido plantar foi realizada após a injeção i.pl. de CG nos tempos “zero”, 2, 4, 6, 24 e 48 horas. Para isto, em cada um dos tempos citados três animais (escolhidos aleatoriamente dentre o grupo) foram mortos por deslocamento cervical. O coxim plantar de ambas as patas, foi removido com bisturi e armazenado à 20 °C até o momento da dosagem por teste de ELISA. A realização deste teste foi gentilmente levada a efeito pela professora doutora Danielle da Glória de Souza no laboratório do professor doutor Mauro Martins Teixeira (Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB-UFMG). Após a obtenção dos níveis destas citocinas um outro grupo de animais (n=21) recebeu uma injeção i.pl. de CG (500 μ g/pata) na pata posterior esquerda, no tempo “zero”. Os animais receberam três aplicações de USt (*SONOPULSE II*; ERA 1 cm², freqüência da onda de 1MHz; freqüência de repetição do pulso de 100 Hz, relação pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², duração do tratamento de 2 min) aplicado sobre a região plantar, realizadas nos tempos “zero”, 2 e 4 horas. A coleta do tecido plantar foi realizada conforme descrito, nos mesmos períodos do grupo inicial (Figura 11).

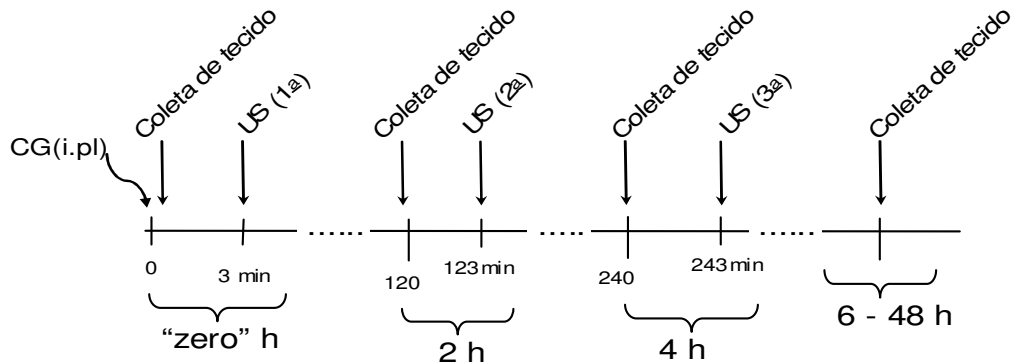


Figura 11: Protocolo Geral para determinar o nível de citocinas teciduais após a aplicação do USt pulsado.

7.4.10. Participação de opióides no efeito antinociceptivo promovido pela aplicação do USt pulsado na resposta inflamatória induzida pela carragenina.

Objetivo: investigar a participação de opióides endógenos no efeito antinociceptivo promovido pela aplicação de USt pulsado, durante uma resposta inflamatória induzida pela injeção i.p.l. de CG, em ratos.

Operacionalização: Após a obtenção dos valores basais na PQ, os animais (n=18) foram divididos em três grupos (n=6 / grupo). Todos os grupos receberam uma injeção i.p.l. de CG (500 µg/pata) na pata posterior esquerda, no tempo “zero”. No primeiro grupo (US-), o equipamento permaneceu desligado, de forma que os animais receberam apenas massagem com o cabeçote do USt por um período cronometrado de 2 minutos, nos períodos “zero”, 2 e 4 horas pós CG. O grupo US+/SAL recebeu, trinta minutos antes da injeção de CG e trinta minutos antes das medidas da 24ª hora uma injeção de Veículo (SAL; s.c.; 1ml/Kg). Os animais do terceiro grupo US+/NLX receberam injeção de Naloxona (*Sigma*; 3 mg/Kg; s.c.), nos mesmo tempos do grupo anterior. Ambos os grupos US+/SAL E US+/NLX receberam três aplicações de USt (*SONOPULSE II*; ERA 1 cm², freqüência da onda de 1MHz; freqüência de repetição do pulso de 100 Hz, relação pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², duração do tratamento de 2 min) aplicado sobre

a região plantar, imediatamente após as medidas de hiperalgesia nos tempos “zero”, 2 e 4 horas. Em todos os três grupos a hiperalgesia térmica foi avaliada na 6ª e na 24ª hora após a injeção i.pl. de CG (“zero”, 6 e 24 horas). Os tempos selecionados correspondem ao efeito antinociceptivo na fase precoce e na fase tardia, conforme determinados anteriormente (Figura 12).

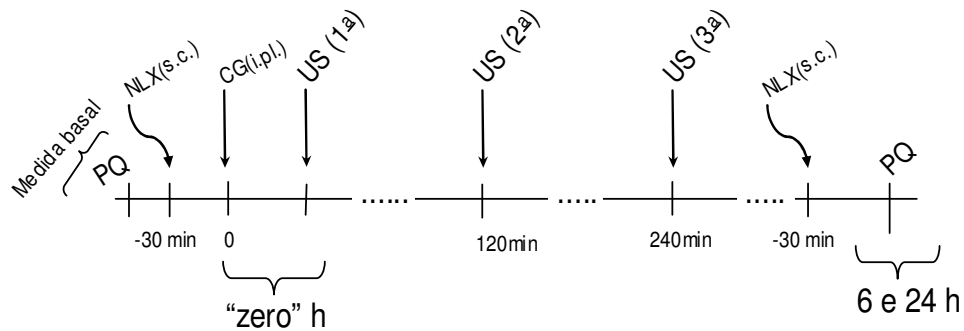


Figura 12: Protocolo Geral do experimento para determinar participação de opióides no mecanismo da ação do USt pulsado.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados são apresentados pela média \pm erro padrão das médias (E.P.M.) dos parâmetros avaliados, em gráficos de desenvolvimento temporal da resposta. Quando conveniente, calculou-se a Área sob a Curva (ASC), sendo os resultados apresentados sob forma de histogramas. Os resultados da dosagem de citocinas são apresentados, em histogramas, pela quantidade (pg/100 mg tecido) de IL-10.

O cálculo da ASC do desenvolvimento da hiperalgesia e do edema foi efetuado pelo método da somatória das áreas, para cada animal, sendo obtidos os valores das médias \pm E.P.M.. Este parâmetro será utilizado na apresentação de alguns dos resultados, visando simplificar a visualização dos efeitos obtidos.

A significância estatística das diferenças observadas foi analisada pelo teste de ANOVA seguido de pós teste de Dunnett, com nível de significância de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.2. PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE MEDIDA

2.6.1. Verificação da reprodutibilidade do valor do tempo de permanência em ausência de estímulo inflamatório

Mantendo-se a placa quente em uma temperatura de 48°C, o tempo de permanência basal foi em torno de 20-21s e não sofreu modificações significativas nas avaliações subseqüentes, mesmo quando os intervalos entre as medidas foram de apenas 15 minutos. Estes resultados minimizam a possibilidade de ocorrer aprendizado da resposta ou de que a temperatura da PQ esteja causando lesão tissular.

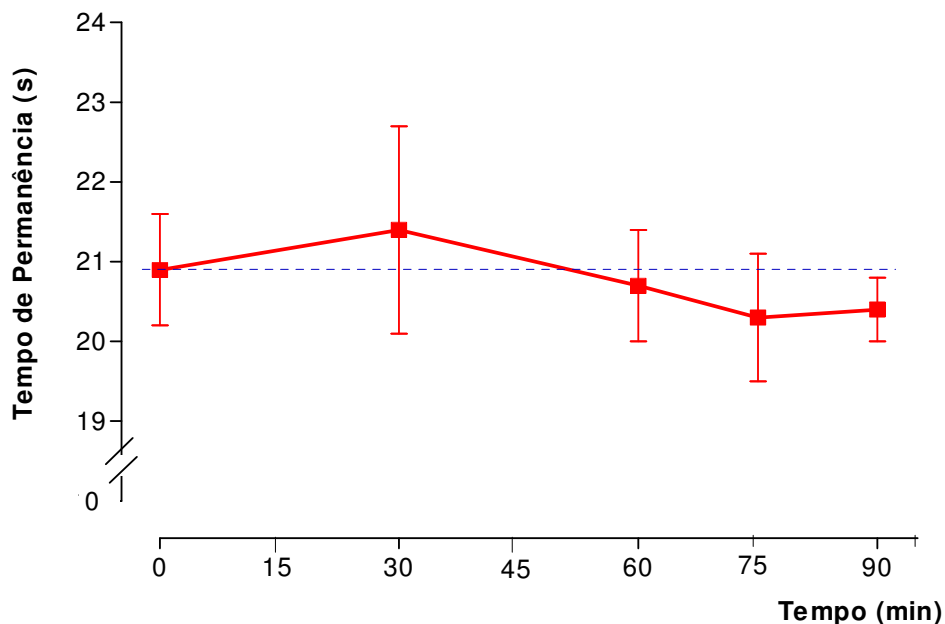


Figura 13: Medidas seqüenciais do Tempo de Permanência (s) na Placa Quente (PQ) em ausência de estímulo inflamatório. Não foi observada diferença estatística entre os valores obtidos (ANOVA-one way; $p > 0,05$, $n = 5$).

2.6.2. Escolha da dose de Carragenina (CG)

A injeção de 125 ou 500 $\mu\text{g/pata}$ (50 $\mu\text{l/pata}$, sol 0,25% ou 1%) de CG produziram reduções semelhantes no tempo de permanência. Todavia, o erro padrão da média (EPM) foi menor quando utilizamos à dose de 500 $\mu\text{g/pata}$. Além disto, a dose de 500 $\mu\text{g/pata}$ induziu, na 3^a hora após a CG, um aumento no volume da pata da ordem de $1763 \pm 36,6 \mu\text{l}$, significativamente maior que aquele induzido pela menor dose de CG ($1140 \pm 55,8 \mu\text{l}$). A maior dose (750 $\mu\text{g/pata}$) determinou o maior aumento do volume médio das patas ($2170 \pm 58,7\mu\text{l}$), porém, todos os animais deste grupo apresentaram elevação da pata injetada a partir da 3^a hora, inviabilizando o uso desta dose para a medida de hiperalgesia térmica no modelo da placa quente.

Pelo exposto, selecionamos a dose de 500 $\mu\text{g/pata}$ (CG 1%; 50 $\mu\text{l/pata}$) para os experimentos subseqüentes.

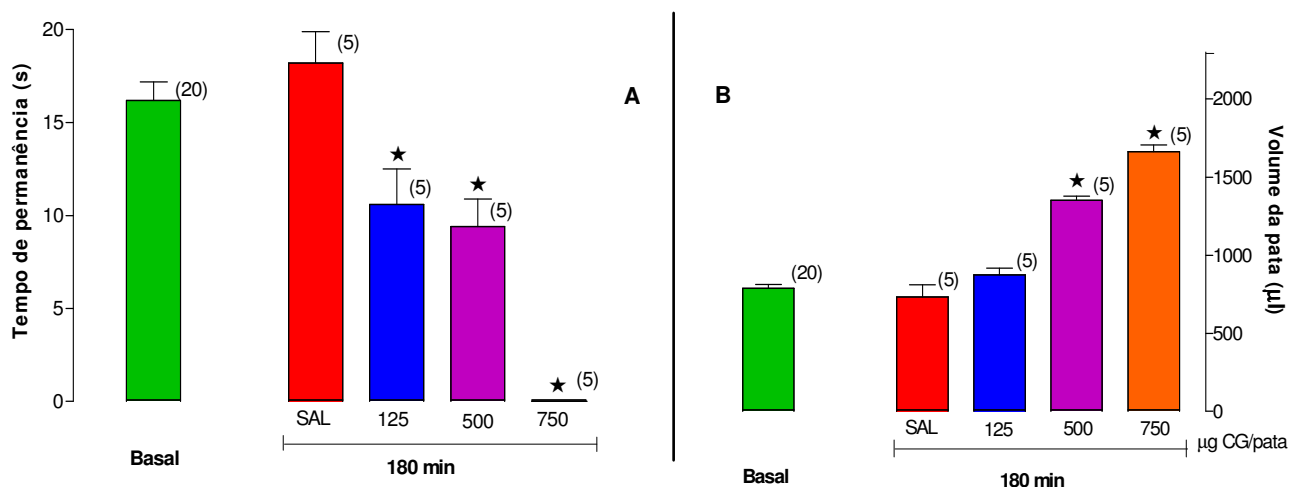


Figura 14: Influência da dose de CG sobre o Tempo de Permanência (s) na PQ (Painel A) e o volume (μl) da pata injetada (Painel B). A CG (125, 500 ou 750 $\mu\text{g/pata}$) foi injetada imediatamente após a medida do valor basal. O grupo (SAL) controle recebeu 50 $\mu\text{l/pata}$ do veículo (Salina Fisiológica Estéril). As medidas foram realizadas 180 minutos após a CG. Valores entre parênteses referem-se ao n experimental. (★) $p < 0,05$, ANOVA seguido de teste Dunnett.

2.6.3. Verificação da influência de leituras prévias sobre a magnitude da hiperalgesia na 3ª hora pós-CG

O número de leituras realizadas não alterou o desenvolvimento da hiperalgesia térmica, afastando a possibilidade do estímulo térmico, representado pela exposição múltipla à PQ potencializar a resposta inflamatória induzida pela CG.

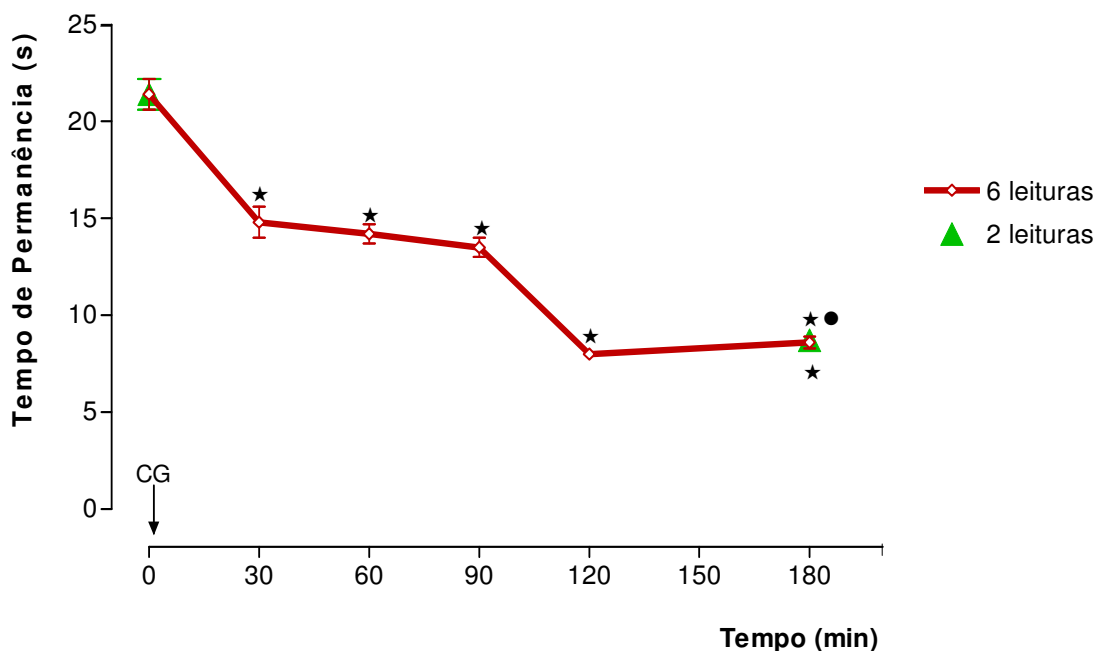


Figura 15: Tempo de Permanência (s) na PQ, analisando a influência de múltiplas leituras sobre o desenvolvimento da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina (500µg/pata, i.pl). Cada grupo constou de seis animais. A seta indica o momento da injeção de CG, realizada imediatamente após a primeira leitura. (★) Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao valor basal. (●) Ausência de diferença estatística entre valores de ambos os grupos ($p > 0,05$). (ANOVA, seguido de teste Dunnett).

2.6.4. Validação farmacológica do protocolo experimental

Objetivo: validar o procedimento experimental para avaliação da hiperalgesia e do edema inflamatório (múltiplas leituras do tempo de Permanência na PQ, seguidas das leituras pletismométricas), através da observação dos efeitos de drogas analgésicas e/ou antiinflamatórias bem conhecidas.

