

Artigo original

Análise comparativa entre ultrassom terapêutico e auto-hemoterapia no tratamento de lesão muscular em modelo animal

Comparative analyses of therapeutic ultrasound and autohemotherapy on treatment of muscle injury in animal model

Uillian Bauer Munari*, Guilherme Laurentina da Rosa*, Jonathann Possato**, Paulo Cesar Lock Silveira, Ft., M.Sc.***, Ricardo Aurino Pinho****, Marcos Marques da Silva Paula*****, Eduardo Ghisi Victor, Ft., M.Sc.*****

.....
*Acadêmico do Curso de Graduação em Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense e aluno de Iniciação Científica,
**Acadêmico do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense e aluno de Iniciação Científica,
Doutorando pela Universidade Federal de Santa Catarina, *Coordenador do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício da Universidade do Extremo Sul Catarinense, *****Coordenador do Laboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, *****Professor do Curso de Fisioterapia e doutorando pela Universidade do Extremo Sul Catarinense

Resumo

Introdução: Este estudo teve como objetivo comparar os efeitos do ultrassom terapêutico e da auto-hemoterapia no tratamento da lesão muscular. **Material e métodos:** Foram utilizados 24 ratos Wistar, divididos aleatoriamente em quatro grupos: G1: Ratos sem lesão muscular; G2: Ratos com lesão muscular sem tratamento; G3: Ratos com lesão muscular e tratamento com ultrassom pulsado (0.8 W/cm²); G4: Ratos com lesão muscular e tratamento com auto-hemoterapia. A lesão muscular foi induzida por um trauma único no gastrocnêmio. O tratamento foi realizado durante 7 dias e os animais foram eutanasiados por decapitação e o tecido muscular ao redor da lesão foi removido cirurgicamente para a realização das análises bioquímicas. Dentre os marcadores bioquímicos foram analisados ânion superóxido como marcador na produção de espécies reativas de oxigênio, e catalase como marcador de enzimas antioxidantes. **Resultados:** O grupo 2 apresentou diferença significativa em relação ao grupo 1 tendo aumentado o estresse oxidativo, e o grupo 3 apresentou diminuição do estresse oxidativo estatisticamente significativa em relação ao grupo 2, o grupo 4 não apresentou diferença significativa. **Conclusão:** Nota-se que a auto-hemoterapia não apresentou resultados satisfatórios no tratamento de lesão muscular, ao contrário do ultrassom, que diminuiu os marcadores de estresse oxidativo sendo eficaz no tratamento de lesão muscular.

Palavras-chave: ultrassom, auto-hemoterapia, lesão muscular.

Abstract

Introduction: This study aimed to compare the effects of therapeutic ultrasound and autohemotherapy to treat muscle injury. **Methods:** Twenty four Wistar rats were randomly divided into four groups: G1: Rats with no muscle injury; G2: Rats with muscle injury without treatment; G3: Rats with muscle injury and treatment using pulsed ultrasound (0.8 W/cm²); G4: Rats with muscle injury and treatment using autohemotherapy. The muscle injury was induced by a single trauma on the gastrocnemius. The treatment was carried out during 7 days and the animals were euthanized by decapitation and the muscle tissue around the injury was surgically removed to perform biochemistry analyses. Among the biochemical markers were analyzed superoxide anion as a marker of reactive oxygen species production and catalase as antioxidant enzymes. **Results:** Group 2 showed significant difference compared to group 1 and increased oxidative stress, and group 3 showed a reduction of statistically significant oxidative stress compared to group 2, group 4 showed no significant difference. **Conclusion:** Was observed that the muscle injury treatment using autohemotherapy has no satisfactory results. On the other hand, ultrasound therapy reduced the oxidative stress markers and has proved effective in treating muscle injury.

Key-words: ultrasound, autohemotherapy, muscle injury.

Recebido em 27 de junho de 2012; aceito em 29 de agosto de 2012.

Endereço de correspondência: Uillian Bauer Munari, Rua Cecília Daros Casagrande, 150/601 Ed. Lúcio Cavalari, 888024-00 Criciúma SC, E-mail: uilliantorres@hotmail.com

Introdução

A lesão muscular pode ocorrer de algumas maneiras, como forças diretas, incluindo lacerações e contusões no músculo, e forças indiretas relacionadas à tensão exercida sobre o músculo [1].

Além das causadas devido ao trabalho ou por fatores característicos, as lesões musculares podem ocorrer em esportistas profissionais ou atletas ocasionais, tanto por esforço repetitivo, por exemplo, originando fadiga e consequente lesão, por pancada ou por alongamento excessivo e incorreto [2].

Embora necessárias para a defesa celular e demais funções, as ERO, quando produzidas em excesso, provocam um desequilíbrio entre a produção e a capacidade de defesa antioxidante, levando a uma condição denominada estresse oxidativo, agredindo os constituintes celulares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos [3].

Após a lesão muscular, o estresse oxidativo pode ficar aumentado devido a inúmeros locais de geração de ERO dentro do músculo traumatizado. Pode-se incluir como fontes primárias de radicais livres, durante e após o trauma, a mitocôndria, xantina oxidase (XO), metabolismo de prostanóides e o sistema NADPH oxidase [4].

Em geral, a lesão muscular esquelética tem uma regeneração rápida formando miotubos em três dias. Funcionalmente, as fibras musculares são reinervadas em 4 a 5 dias, e um reparo total após 21 a 28 dias [5]. Sabe-se que o processo de regeneração músculo esquelético vem sendo muito estudado, no entanto questões permanecem obscuras, especialmente os efeitos de vários tratamentos comumente usados para acelerar o processo de regeneração muscular, como também o envolvimento das ERO durante esse processo.

O sucesso da regeneração, em todas as situações, envolve revascularização, infiltração celular, fagocitose do músculo danificado por necrose, proliferação, fusão das células precursoras do músculo e, finalmente, a reinervação [6].

A ação dos macrófagos estimula a revascularização, o que intensifica a reparação do tecido lesado [6].

O ultrassom tem sido utilizado há algumas décadas para o reestabelecimento das funções e promoção da cicatrização de tecidos moles danificados. Observações clínicas determinam o uso do ultrassom em diversas situações, incluindo a dor, inflamação da bursa e traumatismo do músculo esquelético [7].

A ação terapêutica do ultrassom pode produzir efeitos de cicatrização em biomarcadores de regeneração muscular, principalmente lesões por contusões, além de produzir mudanças na permeabilidade da membrana e estimular o transporte de substâncias de mensageiros secundários, como cálcio [8].

Dentre as formas de tratamento complementar, está a auto-hemoterapia (AHT), que, embora com escassa literatura existente sobre o assunto, adquiriu muitos adeptos ao longo dos anos. A auto-hemoterapia foi introduzida como forma terapêutica por Ravaut, por volta de 1910, e desde então vem

sendo utilizada no tratamento de diversas patologias, tanto no homem quanto em animais [9].

A auto-hemoterapia é um procedimento antigo que se baseia no empirismo. O tratamento consiste em aplicações do sangue autólogo, por via intramuscular, que tem como objetivo estimular o sistema imunológico [10].

Esta terapia complementar é de baixo custo, e consiste em coletar certo volume de sangue de uma veia periférica do próprio paciente, comumente da prega do cotovelo e aplicá-lo imediatamente em seu músculo, sem nada acrescentar ao sangue. Este procedimento estimula o sistema retículo endotelial, quadruplicando o percentual de macrófagos em todo organismo [11].

Acredita-se que a auto-hemoterapia produz um efeito proteico e que, no caso de doenças inflamatórias crônicas, promova a reativação orgânica [12].

Este estudo teve como objetivo comparar o ultrassom com a auto-hemoterapia no tratamento da lesão muscular em modelo animal.