6.2.4.1. Drogas antiinflamatórias não esteroidais (Diclofenaco e Dipirona)

Os resultados são apresentados em histogramas, cada barra representando a média \pm E.P.M. de um dos grupos.

Três horas após a injeção i.pl. de CG, o tempo de permanência na PQ foi reduzido para 57,6% do valor basal (basal = $21,7 \pm 1,8$ s; CONT = $12,5 \pm 1,9$ s; $p < 0,05$), nos animais que receberam apenas água (veículo) por via oral. O pré-tratamento com Dipirona aumentou significativamente o tempo de permanência (Dipi = $18,4 \pm 2,7$ s) ao passo que o pré-tratamento com o Diclofenaco restaurou na 3ª hora pós CG, os valores basais do tempo de permanência (Diclo = $22,7 \pm 2,4$ s).

O edema, também avaliado na 3ª hora pós CG, foi representado por um aumento de 180,6% no volume da pata (basal = $1063 \pm 27,9$ μ l; CONT = $1920 \pm 62,8$ μ l; $p < 0,05$). O aumento no volume da pata não foi alterado pelo pré-tratamento com Dipirona, embora tenha sido significativamente reduzido nos animais pré-tratados com Diclofenaco (Diclo = $1415 \pm 63,3$ μ l; $p < 0,05$).

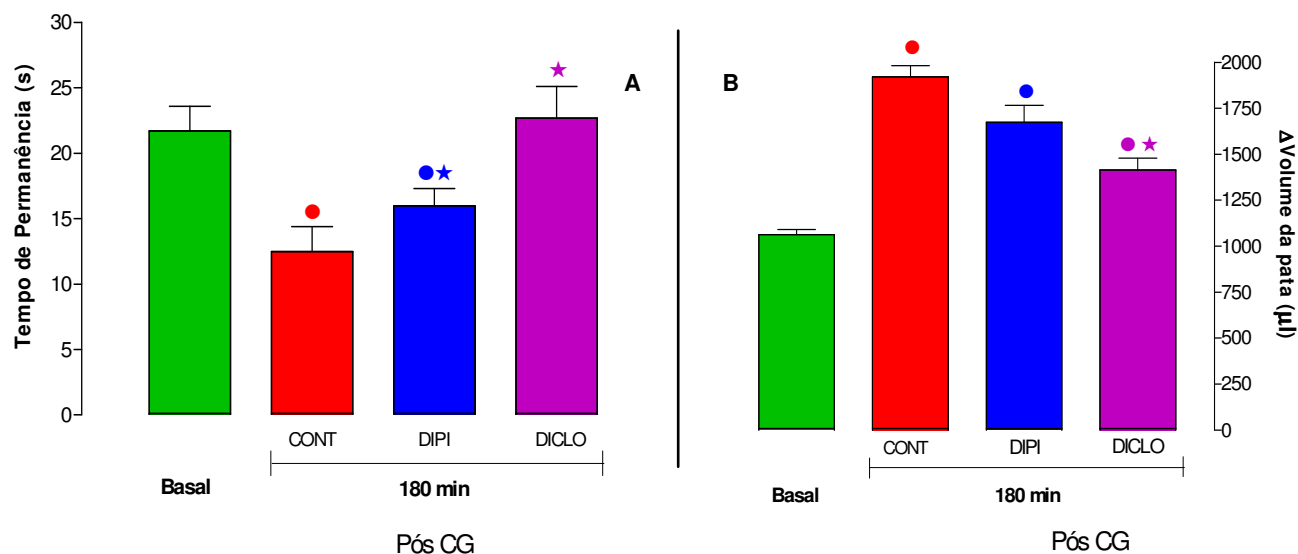


Figura 16: Efeito do pré tratamento com DAINEs sobre a hiperalgesia térmica (Painel A) e o edema (Painel B) induzidos pela carragenina (500 µg/pata; i.pl). Os grupos experimentais receberam Diclofenaco (DICLO, 10 mg/Kg; p.o.) ou Dipirona (DIPI, 5 mg/Kg; p.o.), ao passo que o grupo controle (CONT, 10 ml/Kg; p.o.) recebeu água comum. Todos os pré-tratamentos foram feitos 60 minutos antes da injeção i.pl. de CG. Cada barra representa a média ± E.P.M. de n=6. (●) Estatisticamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado ao valor basal. (★).Estatisticamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle correspondente. ANOVA seguido de teste Dunnett.

6.2.4.2. Analgésicos opióides (Morfina)

O pré-tratamento com 5 mg/Kg (s.c.) de Morfina aumentou o tempo de permanência na PQ, aos 30 minutos pós-CG, para os valores do tempo de corte (50 s). O efeito do pré-tratamento com Morfina foi transitório, tendo retornado a valores semelhantes aos do grupo controle na 3ª hora (CONT = $9,4 \pm 1,6$ s; Morf = $14,7 \pm 1,4$ s; $p > 0,05$)

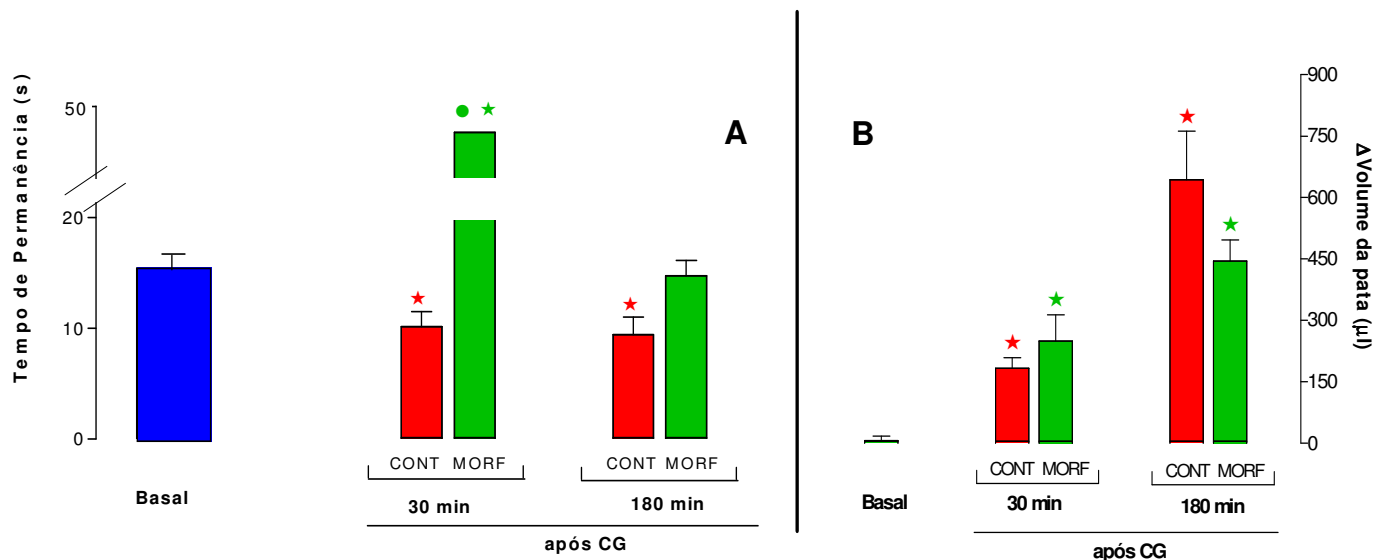


Figura 17 Efeito do pré-tratamento com um analgésico opióide sobre a hiperalgesia térmica (Painel A) e o edema (Painel B) induzidas pela carragenina (500 µg/pata, i.pl.). O grupo experimental recebeu morfina (MORF; 5mg/Kg, s.c.) e o grupo controle recebeu SAL (10 ml/Kg, s.c.) 30 minutos antes da injeção i.pl. de CG. Cada barra representa a média ± E.P.M. de n=5-6. (★) estatisticamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado ao valor basal. (●) estatisticamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle correspondente. ANOVA seguido de teste Dunnett.

2.6.5. Efeitos do Ultra-som (modo pulsado) sobre a resposta inflamatória aguda.

Os resultados deste protocolo são apresentados em curvas do desenvolvimento temporal de cada um dos dois parâmetros avaliados (Figuras 14 e 15), onde cada ponto representa à média ± E.P.M. ($n=6$ /grupo). A significância estatística foi avaliada por ANOVA, seguido de teste Dunnett. Como não existiram diferenças entre os grupos GEL e CONT, os resultados deste último grupo não são apresentados, por uma questão de clareza na visualização dos resultados.

Uma terceira figura foi construída com o conjunto destes dados. Para tanto, foi determinada a Área Sob a Curva (ASC) para cada animal, pelo método da somatória das áreas, sendo calculada a média ± E.P.M. do grupo experimental em questão. Os valores

assim obtidos foram apresentados no histograma da Figura 16, onde o painel A refere-se à hiperalgesia térmica e o Painel B ao edema.

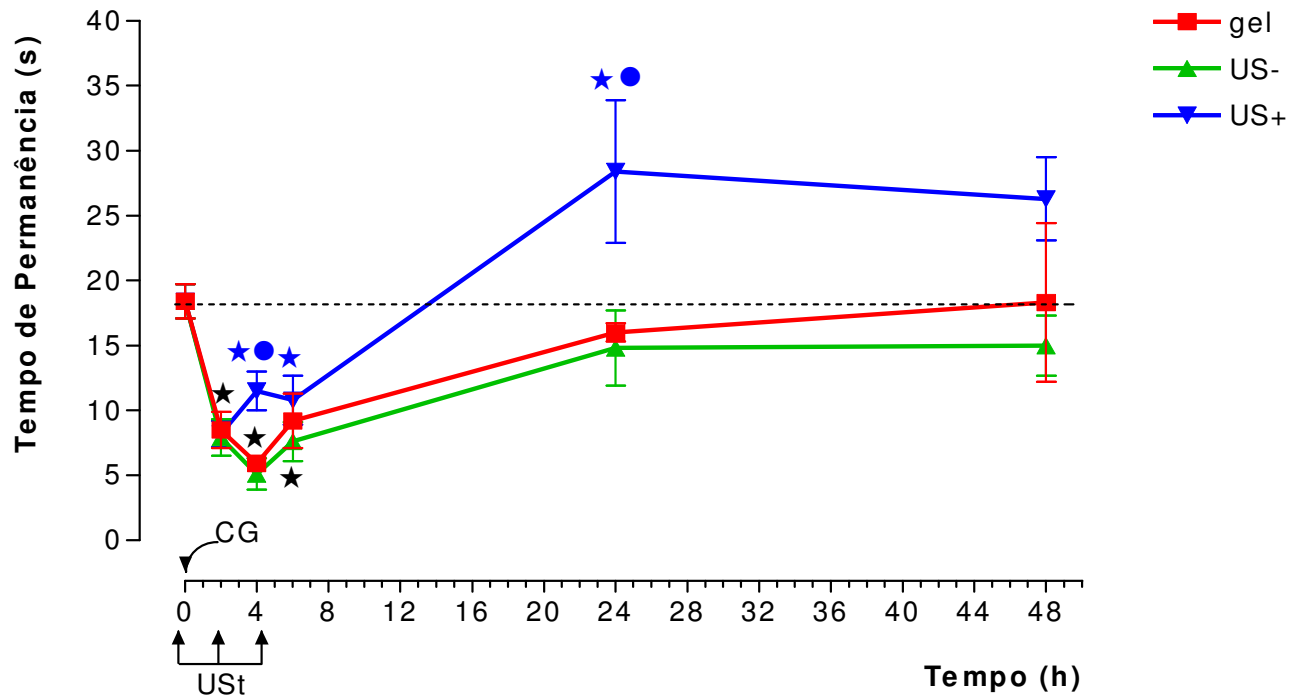


Figura 18: Avaliação do efeito do USt modo pulsado sobre o desenvolvimento temporal da hiperalgesia térmica induzida pela injeção i.pl. de CG. (500 µg/pata). A CG foi injetada em todos os animais no tempo "zero". As setas indicam os momentos de aplicação do USt. A linha pontilhada representa um prolongamento do valor basal. O grupo US+ (azul) recebeu as aplicações de USt com o aparelho ajustado com os seguintes valores: freqüência da onda de 1 MHz; freqüência de repetição do pulso de 100 Hz, relação pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², duração 2 min. O grupo US- (verde) recebeu massagem com o cabeçote do aparelho desligado. No grupo GEL (linha vermelha) foi feita apenas a aplicação do gel de contato. (★) diferença estatística (p<0,05) quando comparado ao valor basal. (●) diferença estatística (p<0,05) quando comparado ao valor do grupo GEL, no tempo em questão. ANOVA seguido de teste Dunnett.

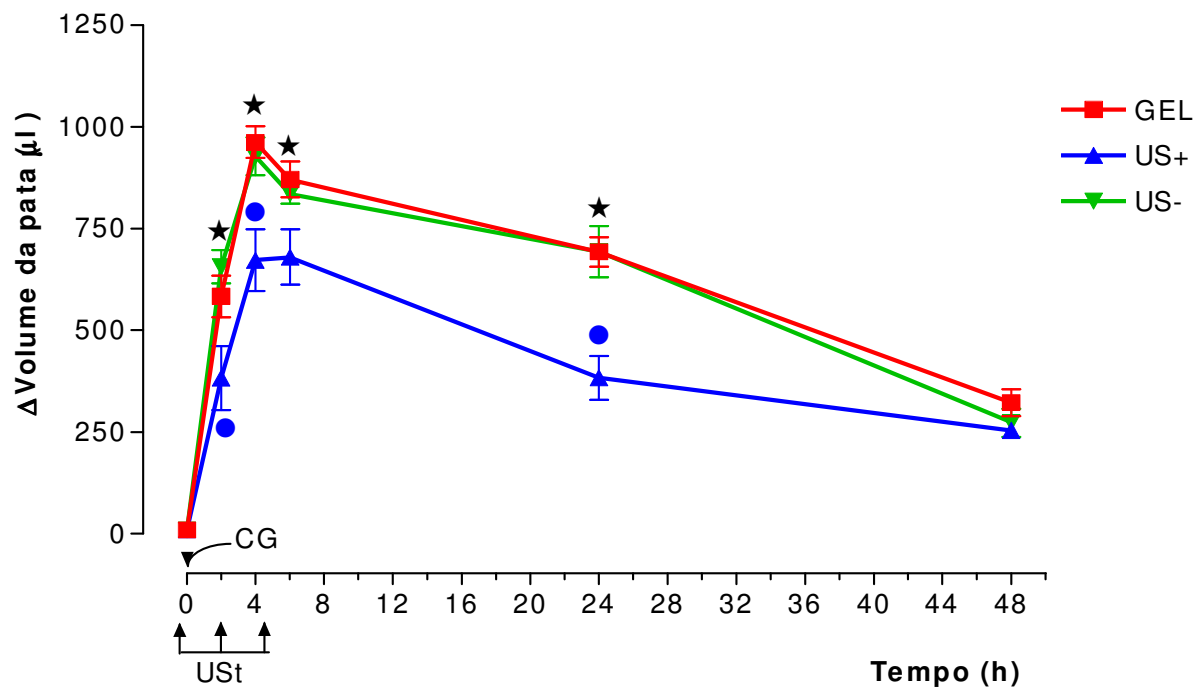


Figura 19: Avaliação do efeito do USt modo pulsado sobre o desenvolvimento temporal do edema induzido pela injeção i.pl. de CG (500 μg/pata). A CG foi injetada em todos os animais no tempo "zero". As setas indicam os momentos de aplicação do USt. O grupo US+ (azul) recebeu as aplicações de USt com o aparelho ajustado com os seguintes valores: frequência da onda de 1MHz; frequência de repetição do pulso de 100Hz, relação pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², duração 2 min. O grupo US- (verde) recebeu massagem com o cabeçote do aparelho desligado. No grupo GEL (linha vermelha) foi feita apenas a aplicação do gel de contato. (★) diferença estatística (p<0,05) quando comparado ao valor basal. (●) diferença estatística (p<0,05) quando comparado ao valor do grupo GEL, no tempo em questão. ANOVA seguido de teste Dunnett.