Material e métodos

Na pesquisa foram utilizados 24 ratos Wistar. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas, numa temperatura ambiente controlada em 22°C, em ciclo claro-escuro 12:12h e com livre acesso a água e a alimentação. Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo 1 - Ratos sem lesão muscular (Controle); Grupo 2 - Ratos com lesão muscular no gastrocnêmio sem tratamento (Sham); Grupo 3 - Ratos com lesão muscular no gastrocnêmio e tratamento com ultrassom pulsado (0,8 W/cm²); Grupo 4 - Ratos com lesão muscular no gastrocnêmio e tratamento com auto-hemoterapia. Foram utilizados Ratos Wistar, machos, saudáveis, pesando entre 200-250 g, com 8 semanas de idade.

A pesquisa poderia ser encerrada por motivos eventuais que comprometessem os objetivos previstos nesse estudo como, por exemplo, surgir alguma doença que afetasse o estado de saúde dos animais ou morte da maioria dos animais que estivessem sendo submetidos ao tratamento com ultrassom terapêutico ou auto-hemoterapia.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESC sendo aprovado sob o Nº 09/2011.

O modelo de trauma muscular foi desenvolvido de acordo com Rizzi [13]. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). Posteriormente, foi realizada a lesão no gastrocnêmio por um único impacto por trauma direto de uma prensa desenvolvida pelo Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS, Brasil). A lesão foi produzida por deslocamento de uma massa metálica de 0,459 kg, a uma altura de 18 cm. O impacto produziu uma energia cinética de 0.811 J, conforme especificações do equipamento. O grupo controle sem lesão muscular foi

anestesiado para assegurar a padronização, porém não foram expostos ao equipamento de trauma muscular.

O tratamento foi feito com ultrassom pulsado (Imbramed, Brazil) com 6 minutos de duração, frequência de 1.0 MHz e intensidade de 0,8 W/cm², foi aplicado 2 h após a lesão e a cada 24 h durante 7 dias após o trauma. O movimento do cabeçote foi circular [14]. Após 1 hora da última aplicação os animais foram eutanasiados por decapitação e o tecido muscular ao redor da lesão foi removido cirurgicamente [15]. Após esses procedimentos foram realizadas as análises bioquímicas.

Para a realização da auto-hemoterapia, foi utilizado no procedimento 100µl de sangue. O sangue foi puncionado da calda do animal utilizando seringa de insulina, e imediatamente injetado próximo à lesão muscular, esse procedimento foi realizado 2h após a lesão [10]. No 7º dia os animais foram eutanasiados por decapitação e o tecido muscular ao redor da lesão foi removido cirurgicamente [15]. Após esses procedimentos foram realizadas as análises bioquímicas.

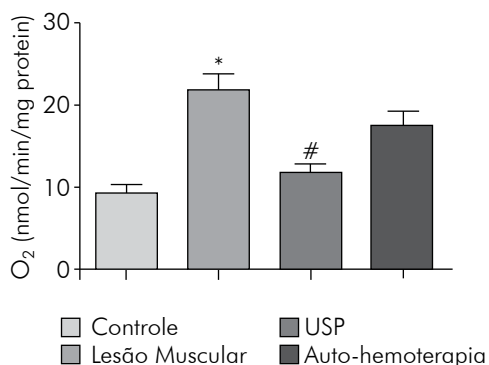
Dentre os marcadores bioquímicos para a comparação dos grupos, foram utilizados ânion superóxido que é uma espécie reativa de oxigênio e catalase que é uma enzima antioxidante.

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $p < 0,05$. Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.

Resultados

O Gráfico I apresenta os valores dos níveis de ânion superóxido após os tratamentos com ultrassom pulsado, auto-hemoterapia, grupo sham e controle.

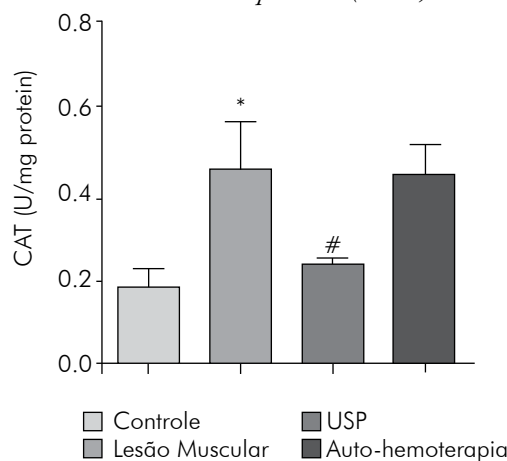
Gráfico I - Níveis de Ânion Superóxido pós-testes ($n=24$).