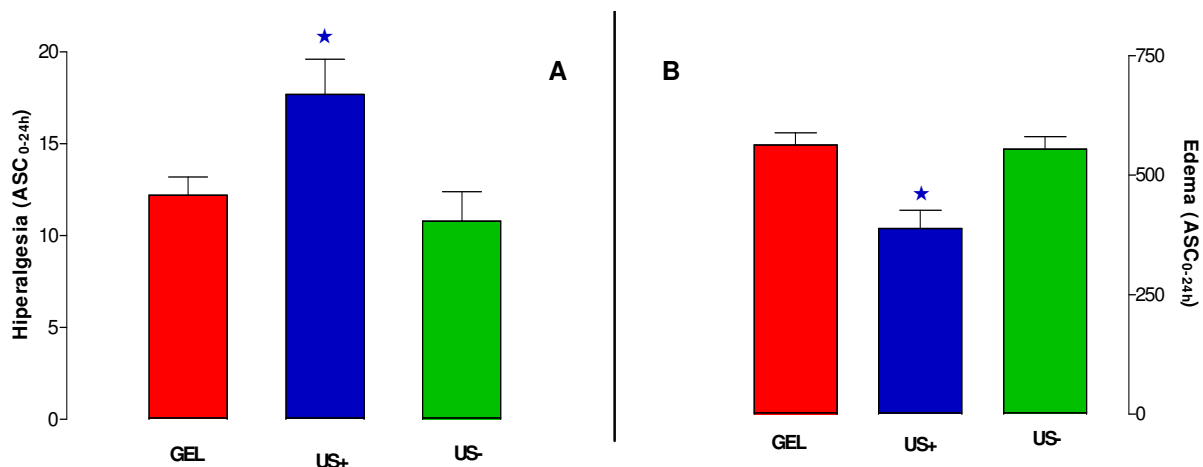


Figura 20: Variações induzidas por três aplicações ("zero", 2 e 4 hs pós-CG) de USt modo pulsado sobre os valores da Área Sob a Curva (ASC) de desenvolvimento temporal da hiperalgesia térmica (Painel A) e do edema (Painel B) induzidos pela injeção i.pl. de CG (500 µg/pata). As barras representam a média ± E.P.M. da ASC dos seis animais de cada grupo. Os animais do grupo GEL (barra vermelha) receberam apenas o gel de contato. Os grupos US+ e US- receberam massagem com o cabeçote do aparelho de US ligado ou desligado, respectivamente. (★) $p < 0,05$, one way ANOVA.

Conforme evidenciado na Figura 18 a aplicação do ultra-som pulsado nos tempos descritos reduziu a intensidade da hiperalgesia térmica induzida pela injeção i.pl. de CG. O aumento no tempo de permanência pode ser observada já na 4^a hora pós-CG (GEL= $5,9 \pm 0,5$; US+= $11,5 \pm 2,0$ s). O efeito anti-nociceptivo não pode ser atribuído à massagem da região inflamada com o cabeçote do aparelho, uma vez que não foram observadas diferenças entre grupo GEL e o US- (GEL= $5,9 \pm 0,5$; US- = $5,1 \pm 1,2$ s). Além deste efeito anti-hiperalgésico a aplicação do USt pulsado determinou um efeito tardio de hiponocicepção, evidenciado na 24^a hora pós-CG, onde o valor do Tempo de Permanência do grupo US+ ($28,8 \pm 5,5$ s) foi significativamente maior que o valor basal correspondente ($16 \pm 0,7$ s). Os valores obtidos na 48^a hora para os três grupos indiferem entre si e do valor basal, indicando que, tanto a hiperalgesia induzida pela CG quanto a hiponocicepção determinada pela aplicação do USt pulsado são fenômenos reversíveis.

A aplicação do ultra-som pulsado reduziu também o edema causado pela injeção i.pl. de CG (Figura 19). Este efeito antiedematogênico foi evidente em todos os tempos

estudados, com exceção da 48^a hora, quando se igualaram os volumes das patas dos animais de todos os três grupos. Também o efeito antiedematogênico não pode ser atribuído à simples massagem do aparelho, uma vez que não observamos diferenças entre os grupos GEL e US- (Figura 20).

2.6.6. Efeito do USt pulsado sobre o limiar de resposta de uma pata normal

A aplicação do USt pulsado, com os mesmos parâmetros que determinaram redução da hiperalgesia térmica induzida pela CG e hiponocicepção tardia, não alterou o Tempo de Permanência na PQ em ausência de resposta inflamatória.

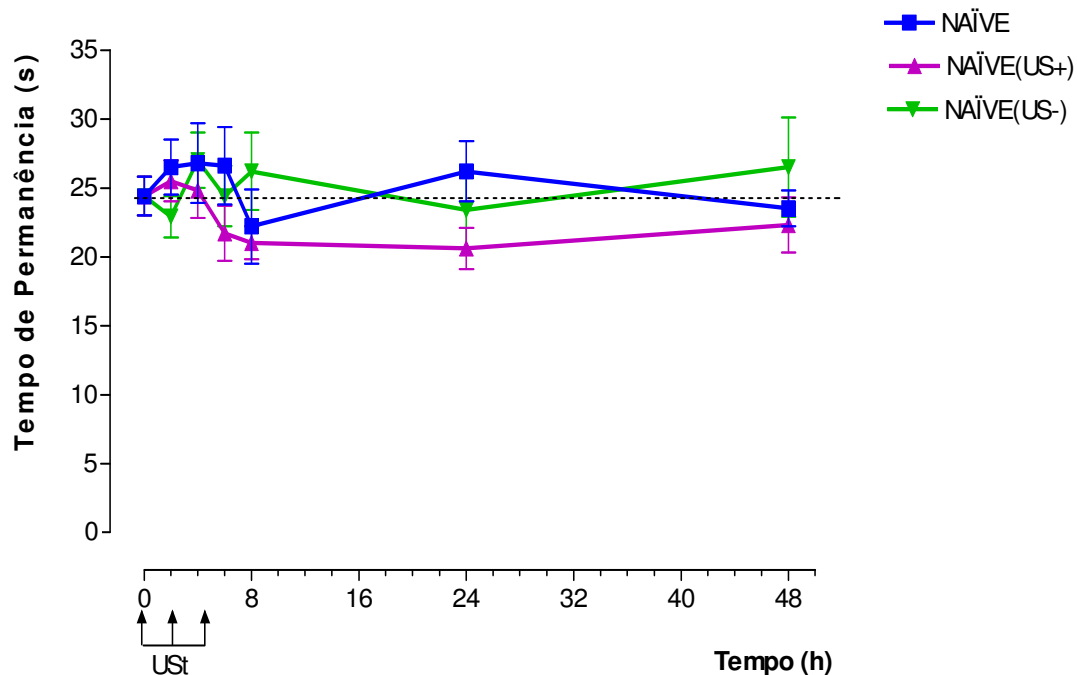


Figura 21: Efeito da aplicação do USt no modo pulsado sobre o Tempo de Permanência (s) na PQ a temperatura constante de 48° C, em patas normais. Nenhum dos animais foi submetido a qualquer procedimento prévio. No Grupo NAÏVE (azul) foram feitas apenas as medidas de tempo de permanência na PQ. As setas indicam o momento em que os grupos US+ (lilás) e US- (verde) receberam massagem com o cabeçote do Ultra-som, estando aparelho ligado ou desligado, respectivamente. Parâmetros utilizados: frequência da onda de 1MHz; frequência de repetição do pulso de 100 Hz, relação pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², duração 2 min. Não houve diferença estatística entre os grupos ou entre as unidade de tempo ($p > 0,05$, ANOVA).

2.6.7. Comparar a eficácia antinociceptiva e antiedematogênica do USt nos modos pulsado e contínuo.

Com os dados da hiperalgesia térmica foram construídas curvas do Tempo de Permanência (s) em função do tempo pós-CG, sendo cada ponto representado pela média \pm E.P.M. Os dados referentes às variações do volume da pata foram apresentados em curvas de edema ($\Delta\mu$ l) em função do tempo pós-CG, pela média \pm EPM dos grupos. Adicionalmente, foi construído um histograma comparando a média \pm EPM dos valores das ASC de cada grupo, para facilitar a visualização das diferenças nos efeitos causados pelas duas modalidades do USt.

Conforme pode ser observado nas Figuras 14 e 15, o USt pulsado causou antinocicepção nas primeiras horas e hiponocicepção na 24^a hora, além de ter reduzido o edema em todos os tempos avaliados. Já o USt contínuo não causou modificações, sendo os resultados indistinguíveis do grupo CONTROLE. Além disto, durante as insonações com USt modo contínuo os animais ficaram agitados e vocalizaram; este comportamento não foi observado em nenhum dos experimentos com o USt pulsado.

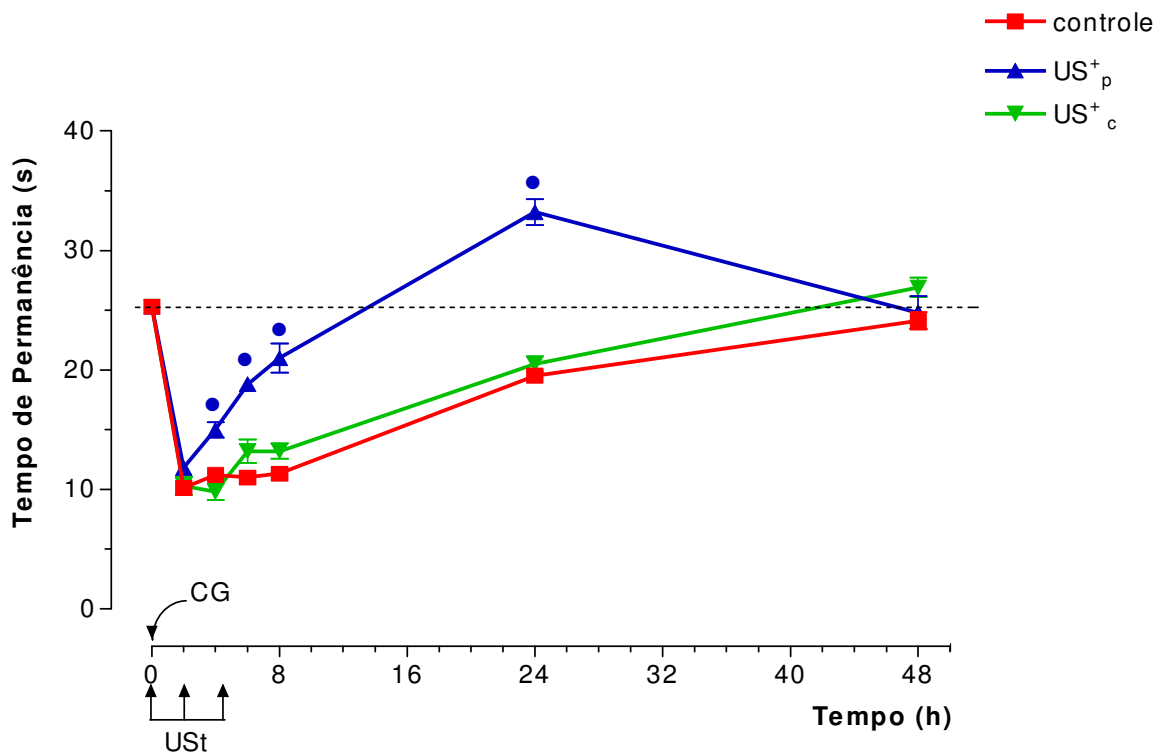


Figura 22: Comparação do efeito do USt modo pulsado ou contínuo sobre a hiperalgesia térmica induzida pela injeção intraplantar de CG (1%, 50 μ l/pata). No grupo controle (vermelho) os animais receberam somente a injeção i.pl. de CG. No grupo US⁺_p (azul) os animais receberam aplicação do USt no modo pulsado (ERA 1 cm², frequência da onda de 1 MHz; frequência de repetição do pulso de 100 Hz, relação pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², duração da aplicação 2 min.), enquanto no grupo US⁺_c (verde) os animais receberam aplicação do US modo contínuo (ERA 1 cm², frequência da onda de 1 MHz; intensidade de 0,5 W/cm², tempo de aplicação 2 min). As setas indicam o momento das aplicações do USt. (•) diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado com o ponto correspondente do grupo controle (ANOVA seguido de teste Dunnett).

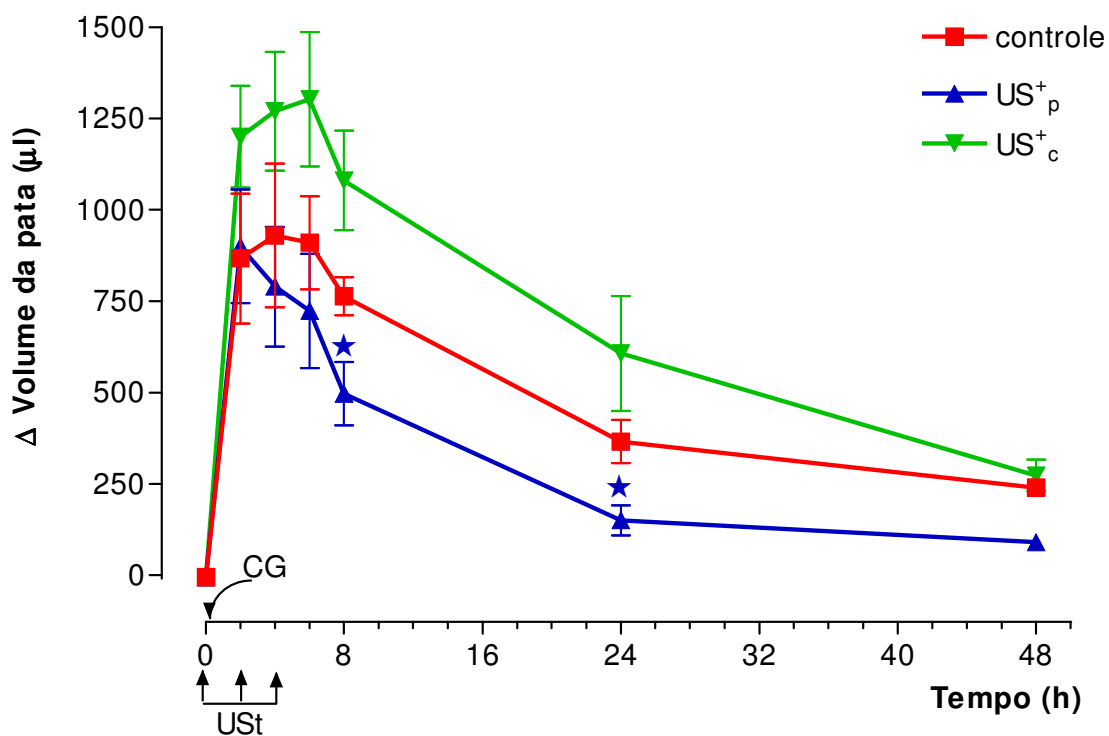


Figura 23: Avaliação do efeito do USt modo contínuo sobre o edema induzido pela injeção intraplantar de CG (1%,50μl/pata). No grupo controle (vermelha) os animais receberam somente a injeção i.pl.de CG na pata posterior esquerda. No grupo US⁺_p (azul) os animais receberam aplicação do USt (ERA 1 cm², freqüência da onda 1 MHz; 100 Hz, pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², tempo de aplicação 2 min), nos tempos "zero", 2 e 4 horas. No grupo US⁺_c (verde) os animais receberam aplicação do USt modo contínuo (ERA 1 cm², freqüência da onda 1 MHz; intensidade de 0,5 W/cm², tempo de aplicação 2 min); aplicado sobre a região plantar, nos tempos "zero", 2 e 4 horas. (★) Representa diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do grupo Controle, p<0,05, one way ANOVA, seguido de teste Dunnett.

2.6.8. Influência da variação de alguns parâmetros da onda (frequência e intensidade) sobre os efeitos antinociceptivos e antiedematogênico do USt modo pulsado

6.2.8.1. Variação da frequência de repetição do pulso

O uso de diferentes frequências de repetição da onda nos valores de 16, 48 e 100 Hz não interferiu na magnitude do efeito antinociceptivo precoce determinado pelo USt. Todavia, o efeito tardio de hiponocicepção, evidenciado na 24^a hora pós-CG, somente foi observado com a utilização da frequência de repetição de 100 Hz. Também o efeito antiedematogênico foi melhor evidenciado com a frequência de 100 Hz (US_{0-24h} = 509,5 ± 63; 16 Hz = 398,2 ± 46,9; 48 Hz = 385,1 ± 38,3; 100 Hz = 298,1 ± 50,8 unidades de ASC_{0-24h}).

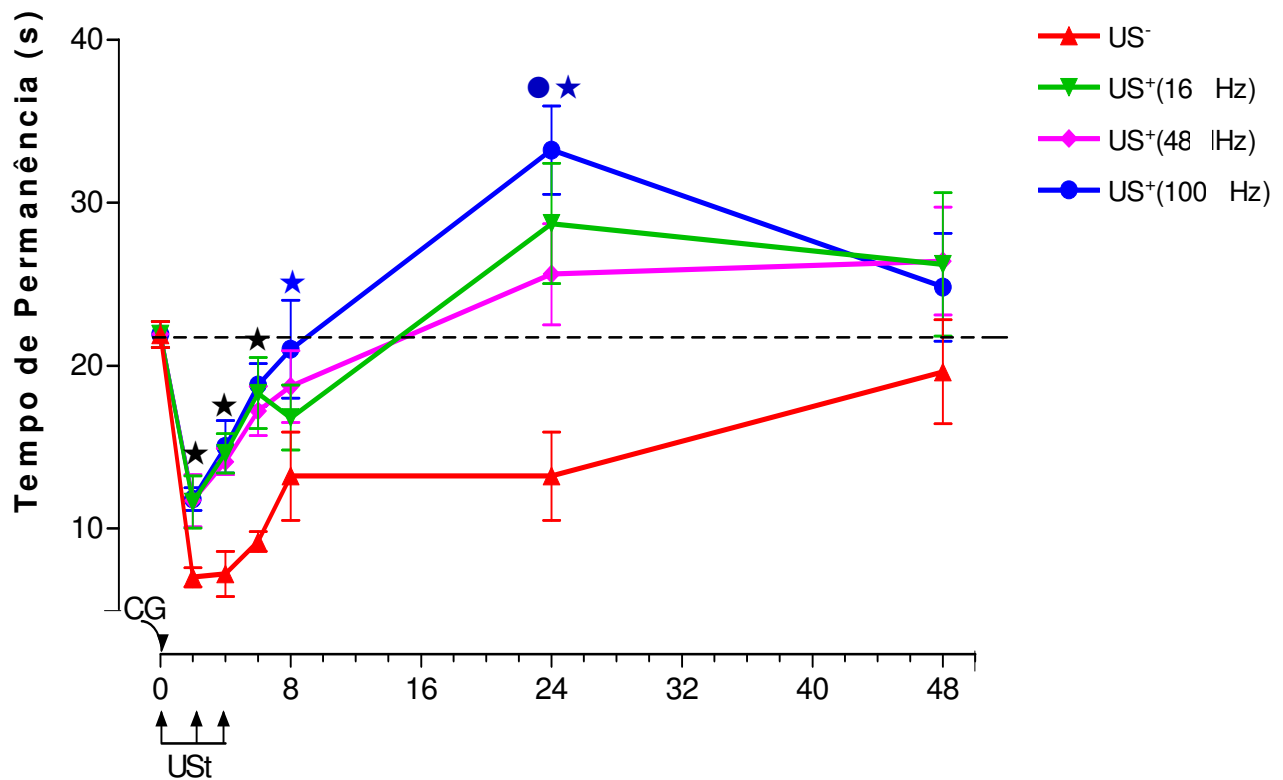


Figura 24: Influência da frequência de repetição do pulso da onda ultrasônica sobre o efeito antinociceptivo determinado pela aplicação do USt pulsado, no quadro de hiperalgesia térmica induzida pela CG (500 µg/pata), em ratos. A aplicação do USt foi feita nos momentos assinalados com as setas, com os seguintes parâmetros: ERA 1 cm², frequência da onda de 1 MHz; pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², tempo de aplicação 2 min e frequência de repetição do pulso variando entre 16 (linha verde), 48 (linha lilás) e 100 Hz (linha azul). O grupo US⁻ recebeu massagem com o cabeçote do aparelho desligado (linha vermelha). (●) representa diferença estatística, quando comparado ao valor basal. (★) diferença estatística quando comparado ao valor correspondente do Grupo US⁻ (p<0,05, ANOVA seguido de teste Dunnett).

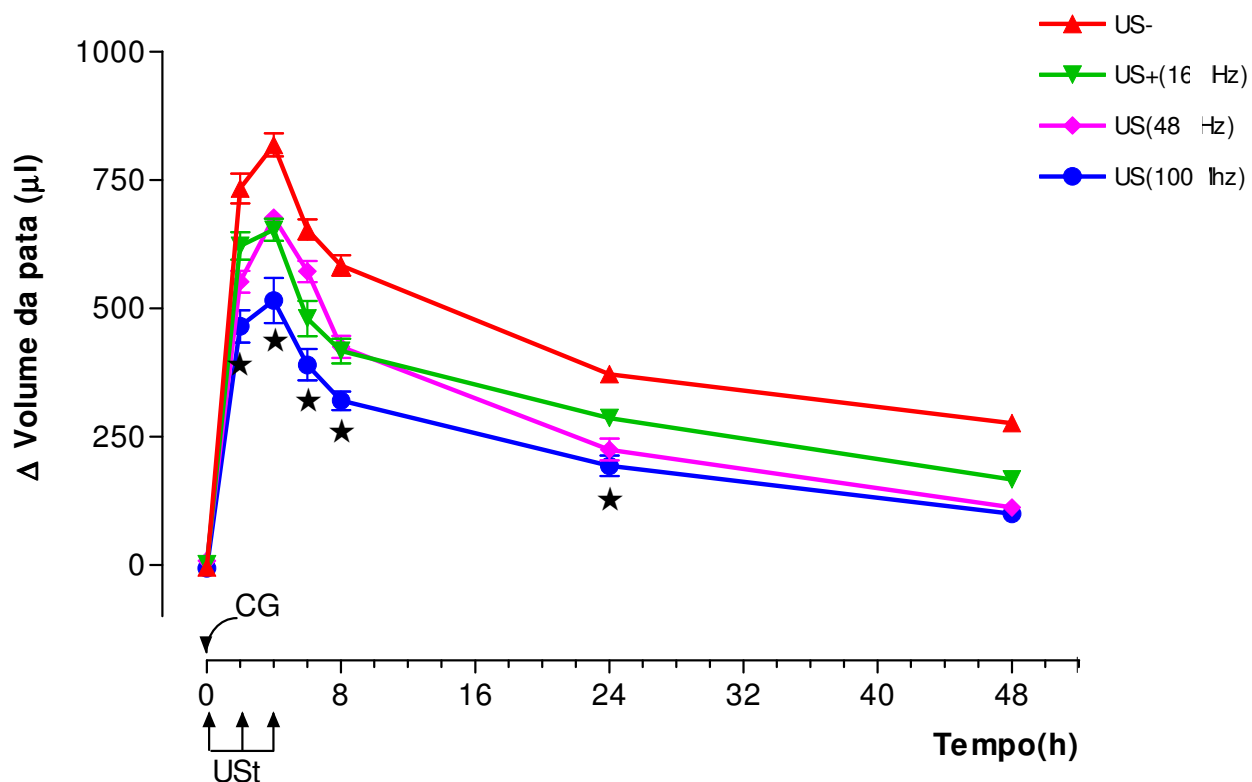


Figura 25: Influência da alteração da frequência de repetição do pulso sobre o efeito antiedematogênico determinado pela aplicação de USt (modo pulsado) na resposta inflamatória aguda induzida pela injeção i.pl. de CG (500 μg/pata), em ratos. A aplicação do USt foi feita nos momentos assinalados com as setas, com os seguintes parâmetros: ERA 1 cm², frequência da onda de 1 MHz; pulso-pausa de 1/5, intensidade de 0,40 W/cm², tempo de aplicação 2 min e frequência de repetição do pulso variando entre 16 (linha verde), 48 (linha lilás) e 100 Hz (linha azul). O grupo US⁻ recebeu massagem com o cabeçote do aparelho desligado (linha vermelha). (★) representa diferença estatística, quando comparado aos valores correspondentes do grupo US⁻. (p<0,05, ANOVA seguido de teste Dunnett).

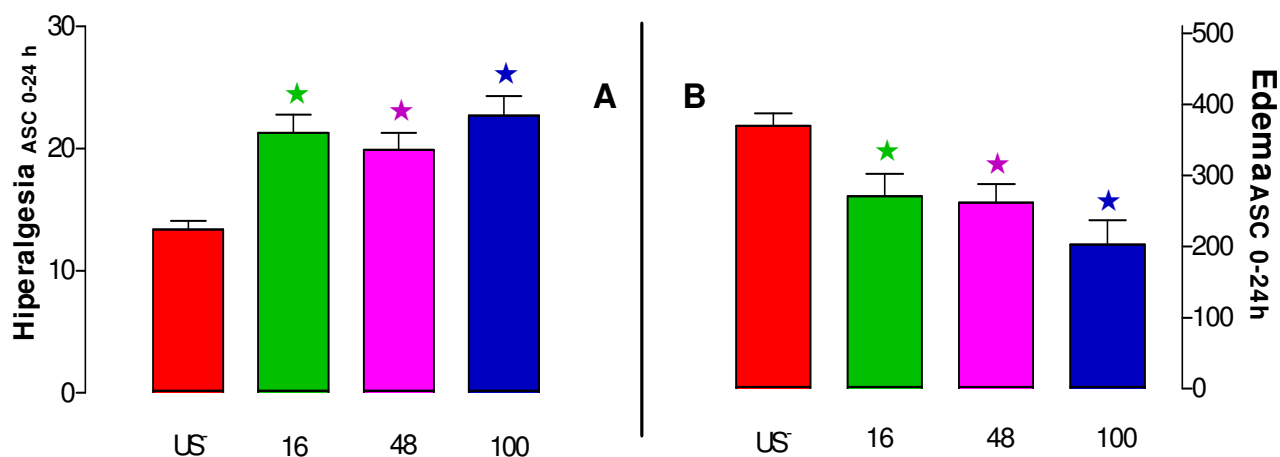


Figura 26: Influência da alteração da freqüência de repetição do pulso determinado pela aplicação de US (modo pulsado) sobre os valores da Área sob a curva (ASC) de desenvolvimento temporal da hiperalgesia térmica (Painel A) e do edema (Painel B) induzidos pela injeção i.pl.de CG (500 µg/pata). As barras representam a média ± E.P.M. da ASC dos seis animais de cada grupo. Os animais US⁻ (US desligado, barra vermelha) receberam apenas a massagem. Os grupos US⁺ 16, 48 ou 100 (Hz) receberam diferentes freqüências de repetição. (•) $p < 0,05$, one way ANOVA.

6.2.8.2. Variação da Intensidade acústica da onda ultrasônica

A magnitude do efeito antinociceptivo foi diretamente proporcional à intensidade acústica da onda do US^t pulsado aplicado sobre a região inflamada para o efeito precoce. O aumento na intensidade prolongou proporcionalmente o tempo de permanência na PQ, à partir de 0,2 W/cm² (US⁻ = 13,4 ± 0,7; 0,2 = 14,7 ± 0,4; 0,3 = 18,3 ± 0,6; 0,4 = 25,5 ± 1,2 unidades de ASC_{0-24h}). Quando foi usada a intensidade de 0,1 W/cm² os resultados foram indistinguíveis do grupo US⁻ (0,1 W/cm² = 14,4 ± 0,7; US⁻ = 13,4 ± 0,7 unidades de ASC₀₋₂₄), razão pela qual este resultado foi omitido do gráfico. A hiponocicepção (efeito tardio, 24^a hora) foi observada apenas quando utilizou-se a intensidade de 0,4 W/cm² (basal = 18,1 ± 2,0; 0,4 = 32,3 ± 1,8 s). Também o efeito antiedematogênico foi proporcional à intensidade acústica, tendo atingido seu valor máximo com a intensidade de 0,3 W/cm² (US⁻ = 644 ± 26; 0,2 = 509 ± 27; 0,3 = 253 ± 23; 0,4 = 332 ± 45 unidades de ASC₀₋₂₄). Quando foi utilizada a intensidade de 0,1 W/cm² os valores do edema foram indistinguíveis daqueles do grupo 0,2 W/cm².

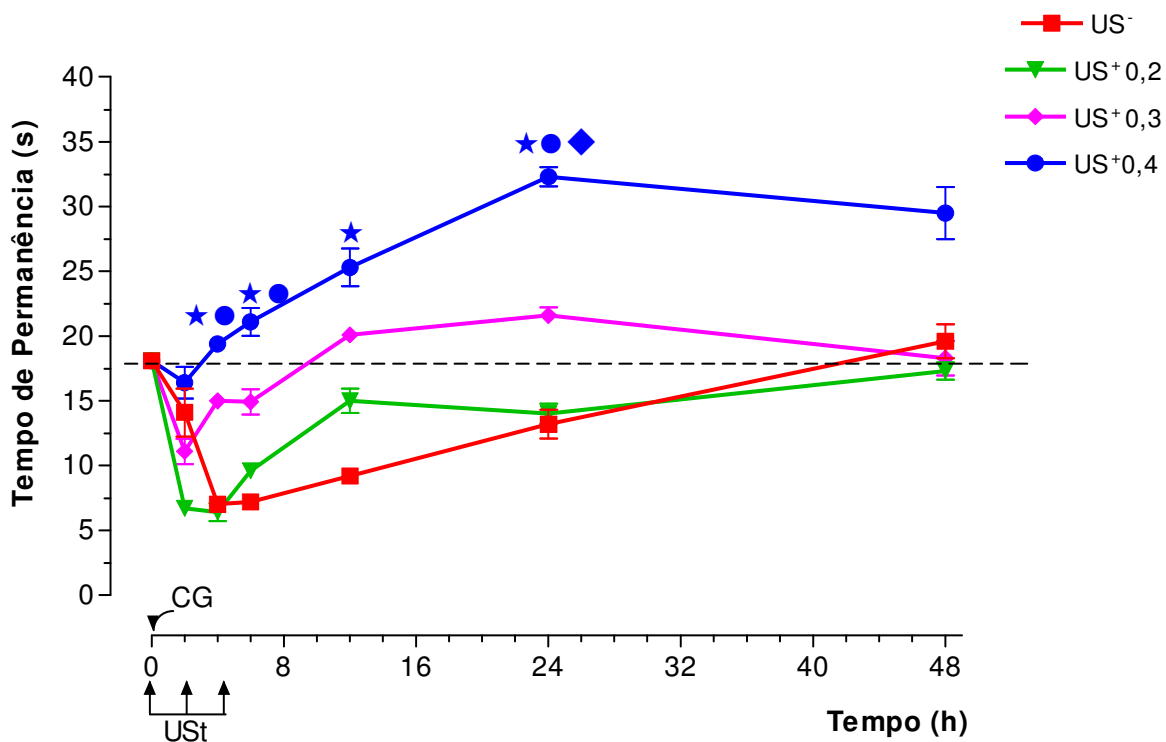


Figura 27: Influência da intensidade acústica da onda ultrasônica sobre o efeito antinociceptivo determinado pela aplicação do USt pulsado, no quadro de hiperalgisia térmica induzida pela CG (500 µg/pata, 1%), em ratos. A aplicação do USt foi feita nos momentos assinalados com as setas, com os seguintes parâmetros: ERA 1 cm²; freqüência da onda de 1MHz; freqüência de repetição do pulso de 100 Hz, relação pulso-pausa de 1:5, tempo de aplicação 2 min e a intensidade (W/cm²) variando entre 0,2 (linha verde); 0,3 (linha lilás) ou 0,4 W/cm² (linha azul),. O grupo US⁻ recebeu massagem com o cabeçote do aparelho desligado (linha vermelha). (●) representa diferença estatística, quando comparado entre os grupos de intensidade acústica 0,3 W/cm². (★) representa diferença estatística, quando comparado com valores correspondentes do grupo US⁻. (◆) representa diferença estatística, quando comparado ao valor basal. (p<0,05, ANOVA seguido de teste Dunnett).