Houve diferença estatisticamente significativa no grupo Sham com o aumento do ânion superóxido em relação ao grupo controle, e no grupo de tratamento com ultrassom pulsado, no qual diminuiu o ânion superóxido comparado com o grupo Sham ($p < 0,05$).

O Gráfico II apresenta os valores dos níveis de Catalase após os mesmos procedimentos.

Gráfico II - Níveis de Catalase pós-testes ($n=24$).



Apresentou novamente diferença estatisticamente significativa no grupo Sham com o aumento da catalase em relação ao grupo controle e no grupo de tratamento com ultrassom pulsado, no qual diminuiu a catalase comparado com o grupo Sham ($p < 0,05$).

Discussão

Este estudo teve como objetivo comparar o ultrassom com a auto-hemoterapia no tratamento da lesão muscular, tendo como parâmetros para avaliação a espécie reativa de oxigênio Ânion Superóxido e a enzima antioxidante Catalase.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no grupo de animais tratados com ultrassom pulsado, sugerindo que esta terapia diminui o estresse oxidativo acelerando o processo de cicatrização muscular. Já a auto-hemoterapia não apresentou diferença significativa, demonstrando-se ineficaz para tratamento de lesão muscular.

Conforme os resultados, muitos estudos confirmam um aumento nos marcadores de Espécies Reativas de Oxigênio e Enzimas Antioxidantes, como Ânion Superóxido e Catalase respectivamente, em sangue e tecidos de humanos e animais, durante e após a lesão muscular [16].

Estudos sugerem que o uso do ultrassom reduz a inflamação induzindo a liberação de histamina, o que causa vasodilatação local aumentando a permeabilidade vascular e consequente melhora da cicatrização tecidual, corroborando nossos achados [17].

Em seu estudo, Gouvêa [7] lacerou o tibial anterior de ratos e realizou análises histológicas do músculo, comparando o grupo controle com o grupo tratado com ultrassom, concluiu que a reação inflamatória foi acelerada pelo uso do ultrassom, o que possibilitou uma remoção mais eficiente de fibras necróticas no músculo tratado acelerando o reparo tecidual. Acreditamos que essa reação inflamatória também tenha sido acelerada na aplicação do ultrassom no estudo.

Em outra pesquisa, foi aplicado ultrassom nas intensidades de 0,2 e 0,4 W/cm² em ratos também com lesão incisiva no

músculo tibial anterior, e as análises histopatológicas confirmaram que o ultrassom aumenta a fagocitose dos restos das fibras lesadas e acelera o surgimento de fibroblastos e miofiblastos. Além disso, acredita-se ainda que a angiogênese foi estimulada e o ultrassom também acelerou a formação de miofiblastos [18], concluindo que o ultrassom favorece o processo de regeneração muscular, o que confirma os resultados.

Mesmo sem evidências científicas, e sugerindo ser pouco eficaz no tratamento de lesão muscular pelo presente estudo, a auto-hemoterapia vem sendo empregada em diversas doenças infecciosas, especialmente na febre tifóide e nas dermatoses. É também usada em casos de asma, urticária e estados anafiláticos [19].

A auto-hemoterapia combinada com o uso tópico de água e óleo ozonizados no tratamento de habronemose em equino acelerou a formação de tecido de regeneração em substituição a pele necrosada, com rápida redução da área afetada, regeneração tecidual e cicatrização de quase toda a superfície lesada, características que apontam para a cura clínica da lesão [20].

A auto-hemoterapia também foi analisada no tratamento de resfriado agudo, e foi concluído que comparado ao grupo placebo não teve efeito benéfico [21].

O sangue autólogo também foi utilizado na ozonioterapia médica, muitos pacientes humanos, com comprometimento renal e poliartralgia apresentam melhora substancial do quadro clínico da dor com a aplicação intramuscular [22].