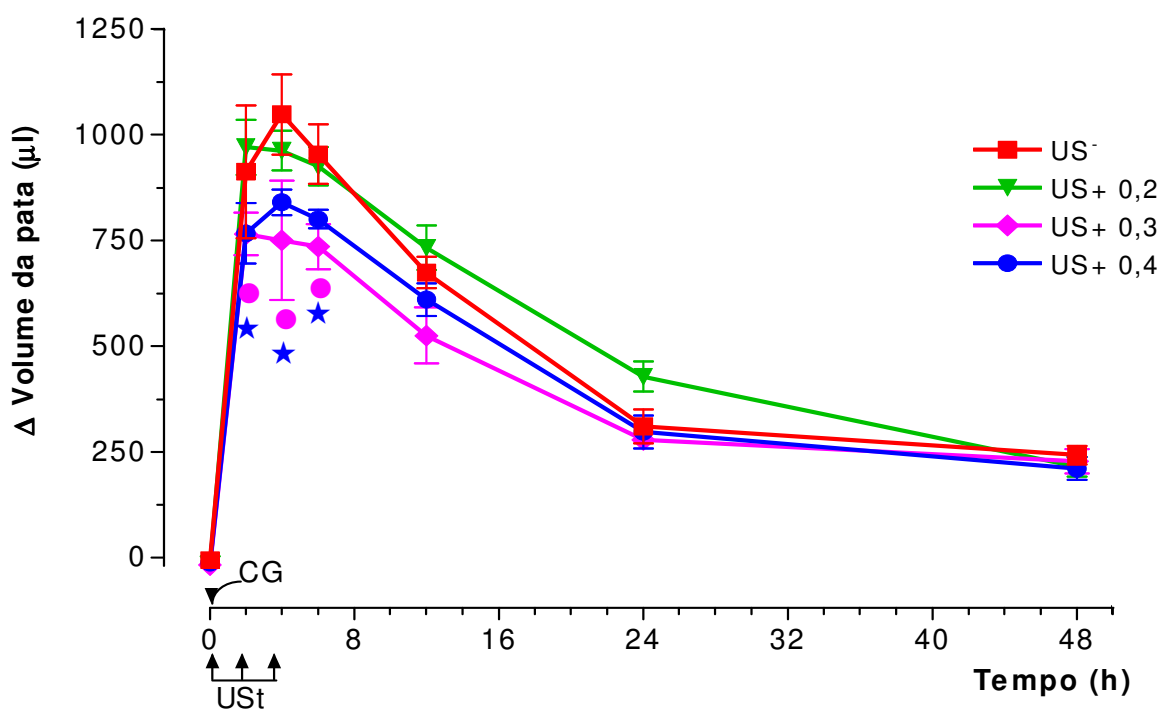


Figura 28: Influência da intensidade acústica sobre o efeito sobre o efeito antiedematogênico do USt pulsado na resposta inflamatória induzida pela injeção i.pl. de CG (500 μg /pata, 1%), em ratos. A aplicação do USt foi feita nos tempos indicados pelas setas, com os seguintes parâmetros: ERA 1 cm^2 , frequência da onda de 1MHz; frequência de repetição do pulso de 100 Hz, relação pulso-pausa de 1:5, tempo de aplicação 2 min e a intensidade (W/cm^2) variando entre 0,2 (linha verde), 0,3 (linha lilás) e 0,4 W/cm^2 (linha azul),. O grupo US⁻ recebeu massagem com o cabeçote do aparelho desligado (linha vermelha). (●) representa diferença estatística ($p < 0,05$) com o grupo US⁻. (★) representa diferença estatística ($p < 0,05$) com o grupo US⁻. (ANOVA seguido de teste Dunnett).

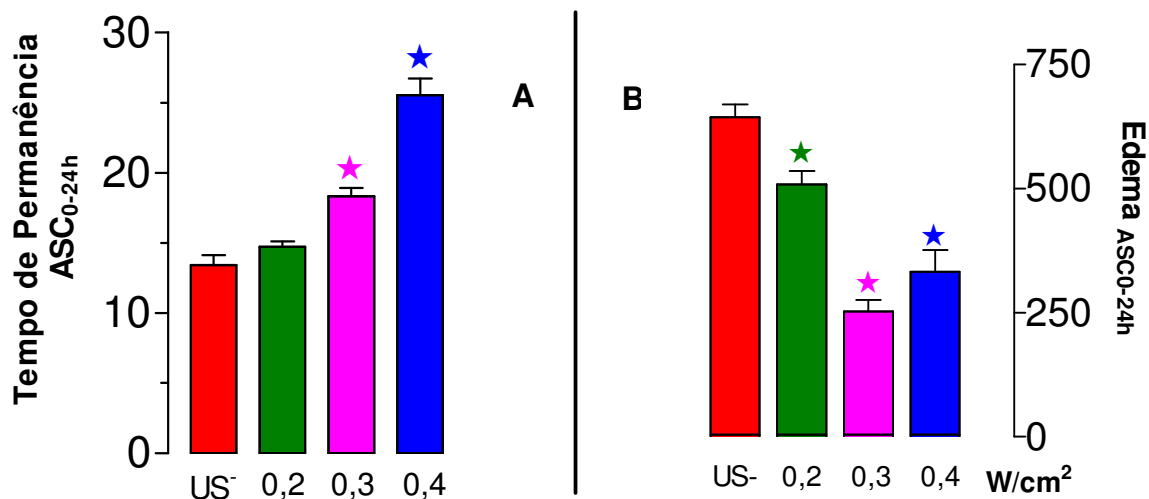


Figura 29: Influência da alteração da intensidade acústica determinado pela aplicação de US (modo pulsado) sobre os valores da Área sob a curva (ASC) de desenvolvimento temporal da hiperalgesia térmica (Painel A) e do edema (Painel B) induzidos pela injeção i.pl.de CG (500 µg/pata). As barras representam a média ± E.P.M. da ASC dos seis animais de cada grupo. Os animais US⁻ (US desligado, barra vermelha) receberam apenas a massagem. Os grupos 0,2, 0,3 e 0,4 (W/cm²) receberam diferentes intensidades da onda. (★) representa diferença estatística quando comparado ao grupo US⁻, (p < 0,05, ANOVA, seguido de teste Dunnett).

2.6.9. Determinação do nível tecidual de citocinas após três aplicações de USt, durante uma resposta inflamatória induzida pela carragenina, em ratos

Conforme evidenciado na Figura 30 as três aplicação do USt pulsado reduziram a liberação de TNF α , além de terem determinado a liberação de IL-10 na pata inflamada. A redução do TNF α foi evidenciada já a partir da 2^a hora pós CG, coincidente com a segunda aplicação deste recurso. O pico máximo desta citocina ocorreu na 24^a hora pós-CG, ou seja, 20 horas após a ultima aplicação do USt, quando em protocolos anteriores (Figura 18) foi evidenciado um efeito hiponociceptivo.

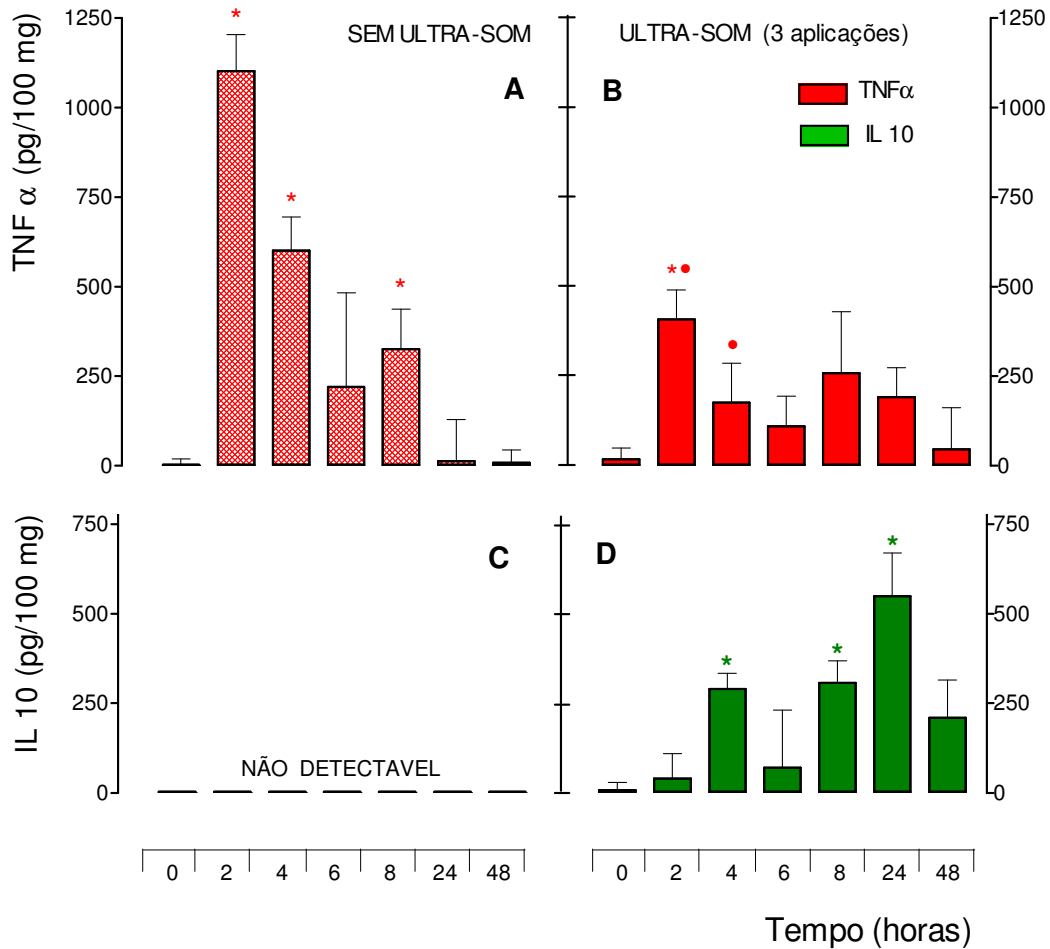


Figura 30: Determinação do efeito do USt pulsado sobre dos níveis tissulares das interleucinas TNF α e IL-10 numa inflamação aguda induzida pela injeção i.pl. de CG, em ratos. Os painéis A e B representam os níveis de TNF α e IL-10, respectivamente, no tecido plantar após a injeção i.pl. de CG. Os painéis C e D representam o desenvolvimento temporal dos níveis das mesmas citocinas após injeção i.pl. de CG, em animais submetidos a três aplicações de USt pulsado. A aplicação de USt determinou a redução da liberação de TNF α com concomitante aumento nos níveis de IL-10. (●) representa diferença estatística, quando comparado ao valor correspondente ao grupo US⁻. (★) diferença estatística quando comparado ao valor basal do grupo em questão ($p < 0,05$, ANOVA seguido de teste Dunnett).

2.6.10. Participação de opióides endógenos no efeito antinociceptivo promovido pela aplicação do USt pulsado na resposta inflamatória induzida pela carragenina.

Conforme mostrado pela Figura 31, o tratamento prévio com a Naloxona (3 mg/Kg; s.c.) não reduziu significativamente o efeito antihiperálgico precoce (6^a hora), causado pelas três aplicações do USt pulsado, embora tenha impedido a manifestação da hipoalgesia tardia (24^a hora) (Figura 18).

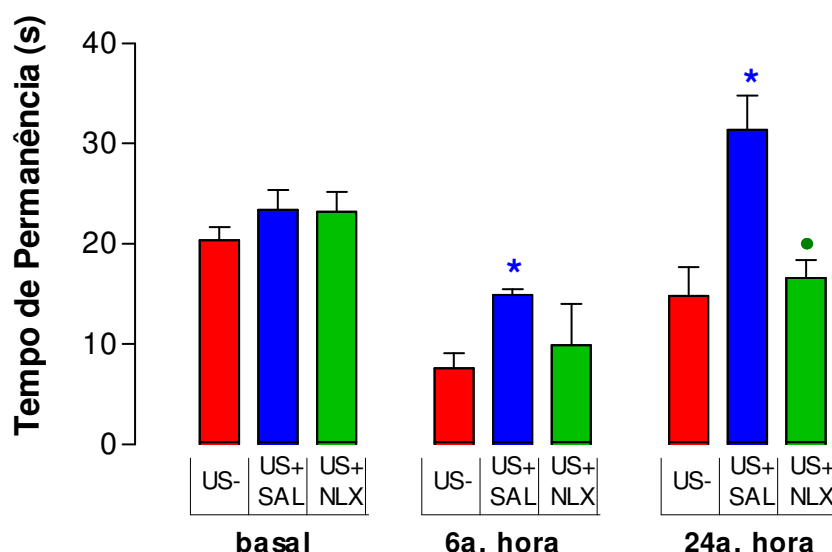


Figura 31: Determinação da participação de opióides endógenos no efeito antinociceptivo promovido pela aplicação do USt pulsado na resposta inflamatória induzida pela carragenina, em ratos. Todos os grupos receberam uma injeção i.pl.de CG (500 µg/pata) na pata posterior esquerda, no tempo "zero". O grupo US- (vermelho) receberam massagem com o cabeçote do USt por um período de 2 minutos. Os grupos US+/SAL e US+/NLX receberam trinta minutos antes da injeção de CG e trinta minutos antes da medida da 24^a hora, uma injeção de Veículo (SAL; s.c.) (azul) ou de Naloxona (3 mg/Kg; s.c.) (verde). Os Grupos US+/SAL E US+/NLX receberam três aplicações de USt, conforme especificado, aplicado nos tempos "zero", 2 e 4 horas. A hiperálgia térmica foi avaliada nos tempos basal, 6 e 24 horas após injeção de CG. (●) representa diferença estatística, quando comparado ao grupo US+/SAL. (★) diferença estatística quando comparado aos valores basais. (p<0,05, ANOVA seguido de teste Dunnett).

7 DISCUSSÃO

Várias lacunas metodológicas são necessariamente introduzidas em testes com humanos. A análise da efetividade das intervenções de reabilitação são realizadas com uma variedade de métodos e em situações clínicas tão diversas que dificultam a validação, comparação e confiabilidade dos resultados. Entretanto, é a análise de resultados padronizados que pode auxiliar na busca de evidências sobre a eficácia de intervenções terapêuticas.

De acordo com o Panel Philadelphia (2001c), o controle de variáveis tais como o completo cegamento do indivíduo é difícil de ser obtida em estudos de intervenção em humanos, porque estímulos sensoriais diversos podem representar as diferenças entre os grupos tratados e o placebo. Outro fator de variações é a ocorrência de grande heterogeneidade clínica, tais como idade, gênero, estágio da doença e nível de dor. Características diferentes e diversos parâmetros de aplicação também podem interferir na magnitude do efeito determinado por recursos fisioterapêuticos do tipo USt.

Os estudos experimentais realizados para estimular a compreensão sobre a eficácia do USt no processo inflamatório agudo utilizam uma grande variedade de indicações e parâmetros do equipamento (PANEL PHILADELPHIA, 2001 a, b, d). Desta multiplicidade de variáveis originam-se as dificuldades para a validação deste recurso, e conseqüentemente, contribui para o empirismo encontrado na prática clínica onde a indicação e parâmetros são selecionados por meio de critérios do terapeuta mais que por evidências científicas. Por este motivo, temos uma situação onde os efeitos benéficos do USt no alívio da dor e controle dos processos inflamatórios são bem aceitos na prática, porém, encontramos na literatura uma discrepância entre os resultados dos estudos, não havendo evidências definitivas de que o USt tenha um papel efetivo nestas desordens (BABHTIARY e RASHIDY-POUR, 2004; HARRIS e SUSMAN, 2002).

Uma vez que se encontra entre nossos objetivos estabelecer a eficácia do uso do USt e determinar a influência de alguns de seus parâmetros de aplicação, baseados em evidências científicas advindas da observação experimental, o presente estudo foi

desenvolvido em modelo animal, objetivando o maior controle das variáveis e a redução da subjetividade advinda do efeito placebo, favorecendo assim a validade interna do estudo. Embora a escolha de um modelo animal determine perdas para a validade externa, a relação custo-benefício em favor da validade interna compensa estes prejuízos, pelo menos na determinação inicial da efetividade, indicações clínicas e análise do mecanismo de ação.

Assim sendo, o presente estudo foi elaborado para investigar os efeitos do USt modo pulsado sobre o quadro inflamatório agudo induzido pela injeção i.pl. de CG, em ratos. É importante frisar que tanto o equipamento utilizado quanto os parâmetros são compatíveis com os usados na clínica, já que a intenção é que estes resultados possam contribuir para o embasamento científico de protocolos mais eficazes, em humanos.