Em seu estudo, Silva [10] verificou que a aplicação da auto-hemoterapia em ratos Wistar produziu uma reação imunológica no organismo dos ratos, mostrando que com o uso desta técnica há um aumento na quantidade de células de defesa do sistema imune, melhorando a cicatrização, o que não foi constatado em nosso estudo, pois não houve diferença estatisticamente significativa com esta terapia, visto que o processo de regeneração muscular está intimamente ligado às células do sistema imune.

Conclusão

Ao analisar marcadores de estresse oxidativo, especificamente ânion superóxido e catalase, observou-se menor influência da auto-hemoterapia no tratamento de lesão muscular comparado ao ultrassom, que demonstrou maior capacidade de reduzir este estresse, sugerindo ser mais eficiente para o tratamento deste tipo de lesão muscular. Ainda são necessários muitos estudos a respeito da auto-hemoterapia, no entanto é necessário alertar a população sobre a fidedignidade de métodos ou técnicas que não apresentam comprovações científicas.

Referências

1. Fukushima K, Badlani N, Usas A. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med* 2001;29:394-402.
2. Clelis NR, Natali MJM. Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. *Rev Bras Ciênc Mov* 2001;9(4):47-53.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. New York: Oxford University Press; 2007.
4. Reid MB, Moody MR. Dimethyl sulfoxide depresses skeletal muscle contractility. *J Applied Physiol* 1994;76:2186-90.
5. Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci* 2001;16: 44-51.
6. Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Path Res Pract* 1991;187:1-22.
7. Gouvêa CMCP, Vieira PMN, Amaral AC. (1998). Efeito do ultrassom na recuperação de músculo tibial anterior de rato lesado. *Rev Univ* 1998;4:165-173.
8. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 2004; 25:73-77.
9. Sousa FB. Auto-hemoterapia como terapia auxiliar no tumor venéreo transmissível. Curso de especialização Lato Sensu em Clínica médica e cirúrgica em Pequenos Animais – UCB. Goiânia: UCB; 2009. 27p.
10. Silva CH, Souza LJ, Papa-martins M. Avaliação dos efeitos da auto-hemoterapia sobre a cicatrização e presença de leucócitos séricos em ratos Wistar. *Revista Eletrônica de Enfermagem do Unieuro* 2009;2(1):39-57.
11. Associação Brasileira de Medicina Complementar (ABMC). Auto-hemoterapia. [citado 2011 Ago 12]. Disponível em URL: <http://www.medicinacomplementar.com.br/tema130206>
12. Santin API, Brito LAB. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. *Ciência Animal Brasileira* 2004;5(1):30-45.
13. Rizzi CF, Mauriz JL, Corrêa DSE. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-κB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med* 2006;38:704-13.
14. Saliba S, Mistry DJ, Perrin DH, Gieck J, Weltman A. Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing. *J Athl Train* 2007;42(3):349-54.
15. Freitas LS, Freitas TP, Silveira PC. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell Biol Int* 2007;31:482-88.
16. Pattwell DM, Jackson MJ. Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 2004;32:14-8.
17. Freitas LBS, Freitas, TP, Silveira P, Pinho RA. O ultrassom no tratamento da lesão muscular. *Revista Pesquisa e Extensão em Saúde* 2007;3:1-5.
18. Faganello F. Ação do ultrassom terapêutico no processo de regeneração do músculo esquelético [Dissertação]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista Rio Claro; 2003.
19. Shakman SH. Autohemotherapy: the magic shot? [citado 2011 Nov 24]. Disponível em URL: <http://paginas.terra.com.br/saude>
20. Garcia CA, Stanziola L, Andrade IC. Autohemoterapia maior ozonizada no tratamento de habronemose em equino – relato de caso. Brasília: Faculdades Integradas; 2007.
21. Hensler S, Guendling PW, Schmidt M. Autologous blood therapy for common cold – A randomized, double blind placebo-controlled trial. *Complement Ther Med* 2009;17(5-6):257-61.
22. Oliveira JR. Tampão sanguíneo peridural: um método a ser absorvido. *Prática Hospitalar* 2007;9(51):163-5.