Nossos resultados ratificam estudos que qualificam o método da Placa Quente como um teste capaz de detectar e quantificar os efeitos de analgésicos de drogas opioidérgicas e não-opioidérgicas (EDDY e cols., 1950; TJØLSEN e cols., 1991) (Figuras 16 e 17). As temperaturas da PQ inferiores a 50 °C elevam a variabilidade da medida devido ao aumento no tempo de latência. Em contrapartida, esta elevação permite uma melhor caracterização da resposta e uma redução da possibilidade de ocorrer lesão do tecido plantar, isto aumenta a confiabilidade e compensando a variabilidade (MENÉNDEZ e cols., 2002; LAVICH e cols., 2005).

A metodologia escolhida mostrou-se reproduzível e capaz de detectar variações induzidas pelo pré-tratamento com DAINES ou analgésicos opióides (Figura 16 e 17) estando de acordo com o padrão de resposta relatado na literatura. Além disto, observamos que o número de medidas realizadas não interfere com o tempo de permanência na PQ (Figura 15), além de não ocorrerem modificações nos valores de patas normais (sem injeção de CG) (Figura 13), afastando a possibilidade de que ocorra aprendizado da resposta ou de que a repetição do estímulo térmico cause lesões tissulares capazes de alterar a resposta. O padrão das respostas hiperalgésica e edematogênica induzidas pela dose escolhida de CG (500 µg/pata) foram consistentes em todos os experimentos realizados. A vantagem do uso desta dose é que ela, por si só, não induziu postura antálgica nos animais, o que inviabilizaria o teste da PQ-modificado.

A aplicação do USt modo pulsado causou uma redução na hiperalgisia térmica e no edema induzidos pela CG (Figuras 18, 19 e 20). O efeito antinociceptivo foi evidenciado já a partir da segunda aplicação do USt e permanece até a 24^a hora pelo menos. No início, esta resposta manifestou-se pelo aumento do tempo de permanência na PQ, que havia sido reduzido pela injeção de CG, indicando um efeito antihiperalgésico precoce. Todavia, na 24^a hora, o grupo que recebeu aplicações com USt ligado (US+) apresentou limiar de resposta superior ao valor basal (pré CG), num efeito que denominamos hiponocicepção tardia (Figura 18). Nenhum dos outros grupos (GEL, CONT ou US-) apresentou este efeito.

Os efeitos antinociceptivo ou antiedematogênico decorreram exclusivamente da insonação tecidual, desde que nem a massagem com o cabeçote do aparelho desligado (US-) nem a aplicação do gel de contacto (GEL) foram capazes de modificar estes parâmetros. É interessante salientar que o efeito do USt só se manifestou em presença de uma resposta inflamatória (Figura 21), uma vez que o recurso foi incapaz de alterar o limiar de patas normais.

Citocinas constituem uma ligação entre a injúria celular e o desenvolvimento de sinais e sintomas locais ou sistêmicos da inflamação (DINARELLO e cols., 1986; FERREIRA e cols., 1988; FACCIOLI e cols., 1990). Neste contexto, foi demonstrado em um modelo de hiperalgisia mecânica que a CG induziu uma resposta derivada da liberação combinada de produtos da ciclooxigenase e aminas simpaticomiméticas (NAKAMURA e FERREIRA, 1987). Uma cascata de citocinas precede a geração destes mediadores. Tanto a CG quanto o lipopolissacarídeo bacteriano causam liberação de bradicinina, que estimula a liberação de TNF α . Por sua vez o TNF α induz a liberação de IL-1 e IL-6, que estimulam a produção de produtos da COX e de IL-8 que libera mediadores simpaticomiméticos (CUNHA e cols., 1991, 1992; FERREIRA e cols., 1993). Esta seqüência de eventos foi confirmada em outros modelos experimentais. Por exemplo, as contorções abdominais induzidas pela injeção i.p. de ácido acético ou zimosa, em camundongos, também são mediadas por produtos da COX e aminas simpaticomiméticas, cuja liberação é iniciada pelo TNF α e IL-8 (DUARTE e cols., 1988). Estas citocinas parecem ser liberadas, inicialmente, pelos macrófagos peritoneais residentes e mastócitos, uma vez que a depleção destas células da cavidade abdominal de camundongos aboliu a resposta de

contorção induzida pelo ácido acético ou pelo zimosam; além disto, o aumento no número destas células na cavidade peritoneal aumentou o número de contorção induzidos por ambos os estímulos (RIBEIRO e col., 2000).

A observação de que o USt pulsado reduziu a liberação de TNF α (Figura 30) parece indicar que, pelo menos parte de seus efeitos possa ser decorrente da redução indireta que isto causaria sobre os níveis de eicosanóides derivados da via da ciclooxigenase.

A aplicação do USt modo pulsado reduziu também o edema induzido pela injeção i.pl de CG. Este efeito evidenciado em todos os tempos estudados, com exceção da 48^a hora, quando os volumes das patas se aproximavam dos valores obtidos no tempo basal (Figura 19). A magnitude da redução do volume da pata foi influenciada pela freqüência de repetição da onda (Figuras 25 e 26) e pela intensidade acústica (Figuras 28 e 29).

Segundo Di Rosa e cols. (1972) é possível reconhecermos três fases distintas na mediação química da resposta inflamatória induzida pela injeção i.pl. de CG, em ratos. A primeira fase, mediada pela Histamina e pela Serotonina, é seguida rapidamente por uma segunda fase, onde o principal mediador é o nonapeptídeo endógeno Bradicina. A fase final é atribuída à produção local de prostaglandinas. Esta proposta encontra respaldo no fato de que antagonistas de receptores cininérgicos (MIZOGUCHI e cols., 2002; O'GARRA e cols., 2004) mostraram-se capazes de modificar a fase inicial da resposta edematogênica à CG, enquanto que os DAINEs, como a indometacina, inibem preferencialmente a fase mais tardia (MORRIS, 2003).

Assim, o edema inflamatório ocorre devido a liberação inicial de substâncias como a Histamina, a Serotonina e a Bradicina que, embora também possam causar dilatação arteriolar, tem como ação principal a indução de aumento da permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de macromoléculas protéicas do plasma para o interstício.

Este extravasamento plasmático se faz acompanhar, oncoticamente, pela saída de água. A atividade edematogênica destes mediadores pode ser potencializada pela ação concomitante de prostaglandinas vasodilatadoras, como PGE₂ e a PGI₂ (WILLIAMS, 1979, 1982). Desta forma, antiinflamatórios não esteroidais como a Indometacina, que diminuem a produção de prostaglandinas por inibirem a COX, retiram a potenciação exercida pelo

efeito vasodilatador destes mediadores lipídicos e reduzem o edema inflamatório (SMITH e cols., 2000; MORRIS, 2003).

Considerando o papel das citocinas proinflamatórias na liberação das PGs citadas anteriormente (CUNHA e cols., 1999a), é possível que o efeito antiedematogênico observado pela aplicação do USt pulsado decorra, pelo menos em parte, da sua capacidade de reduzir os níveis de TNF α (Figura 30).

A potenciação de edema derivada da interação entre mediadores que causam aumento de permeabilidade e os que causam vasodilatação constitui a base da hipótese do segundo mediador, proposta por Williams (1979). Esta hipótese sustenta que vários agentes vasodilatadores embora incapazes de induzir edema por si só, possuem a capacidade de potenciar o processo induzido por outros agentes (WILLIAMS, 1982; TAM e BRAIN, 2004).

A aplicação do USt, tanto no modo contínuo (CURRIER e cols., 1978; ROBINSON e BUONNO, 1995; DRAPER e cols., 1998; GALLO e cols., 2004) quanto pulsado (GALLO e cols., 2004) leva a um certo grau de aumento na temperatura no tecido insonado. Este aumento da temperatura tecidual pode causar vasodilatação localizada (CHARKOUDIAN, 2003) por mecanismos que independem da mediação histaminérgica (WONG e cols., 2006), colinérgica muscarínica ou de prostanoídes (GOLAY e cols., 2004), parecendo envolver aumento da liberação local de Óxido Nítrico e da atividade de fibras sensoriais (MAGERL e TREEDE, 1996; CHARKOUDIAN, 2003).

Desta forma, esperar-se-ia que o USt tivesse um efeito potenciador sobre o edema inflamatório, se tomássemos por base apenas o efeito esperado da vasodilatação induzida pelos efeitos térmicos deste recurso. Assim, o efeito antiedematogênico que observamos não parece derivar de efeitos térmicos. Confirmando esta hipótese está a observação de que quando utilizamos o USt contínuo, modalidade capaz de causar efeitos térmicos mais intensos, não observamos qualquer redução no edema inflamatório (Figura 23).

Todavia, Reher e cols.(2002) reportaram que o emprego do USt poderia resultar em um aumento na síntese de PGE₂ e NO por monócitos, fibroblastos e osteoclastos humanos. Esta aparente incongruência com nossos resultados pode derivar do fato de que estes autores utilizaram o USt em modo contínuo. Realmente, verificamos que o emprego desta modalidade de USt foi incapaz de determinar os efeitos antinociceptivos e antiedematogênicos observados com o modo pulsado (Figura 22 e 23). Seria interessante realizar a dosagem de citocinas também após o uso do USt contínuo, para verificar se ocorrem as alterações observadas ou se estas são restritas ao modo pulsado.

Nascimento e cols. (2005) verificaram que ratos submetidos à depleção de glutamina apresentavam aumento da resposta edematogênica à CG, embora a resposta à Dextrana permanecesse inalterada. Estes autores atribuíram a exacerbação da resposta ao aumento nos níveis de TNF α e IL-1 observado nos animais depletados. Estes resultados indicam que as citocinas proinflamatórias mencionadas não devem participar significativamente da indução do edema causado pela Dextrana. Confirmando esta proposta, o edema induzido pela Dextrana é insensível ao tratamento com Indometacina (LO e cols., 1982).

Nosso grupo verificou que a aplicação do USt pulsado foi incapaz de reduzir o edema induzido pela Dextrana em ratos (dados não apresentados) reforçando a idéia de que USt pulsado deve ser eficaz apenas em situações onde as citocinas proinflamatórias e/ou os mediadores por elas liberados desempenham papel importante. Esta hipótese é respaldada pela incapacidade do USt em modificar o limiar de resposta de patas normais (Figura 21).

Foi demonstrado que a administração de IL-10 exógena inibe a hiperalgesia mecânica induzida pela CG (POOLE e cols., 1995; CUNHA e cols., 2000; FRODE e cols., 2002), sendo igualmente ativa em vários outros modelos experimentais de inflamação e dor (PERSON e cols., 1996; TANAKA e cols., 1996; PHUNKETT e cols., 2001; VALE e cols., 2003). Esta citocina antiinflamatória foi descrita em 1990 utilizando experimentos que poderiam suprimir a atividade das células T (FIORENTINO e cols., 1989; MOORE e cols., 1990). Logo em seguida demonstrou-se que a IL-10 agia indiretamente, via células de antígenos, para bloquear funcionamento das células (FIORENTINO e cols., 1991), além

de possuir capacidade de bloquear citocinas, quimicinas e produção de NO derivados da atividade de macrófagos ativados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (BOGDAN e cols., 1991; DE WAAL-MALEFYT e cols., 1991).

A via da IL-10 é essencial para a modulação da resposta inflamatória e não há outro fator que possa compensar a sua perda. Estudos genéticos usando ratos com deficiência de IL-10 estabeleceram a importância inequívoca desta citocina no controle da inflamação crônica desencadeada e mantida por outras citocinas pró-inflamatórias (MOORE e DE WAAL-MALEFYT, 2001). Na resposta inflamatória aguda, a rápida produção de IL-10 por macrófagos (FIORENTINO e cols., 1991) age como um importante evento regulador da resposta precoce à patógenos (MIZOGUCHI e cols., 2002; O'GARRA e cols., 2004), assim, quando ratos com deficiência de IL-10 são infectados por patógenos o animal morre em decorrência de uma resposta inflamatória sistêmica maciça (HUNTER e cols., 1997). Em ratos com deficiência de IL-10 são observadas alterações sistêmicas causadas pelo LPS (BERG e cols., 1995; HOWARD e cols., 1993), ao passo que os animais com super-expressão de IL-10 apresentam redução esta resposta (LANG e cols., 2002).

A IL-10 é produzida por vários tipos de células, incluindo alguns tipos de linfócitos, monócitos, macrófagos e mastócitos (FIORENTINO e cols., 1989). Acredita-se que suas funções envolvam desde a inibição das reações de hipersensibilidade (HOWARD e O'GARRA, 1992), a supressão da atividade de macrófagos (DE WAAL-MALEFYT e cols., 1991), e a adesão celular (FIORENTINO e cols., 1991), e até o controle da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de COX-2 e iNOS (BOGDAN e cols., 1991; DE WAAL-MALEFYT e cols., 1991; FIORENTINO e cols., 1991; OSWALD e cols., 1992; CUNHA e cols., 1992; NIRO e cols., 1995, 1997).

No presente trabalho demonstramos que a aplicação local do USt pulsado foi capaz de determinar o aparecimento de IL-10 na pata inflamada (Figura 30). Este aumento foi evidente desde a primeira avaliação (2^a hora) até a última (48^a hora) sendo máximo na 24^a hora.

Existem várias evidências de que o USt pulsado, aplicado com parâmetros similares aos usados neste trabalho, pode estimular a produção de citocinas (REHER e cols., 1999; DOAN e cols., 1999; JOHNS e cols., 2003), consubstanciando a hipótese de que, pelo menos parte dos efeitos antiedematogênico e o efeito antinociceptivo precoce do USt pulsado decorrem de um efeito indutor sobre a produção de IL-10, o que estaria associado à redução dos níveis de TNF α .

Torna-se necessário avaliar o efeito do USt sobre os níveis de outras citocinas pró e antiinflamatórias. Além disto, experimentos adicionais usando anticorpos contra estas citocinas, experimentalmente o TNF α , a IL-1 β e IL-10, poderão elucidar a seqüência destes efeitos, além de confirmar os dados obtidos.

Nossos resultados indicam também que o efeito antinociceptivo precoce do USt pulsado parece ser independente da participação de opióides endógenos, uma vez que a administração do antagonista opióide Naloxona não alterou significativamente o efeito antinociceptivo precoce (até a 6^a hora) do Ust pulsado, embora tenha inibido a fase de hiponocicepção tardia (Figura 31).

É interessante notar que, Brack e cols. (2004) propuseram que na fase tardia da inflamação induzida pela injeção de CFA em patas de ratos, monócitos e macrófagos são as principais fontes dos opióides endógenos envolvidos na antinocicepção periférica, ao passo que as células polimorfonucleares (PMN) são a subpopulação envolvida neste efeito na inflamação aguda. Desta forma, na inflamação aguda, a antinocicepção periférica mediada por opióide é parcialmente dependente do recrutamento de PMNs por citocinas e quimiocinas (MACHELSKA e cols., 2003; BRACK e cols., 2004).

Apesar do efeito antinociceptivo do USt pulsado ter sido documentado por vários autores, tanto em humanos (O'CONNOR e cols., 2003; BROSSEAU e cols., 2006) quanto em animais (HSIEH, 2005, 2006), não encontramos relatos na literatura sobre a indução de um efeito hiponociceptivo, provavelmente porque, na maioria dos trabalhos, a avaliação do fenômeno era interrompida antes da 24^a hora ou porque os métodos de avaliação utilizados não permitiam detectar reduções do limiar basal.

Em linhas gerais, um efeito antinociceptivo pode derivar tanto da redução da ativação dos mecanismos e vias proinflamatórias quanto do estímulo das vias descendentes inibitórias ou dos mecanismos de analgesia periférica. Assim, a redução da liberação de TNF α e o aumento nos níveis de IL-10, com a conseqüente redução na liberação de eicosanóides hiperalgésicos, poderia explicar, pelo menos em parte, os efeitos antinociceptivos precoces advindos da aplicação do USt pulsado. Todavia, a simples redução da síntese ou liberação de mediadores hiperalgésicos é insuficiente para explicar a redução do limiar nociceptivo para valores inferiores aos basais. Este efeito hiponociceptivo só pode ser explicado pela exacerbação de vias descendentes inibitórias ou dos mecanismos opioidérgicos de analgesia periférica.

Apesar de não termos observado reversão do efeito antinociceptivo ou da hiponocicepção induzidos pelo Ust pulsado quando foi feita a administração prévia (anterior à CG) de Naloxona, isto não exclui o envolvimento tardio de opióides endógenos, uma vez que a meia-vida deste antagonista opióide é inferior ao período de observação (meia-vida em torno de 2-4 horas; RANG e DALE, 2004).

Foi esta linha de raciocínio que nos levou a testar o efeito da administração subcutânea do antagonista opióide Naloxona meia hora antes da avaliação da 24^a hora após a injeção i.pl. de CG, de forma a verificar seus efeitos na medida realizada na 24^a hora, correspondente ao pico do efeito hipoalgésico.

Conforme esperávamos, a administração de Naloxona no tempo adequado reverteu a hipoalgesia induzida pelo USt pulsado (Figura 31), indicando que algum mecanismo desencadeado pela aplicação do USt estimula a liberação tardia de opióides endógenos.

8. CONCLUSÃO

O USt é um dos muitos agentes eletrofísicos usados por Fisioterapeutas com objetivo de reduzir a incapacidade funcional associada ao processo inflamatório agudo. Na prática clínica o USt vem sendo utilizado para promover o alívio da dor, porém, não possuem evidência científica.

Nossos estudos demonstraram que a aplicação do USt modo pulsado causou uma redução na hiperalgesia térmica e no edema induzidos pela CG, em ratos. O efeito antinociceptivo foi evidenciado a partir da segunda aplicação do USt e permaneceu até a 24^a hora. Além disso, na 24^a hora, o grupo que recebeu as três aplicações apresentou um efeito de hiponocicepção tardia. Os efeitos antinociceptivos e antiedematogênicos foram preferencialmente influenciados pela intensidade acústica.

Face a estes resultados acreditamos que o efeito do USt parece ser específico para determinadas condições onde estejam envolvidas citocinas do tipo TNF α ou que possam ser controladas por um aumento na liberação da IL-10. Mais experimentos esclarecendo seu mecanismo de ação, além da dosagem de citocinas TNF α , a IL-1 β e IL-10 nos modos pulsado e contínuo, poderão elucidar a seqüência destes efeitos para que se possa direcionar a utilização criteriosa deste importante recurso terapêutico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABA-AKBARI SARI, A, FLEMMING, K, CULLUN, NA, WOLLINA, U. therapeutic ultrasound for pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* (2), p.CD001275, 2000.
- BABHTIARY, A H, RASHIDY-POUR,A. Ultrasound and laser therapy in the treatment of carpal tunnel syndrome. *Aust J Physiother* ;50(3):147-151, 2004.
- BAKER, KG, ROBERTSON, VJ, DUCK, FA. A Review of Therapeutic Ultrasound: Biophysical Effects. *Phys Ther.* 81(7), p.1351-1356, 2001.
- BEICHE, F, SCHEUERER, S, BRUNE, K, GEISSLINGER, G, GOPPELT-STRUEBE, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett.*390(2), p.165-169,1996.
- BERG, DJ, KUHN, R, RAJEWSKY, K, MULLER, W, MENON, S, DAVIDSON, N, GRUNIG, G, RENNICK, D. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest.* 96(5), p.2339-2347, 1995.
- BOGDAN, C, VODOVOTZ, Y, NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med.* 174(6), p.1549-1555, 1991.
- BOIE, Y, STOCCO, R, SAWYER, N, SLIPETZ, DM, UNGRIN, MD, NEUSCHAFER-RUBE, F, PUSCHEL, GP, METTERS, KM, ABRAMOVITZ, M. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 340(2-3), p.227-241, 1997.
- BOTTING R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res.* Jun 15;110(5-6), p.269-272, 2003.
- BRACK, A, LABUZ, D, SCHILTZ, A, RITTNER, HL, MACHELSKA ,H, SCHAFFER, M, RESZKA, R, STEIN, C. Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. *Anesthesiology.* 101(1), p.204-211, 2004.
- BRAND JC JR, BRINDLE T, NYLAND J, CABORN DN, JOHNSON DL. Does pulsed low intensity ultrasound allow early return to normal activities when treating stress

fractures? A review of one tarsal navicular and eight tibial stress fractures. *Iowa Orthop J.*; 19, p.26-30, 1999.

BREDER CD, DEWITT D, KRAIG RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain.

J Comp Neurol. May 1;355(2), p.296-315, 1995.

BROSSEAU, L, ROBINSON, V, MILNE, S, JUDD, M, WELL, G, TUGWELL, P, SHEA, B. Therapeutic ultrasound for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* (3): CD003787, 2002.

BROSSEAU, L., CASIMIRO, L, ROBINSON, V, MILNE, S, SHEA, B, JUDD, M, WELLS, G, TUGWELL, P. Therapeutic ultrasound for treating patellofemoral pain syndrome. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006 Issue 2.

BYL, NN, MCKENZIE, AL, WEST, JM, WHITNEY, JD, HUNT, TK, SCHEUENSTUHL, HA. Low-dose Ultrasound Effects on wound Healing: A controlled study with Yucatan Pigs. *Arch Phys Med Rehabil.* 73, p.656-664, 1992.

CAMBIER, D, D'HERDE, K, WITVROUW, E, BECK, M, SOENENS, S, VANDERSTRAETEN, G. Therapeutic Ultrasound: Temperature Increase at Different Depths by Different Modes in a Human Cadaver. *J Rehab Med.* 33, p. 212-215, 2001.

CASIMIRO, L, BROSSEAU, L, ROBINSON, V, MILNE, S, JUDD, M, WELL, G, TUGWELL, P, SHEA, B. Therapeutic ultrasound for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* (3): CD003787, 2002.

CHAN, AK, MYRER, JW, MEASO, MG, DRAPER, DO. Temperature changes in human patellar tendon in response to therapeutic ultrasound. *J Athl Train.* 33, p.130–135, 1998.

CHANG, CJ, HSU, SH. The effects of low-intensity ultrasound on peripheral nerve regeneration in poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits seeded with Schwann cells. *Ultrasound Med Biol.* 30(8), p.1079-1084, 2004.

CHARKOUDIAN, N. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin Proc.* 78 (5), p.603-612, 2003.

COLEMAN, RA, SMITH, WL, NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the

receptors and their subtypes.
Pharmacol Rev. 46(2), p.205-229, 1994.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS. *J Ultrasound Med.* 19, p. 73-76, 2000.

CRAIG, JÁ, WALSH, DM, BAXTER, GD, ALLEN, JM. Delayed onset muscle soreness: lack of Effect of Therapeutic Ultrasound in Humans. *Arch Phys Med Rehabil.* 80, p.318-323, 1999.

CRISCI, AR, FERREIRA, AL. Low-Intensity pulsed Ultrasound accelerates the regeneration of the Sciatic Nerve after Neurotomy in rats. *Ultrasound in Med & Biol.* 28(10), p. 1335-1341, 2002.

CUNHA, F Q, POOLE S, LORENZETTI, B B, FERREIRA, S H, The pivotal role of tumour necrosis factor A in the development of inflammatory hyperalgesia de. *Br J Pharmacol.* 107, p.660-664, 1992.

CUNHA, FQ, LORENZETTI, BB, POOLE, S, FERREIRA, SH. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol.* 104(3), p.765-767, 1991.

CUNHA, FQ, POOLE, S, LORENZETTI, BB, VEIGA, FH, FERREIRA, SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *British Journal of Pharmacology.* 126, p.45–50, 1999a.

CUNHA, FQ, TEIXERA, MM, FERREIRA, SH. Pharmacological modulation of secondary mediator systems \pm cyclic AMP and cyclic GMP \pm on inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology* .127, p.671-678, 1999b.

CUNHA, JM, CUNHA, FQ, POOLE, S, FERREIRA, SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 130(6), p.1418-1424, 2000.

CUNHA, TM, VERRI, WA JR, SILVA, JS, POOLE, S, CUNHA, FQ, FERREIRA, SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(5), p.1755-1760, 2005.

CURRIER, DP., GREATHOUSE, D, SWIFT, T. Sensory nerve conduction: effect of ultrasound. *Arch Phys Med Rehabil.* 59(4), p.181-5, 1978.

- D'VAZ, AP, OSTOR, AJK, SPEED, CA, JENNER, JR, BRADLEY, M, PREVOST, AT, HAZLEMAN, BL. Pulsed low-intensity ultrasound therapy for chronic lateral epicondylitis: a randomized controlled trial. *Rheumatology*. 22, p.1-5, 2005.
- DALECKI, D. Mechanical Bioeffects of Ultrasound. *Annu. Rev Biomed Eng*. 6, p.229-248, 2004.
- DE DEYNE, PG, KIRSCH-VOLDERS, M. In Vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. *Phys Ther*. 75(7), p. 53-56, 1995.
- DE WAAL MALEFYT, R, ABRAMS, J, BENNETT, B, FIGDOR, CG, DE VRIES, JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 174(5), p.1209-1220, 1991.
- DEFINITIONS AND DESCRIPTION OF NONTHERMAL MECHANISMS. *J Ultrasound Med*. 19, p.77-84, 2000.
- DEMMINK JA, HELDERS, PJM, HOBBAEK, H, ENWEMEKA, C. The variation of heating depth with Therapeutic Ultrasound Frequency in Physiotherapy. *Ultrasound in Med & Bio*. 29(1), p.113-118, 2003.
- DINARELLO, CA, CANNON, JG, MIER, JW, BERNHEIM, HA, LOPRESTE, G, LYNN, DL, LOVE, RN, WEBB ,AC, AURON, PE, REUBEN, RC. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. *J Clin Invest*. 77(6), p.1734-1739, 1986.
- DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol*.; 24(2), p.89-102, 1972.
- DOAN, N, REBER, P, MEGHJI, S, HARRIS, M. In Vitro effects of Therapeutic Ultrasound on Cell Proliferation, Protein Synthesis, and Cytokine Production by Human fibroblasts, Osteoblasts and Monocytes. *J Oral Maxil Surg*. 57, p.409-419, 1999.
- DRAPER D O, SCHULTHIES, S, SORVISTO, P, HAUTALA, AM. Temperature changes in deep muscles of humans during ice and ultrasound therapies: an in vivo study. *J Orthop Sports Phys Ther*. 21, p.153–157, 1995.
- DUARTE, ID, NAKAMURA, M, FERREIRA, SH. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Braz J Med Biol Res*. 21 (2), p.341-343, 1988.

- DYSON, M, FRANCK, C, SUCLING, J. Stimulation of healing of varicose ulcers by ultrasound. *Ultrasonics*. sept, p.232-236, 1976.
- DYSON, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. 73, p.116–120, 1987.
- EDDY, NB, LEIMBACH, D: Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther*. 107, p.385-393, 1953.
- EDDY, NB, TOUCHBERRY, CF, LIEBERMAN, JE. Synthetic analgesics I Methadone isomers and derivatives. *Pharmacol Exp Ther*. 98, p.121-137, 1950.
- FACCIOLI, LH, SOUZA, GE, CUNHA, FQ, POOLE, S, FERREIRA, SH. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. *Agents Actions*. 30(3-4), p.344-349, 1990.
- FERREIRA, S H, LORENZETTI, B B, BRISTOW, A F, POOLE, S. Interleukin-1 β as a potent hyperalgesic agent antagonized by tripeptide analogue. *Nature*. 334(25), p.698-700, 1988.
- FERREIRA, S H, LORENZETTI, B B, CUNHA, F Q, POOLE, S. Bradykinin release of TNF- α plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. *Agents Actios*. 38(special conference), 1993.
- FERREIRA, SH, LORENZETTI, BB. Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. *Inflamm Res*. 45(10), p.499-502, 1996.
- FERREIRA, SH. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. *Int J Clin Pract Suppl*. 128, p.:2-10, 2002.
- FIORENTINO, DF, BOND, MW, MOSMANN, TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 170(6), p.2081-2095, 1989.
- FIORENTINO, DF, ZLOTNIK, A, VIEIRA, P, MOSMANN, TR, HOWARD, M, MOORE, KW, O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 146(10), p.3444-3451, 1991.

- FISHER, BD, HILLER, CM, RENNIE, SGA. A Comparison of Continuous Ultrasound and Pulsed Ultrasound on Soft tissue Injury Markers in the Rat. *J Phys Ther Sci.* 15, p.65-70, 2003.
- FRENKEL, V, ETHERINGTON, A, GREENE, M, QUIJANO, J, XIE, J, HUNTER, F, DROMI, S, LI, KC. Delivery of liposomal Doxorubicin (doxil) in a breast cancer tumor model: investigation of potential enhancement by pulsed-high intensity focused ultrasound exposure. *Acad Radiol.*;13(4), p.469-479, 2006.
- FRODE, T S, SOUZA, G E P, CALIXTO, J B. The modulatory role played by TNF- α and IL-1 β in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse Model of pleurisy. *Cytokine.* 13(3), p.162-168, 2001.
- FRODE, TS, SOUZA, GE, CALIXTO, JB. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine.* 17(3):149-156, 2002.
- FYFE, MC, CHAHL, LA. The effect of single or repeated applications of "therapeutic" ultrasound on plasma extravasation during silver nitrate induced inflammation of the rat hindpaw ankle joint in vivo. *Ultrasound Med Biol.* 11(2), p.:273-283, 1985.
- GALBRAITH, JA, MROSKO, BJ, MYERS, RR. A system to measure thermal nociception. *J Neurosci Methods.* 49(1-2), p.63-68, 1993.
- GALLO, JA, DRAPER, DO, BRODY, LT, FELLINGHAM, GW. A comparison of human muscle temperature increases during 3-MHz continuous and pulsed ultrasound with equivalent temporal average intensities. *J Orthop Sports Phys Ther.* 34(7), p.395-401, 2004.
- GAM, A.N., JOHANNSEN, F. Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: a meta-analysis. *Pain.* 63, p.85-9, 1995.
- GEBAUER, D, CORRELL, J. Pulsed low-intensity ultrasound: a new salvage procedure for delayed unions and nonunions after leg lengthening in children. *J Pediatr Orthop.* 25(6), p.750-754, 2005.
- GOLAY, S, HAEBERLI, C, DELACHAUX, A, LIAUDET, L, KUCERA, P, WAEBER, B, FEIHL, F. Local heating of human skin causes hyperemia without mediation by

muscarinic cholinergic receptors or prostanoids. *J Appl Physiol.* 97(5), p.1781-1786, 2004.

GUIDE TO PHYSICAL THERAPIST PRACTICE. Second Edition. American Physical therapy Association. *Phys Ther.* 81(1), p.9-746, 2001.

HANDWERKER, HO. Assessment of experimentally induced pain. Old and new methods. *Am J Med.* Nov. 75(5A), p.15-18, 1983.

HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, FLORES C, JORIS J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hiperalgesia. *Pain.* 32, p. 77-88, 1988.

HARRIS, G R, SUSMAN, J L. Managing musculoskeletal complaints with rehabilitation therapy: summary of the Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on musculoskeletal rehabilitation interventions. *J Fam Pract.* 51(12), p.1042-1046, 2002.

HASHISH, I, HAI, HK, HARVEY, W, FEINMANN, C, HARRIS, M. Reduction of postoperative pain and swelling by ultrasound treatment: a placebo effect. *Pain.* 33, p.303-311, 1988.

HAY-SMITH, EJ. Therapeutic ultrasound for postpartum perineal pain and dyspareunia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2, p.CD000495, 2000.

HOWARD, M, MUCHAMUEL, T, ANDRADE, S, MENON, S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med.* 177(4), p.1205-8, 1993.

HOWARD, M, O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today.* 13(6), p.198-200, 1992.

HSIEH, Y L. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory pain relief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. *Phys Ther.* 86(1), p. 39-49, 2006.

HSIEH, YL. Reduction in Induced Pain by Ultrasound May caused by altered Expression of Spinal Neuronal Nitric Oxide Synthase-Producing Neurons. *Arch Phys Med Rehabil.* 86, p. 1311-1317, 2005.

- HUANG, MH, LIN, YS, LEE, CL, YANG, RC. Use of Ultrasound to Increase Effectiveness of Isokinetic Exercise for Knee Osteoarthritis. *Arch Phys Med Rehabil.* 86, p. 1545-1551, 2005.
- HUNSKAAR, S, BERGE, OG, HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav Brain Res.* 21(2), p.101-108, 1986.
- HUNTER, CA, ELLIS-NEYES, LA, SLIFER, T, KANALY, S, GRUNIG, G, FORT, M, RENNICK, D, ARAUJO, FG. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 158(7), p.3311-3316, 1997.
- JOHNS, LD, COLLOTON, P, NEUENFELDT, J, KRUPPO, K. Pre-exposure effects of 1 and 3 MHz therapeutic ultrasound on ConA activated spleenocytes. *Cytokine.* 22(3-4), p.55-61, 2003.
- JOHNS, LD. Nonthermal Effects of Therapeutic Ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis. *J AthlTrain.* 37(3), p. 293-299, 2002.
- KATAOKA, H, HORIYAMA, S, YAMAKI, M, OKU, H, ISHIGURO, K, KATAGI, T, TAKAYAMA, M, SEMMA, M, ITO, Y. Anti-inflammatory and anti-allergic activities of hydroxylamine and related compounds. *Biol Pharm Bull.* 25(11), p. 1436-1441, 2002.
- KURTAIS, Y, ULUS, Y, BILGIC, A, DINÇER, G, VAN DER HEIJDEN, G. Adding Ultrasound in the management of Soft Tissue Disorders of the Shoulder: A Randomized Placebo-Controlled trial. *Phys Ther.* 4, p.336-342, 2004.
- LANG, R, RUTSCHMAN, RL, GREAVES, DR, MURRAY, PJ. Autocrine deactivation of macrophages in transgenic mice constitutively overexpressing IL-10 under control of the human CD68 promoter. *J Immunol.* 168(7), p.3402-3411, 2002.
- LAVICH, TR, CORDEIRO, RS, SILVA, PM, MARTINS, MA. A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic stimuli and non-opioid analgesics. *Braz J Med Biol Res*, 38(3), p.445-451, 2005.
- LE BARS, D, GOZARIU, M, CADDEN, SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 53(4), p.597-652, 2001.

- LIRANI, AP, LAZARETTI-CASTRO, M. Evidences of physical agents action on bone metabolism and their potential clinical use]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 49(6), p.891-896, 2005.
- LO, TN, ALMEIDA, AP, BEAVEN, MA. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther.* 221(1), p.:261-267, 1982.
- MACHELSKA, H., SCHOPOHL, JK, MOUSA, SA, LABUZ, D., SCHÄFER, M, STEIN, C. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *J Neuroimmunol.* 141, p. 30–39, 2003.
- MAGERL, W, TREEDE, RD. Heat-evoked vasodilatation in human hairy skin: axon reflexes due to low-level activity of nociceptive afferents. *J Physiol.* 497 (Pt 3), p.837-48, 1996.
- MENÉNDEZ L, LASTRA A, HIDALGO A, BAAMONDE A. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J Neurosci Methods* , 113(1), p.91-97. 2002.
- MERRICK, M.A., BERNARD, K.D., DEVOR, S.T., WILLIAMS, J. M.. Identical 3-MHz Ultrasound Treatments With Different Devices Produce Different Intramuscular Temperatures. *J Orthop Sports Phys Ther.* 33, p.379–385, 2003.
- MERRICK, M.A., MIHALYOV, M.R., ROETHEMEIER, J. L., CORDOVA M. L., INGERSOLL , C.D.. A Comparison of Intramuscular Temperatures During Ultrasound Treatments With Coupling Gel or Gel Pads. *J Orthop Sports Phys Ther.* 32, p.216–220, 2002.
- MILLAN, MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 57(1), p.1-164, 1999.
- MINAMI, T, SUGATANI, J, SAKIMURA, K, ABE, M, MISHINA, M, ITO, S. Absence of prostaglandin E2-induced hyperalgesia in NMDA receptor epsilon subunit knockout mice. *Br J Pharmacol.* 120(8), p.1522-1526, 1997.
- MIZOGUCHI, A, MIZOGUCHI, E, TAKEDATSU, H, BLUMBERG, RS, BHAN, AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 16(2), p.219-230, 2002.

- MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *Journal of The Royal Society Of Medicine*. 92, p.164-169, 1999.
- MOORE, KW, DE WAAL MALEFYT, R, COFFMAN, RL, O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*.19, p.683-765, 2001.
- MOORE, KW, VIEIRA, P, FIORENTINO, DF, TROUNSTINE, ML, KHAN, TA, MOSMANN, TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*. 248(4960), p.1230-1234, 1990.
- MORRIS, CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse **In:** WINYARD, PG AND WILLOUGHBY, DA. *Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, vol. 225, 2003, p.115-121.
- MORRIS, R, CHEUNSUANG, O, STEWART, A, MAXWELL, D. Spinal dorsal horn neurone targets for nociceptive primary afferents do single neurone morphological characteristics suggest how nociceptive information is processed at the spinal level. *Br Res Rev*. 46, p.173– 190, 2004.
- NAKAMURA, M, FERREIRA, S H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharm*. 135, p.145-153, 1987.
- NASCIMENTO, SB, SOUSA, RB, MARTINS, MJ, SOUZA GOMES, A, SOUZA, MH, GUERRANT, RL, CUNHA, FQ, RIBEIRO, RA, BRITO, GA. Glutamine depletion potentiates leucocyte-dependent inflammatory events induced by carrageenan or Clostridium difficile toxin A in rats. *Immunology*. 116(3), p.328-336,2005.
- NIIRO, H, OTSUKA, T, IZUHARA, K, YAMAOKA, K, OHSHIMA, K, TANABE, T, HARA, S, NEMOTO, Y, TANAKA, Y, NAKASHIMA, H, NIHO, Y. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood*. 89(5), p.1621-1628, 1997.
- NIIRO, H, OTSUKA, T, TANABE, T, HARA, S, KUGA, S, NEMOTO, Y, TANAKA, Y, NAKASHIMA, H, KITAJIMA, S, ABE, M. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood*. 85(12), p.3736-3745, 1995.

- NYBORG, WL. Biological Effects of Ultrasound: Development of Safety. Guidelines. Part II: General Review. *Ultrasound in Med. & Biol.* 27 (3), p. 301–333, 2001.
- O'CALLAGHAN, JP, HOLTZMAN, SG Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure. *J Pharm Exp Ther.* 192(3), p.497-505, 1975.
- O'CONNOR, D, MARSHALL, S, MASSY-WESTROPP, N. Non-surgical treatment (other than steroid injection) for carpal tunnel syndrome *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1, 2003.
- O'GARRA, A, VIEIRA, PL, VIEIRA, P, GOLDFELD, AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest.* 114(10), p.1372-1378, 2004.
- OSHIKOYA, CA, SHULTZ, SJ, MISTRY, D, PERRIN, DH, ARNOLD, BL, GANSNEDER, BM. Effect of Coupling Medium Temperature on Rate of Intramuscular Temperature Rise Using Continuous Ultrasound. *J Athl Train.* 35(4), p.417-421, 2000.
- OSWALD,IP, WYNN, TA, SHER, A, JAMES, SL. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;89(18), p.8676-8680, 1992.
- PANEL PHILADHELPHIA. Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on selected rehabilitation interventions for shoulder pain. *Phys Ther.* 81(10), p.1719-1730, 2001a.
- PANEL PHILADHELPHIA. Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on selected rehabilitation interventions for neck pain. *Phys Ther.* 81(10), p.1701-1717, 2001 b.
- PANEL PHILADHELPHIA. Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on selected rehabilitation interventions: overview and methodology. *Phys Ther.*81(10), p.1629-1640, 2001c.
- PANEL PHILADHELPHIA. Philadelphia Panel Evidence-Based Clinical Practice Guidelines on Selected Rehabilitation Interventions for Low Back pain. *Phys Ther.* 81, p.1641-1674, 2001 d.

- PERSSON, S, MIKULOWSKA, A, NARULA, S, O'GARRA, A, HOLMDAHL, R. Interleukin-10 suppresses the development of collagen type II-induced arthritis and ameliorates sustained arthritis in rats. *Scand J Immunol.* 44(6), p.607-614, 1996.
- PINHEIRO, RM, CALIXTO, JB. Effect of the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflamm. Res.* 51, p.603–610, 2002.
- PLUNKETT, JA, YU, CG, EASTON, JM, BETHEA, JR, YEZIERSKI, RP. Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol.* 168(1), p.44-154, 2001.
- POOLE, S, CUNHA, FQ, SELKIRK, S, LORENZETTI, BB, FERREIRA, SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br J Pharmacol.* 115(4), p.684-688, 1995.
- RANG H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K. Fármacos Analgésicos. In: RANG H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K. Farmacologia. Rio de Janeiro:Elsevier, 5a edição, 2003, p.640-665.
- RANTANEN, J, THORSSON, O, WOLLMER, P, HUME, T, KALIMO, H. Effects of Therapeutic Ultrasound on the Regeneration of Skeletal Myofibers after Experimental Muscle Injury. *Am J Sports Med.* 27(1), p.54-59, 1999.
- RASO, VV, BARBIERI, CH, MAZZER, N, FASAN, VS. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods.* 142(2), p.185-192, 2005.
- REHER, P, DOAN, N, BRADNOCK, B, MEHJIJI, S, HARRIS, M. Effect of Ultrasound on the Production of IL-8, Basic FGF and VEGF. *Cytokine.* 11(6), p. 416-423, 1999.
- REHER, P, HARRIS, M, WHITEMAN, M, HAI, HK, MEGHJI, S. Ultrasound stimulates nitric oxide and prostaglandin E2 production by human osteoblasts. *Bone.* 31(1), p.236-41, 2002.
- RIBEIRO, RA., VALE, ML., THOMAZZI, SM, PASCHOALATO, ABP, POOLE, S, FERREIRA, SH, CUNHA, FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharm.* 387(1), p.111-118, 2000.

- ROBERTSON, VJ, BAKER, KG. A review of Therapeutic Ultrasound: Effectiveness Studies. *Phys Ther*, 81(7), p1339-1350, 2001.
- ROBERTSON, VJ. Dosage and treatment response in randomized clinical trials of therapeutic ultrasound. *Phys Ther in Sport.*; 3, p.124-133, 2002.
- ROBINSON, SE, BUONO, MJ. Effect of continuous-wave ultrasound on blood flow in skeletal muscle. *Phys Ther*. 75(2), p.145-150, 1995.
- ROBINSON, V, BROSSEAU, L, CASIMIRO, L, JUDD, M, SHEA, B, WELLS, G, TUGWEL, L P. Thermotherapy for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. (2), p.CD002826, 2002.
- SALVEMINI, D, ISCHIROPOULOS, H, AND CUZZOCREA, S. Roles of Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation. In: WINYARD, PG AND WILLOUGHBY, DA. *Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, vol. 225, 2003: p: 291-303.
- SMITH, WL, DEWITT, DL, GARAVITO, RM.. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 69, p.145-182, 2000.
- SVENSSON, CI, YAKSH, TL The Spinal Phospholipase-Cyclooxygenase-Prostanoid Cascade In Nociceptive Processing. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, p.553–583, 2002.
- TAM, C, BRAIN, SD. The assessment of vasoactive properties of CGRP and adrenomedullin in the microvasculature: a study using in vivo and in vitro assays in the mouse. *J Mol Neurosci*. 22(1-2), p.117-124, 2004.
- TANAKA, Y, OTSUKA, T, HOTOKEBUCHI, T, MIYAHARA, H, NAKASHIMA, H, KUGA, S, NEMOTO, Y, NIRO, H, NIHO, Y. Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice. *Inflamm Res*. 45(6), p.283-288, 1996.
- TER HAAR, G, DYSON, M, OAKLEY E M. The Use of Ultrasound by Physiotherapists in Britain, 1985. *Ultrasound in Med & Biol*. 13(10), p.659-663. 1987.
- TER HAAR, G. Therapeutic ultrasound - Review . *European Journal of Ultrasound*. 9, p.3-9, 1999.

- TJØLSEN, A, ROSLAND, JH, BERGE, OG, HOLE, K. The Increasing-Temperature Hot-Plate Test: An Improved Test of Nociception in Mice and Rats. *J Pharm Meth.* 25, p.241-250, 1991.
- TOYOAKI, U, HIROSHI, O, YASUNORI, N, TORU, H, TAKEFUMI, S, AKIRA, I. Treatment of localized prostate cancer using high-intensity focused ultrasound. *BJU International* , 97(4), p. 867-868, 2006.
- UTSUNOMIYA, I, ITO, M, OH-ISHI, S.. Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. *Cytokine.* 10(12), p.956-963, 1998.
- VALE, ML, MARQUES, JB, MOREIRA, CA, ROCHA, FA, FERREIRA, SH, POOLE, S, CUNHA, FQ, RIBEIRO, RA. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 304(1), p.102-108, 2003.
- VAN DER WINDT, DA, VAN DER HEIJDEN, GJ, VAN DEN BERG, SG, TER RIET, G, DE WINTER, AF, BOUTER, LM. Ultrasound therapy for acute ankle sprains. *Cochrane Database Syst Rev.* (1), p.CD001250, 2002
- VOLPON, JB, DIONÍSIO, VC. Ação do Ultrassom terapêutico sobre a vascularização pós-lesão Muscular experimental em coelhos. *Rev Bras Fisiot.* 4(1), p.19-25. 1999.
- WILLIAMS, R. Production and transmission of ultrasound. *Physiotherapy.* 73, p.113–116, 1987.
- WILLIAMS TJ. Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation. *Br J Pharmacol.* Mar;65(3), p.517-524,1979.
- WILLIAMS TJ. Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E2 as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. *Br J Pharmacol.* Nov;77(3), p.505-509, 1982.
- WILLINGALE, HL, GARDINER, NJ, MCLYMONT, N, GIBLETT, S, GRUBB, BD. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br J Pharmacol.* 122(8), p.1593-1604, 1997.

- WINTER, CA, RISLEY, EA, NUSS, GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*.dec 111, p.544-547, 1962.
- WINYARD, PG. Key Stages in the Acute Inflammatory Response and Their Relevance as Therapeutic Targets. In: WINYARD, PG AND WILLOUGHBY, DA. *Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, vol. 225, 2003: p:3-6.
- WONG BJ, WILLIAMS SJ, MINSON CT. Minimal role for H1 and H2 histamine receptors in cutaneous thermal hyperemia to local heating in humans. *J Appl Physiol*. Feb;100(2), p.535-540, 2006.
- WOO, J. A Short History of the development of Ultrasound in obstetrics and Gynecology. Available in: www.ob-ultrasound.net/history1.HTML. Access in March of 2006.
- WOOLFE, G, MACDONALD, AD. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J Pharmacol Exp Ther*. 80, p.300-307, 1944.
- YANG, RS, CHEN, YZ, HUANG, TH, TANG, CH, FU, WM, LU, BY, LIN, WL. The effects of low-intensity ultrasound on growing bone after sciatic neurectomy. *Ultrasound Med Biol*. 31(3):431-437, 2005.
- YOUNG, S.R., DYSON, M..Macrophage Responsiveness to therapeutic Ultrasound. *Ultrasound in Med & Biol*. 16(8), p809-816,
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, p.109–110, 1983.

Successful Submission Confirmation

Aug 20

2006 11:33

Your manuscript has been successfully uploaded to Physical Therapy. You will receive future communications via e-mail.

Your manuscript number is: **PTJ-2006-0242**

Please make note of your manuscript number. You will receive an e-mail from PTJ within 24 hours of the end of this process, confirming receipt of your submission.

[Print This Page](#)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 150/2005**, relativo ao projeto intitulado "**Verificação experimental da eficácia antinociceptiva e antiedematogênica da aplicação do ultra-som terapêutico (modo pulsado) em quadro inflamatório agudo**", que tem como responsável **Maria Salete de Abreu Castro**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **8/ 03/2006**.

Este certificado expira-se em **8/ 03 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 150/2005**, related to the project entitled "**Antinociceptive and antiedematogenic effects of therapeutic ultrasound (pulsed) in a model of acute inflammation**", under the supervision of **Maria Salete de Abreu Castro**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 8, 2006**.

This certificate expires in **March 8, 2011**.

Belo Horizonte, 8 de Março de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027
www.ufmg.br/prpq/cetea - cetea@prpq.ufmg.br