

Análise nanoestrutural da ação do ultra-som terapêutico sobre o processo de regeneração do tendão de ratos

Nanostructural analysis of therapeutic ultrasound effect on rat tendon healing process

Natália Figueiredo Viana Frasson¹, Charles Taciro², Nivaldo Antonio Parizotto³

Estudo desenvolvido no Laboratório de Eletrotermofototerapia do DFisio /UFSCar – Depto. de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP Brasil

- ¹ Fisioterapeuta do grupo de pesquisa do Laboratório de Eletrotermofototerapia do DFisio /UFSCar
- ² Doutorando em Fisioterapia no Laboratório de Eletrotermofototerapia do DFisio /UFSCar
- ³ Prof. Dr. titular do Laboratório de Eletrotermofototerapia do DFisio /UFSCar

ENDEREÇO PARA
CORRESPONDÊNCIA

Charles Taciro
Laboratório de
Eletrotermofototerapia Depto. de
fisioterapia UFSCar
Rod. Washington Luiz km 235
13565-905 São Carlos SP
e-mail:
charlestaciro@yahoo.com.br ;
parizoto@power.ufscar.br;
nati_icem@yahoo.com.br

APRESENTAÇÃO
nov. 2008

ACEITO PARA PUBLICAÇÃO
jun. 2009

RESUMO: O ultra-som terapêutico pulsado (USTP) é uma das modalidades terapêuticas utilizadas para promover a aceleração do reparo tendíneo. Este estudo avaliou a microestrutura do tendão calcâneo sob o efeito do USTP em duas intensidades diferentes. Foram utilizados 24 ratos Wistar machos, divididos em quatro grupos, submetidos à tenotomia radical transversal do tendão calcâneo direito, sem posterior tenorrafia. Os animais do grupo controle (GC) não receberam tratamento; o grupo 1 (G1) foi submetido ao USTP de 1 MHz a 20%, com área de radiação efetiva de 1,0 cm² e intensidade média instantânea de 0,3 W/cm²; o grupo 2 (G2) recebeu USTP nos mesmos parâmetros, mas com intensidade de 1,5 W/cm²; no grupo 3 (G3), placebo, foi aplicado tratamento simulado (ultra-som desligado). Nos três grupos, o tratamento consistiu em uma sessão diária de 5 minutos, por 10 dias. No 11^a dia pós-operatório os tendões foram removidos para análise qualitativa e quantitativa, por meio de microscopia de luz polarizada (MLP), de luz (ML) e de força atômica (MFA). As análises qualitativas de MLP e MFA foram coincidentes, mostrando melhor organização, agregação e orientação das fibras de colágeno no grupo G1. A análise quantitativa apresentou contagens médias de 400,7 fibroblastos e 2,22 capilares sanguíneos por campo de análise, não se encontrando diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). Conclui-se que o processo de regeneração tendínea em ratos pode ser beneficiado pelo tratamento com USTP em baixa intensidade.

DESCRIPTORES: Ratos; Tendão do calcâneo/reabilitação; Terapia por ultra-som

ABSTRACT: Therapeutic pulsed ultrasound (TPUS) is one among several therapies used to promote tissue repair. This study assessed the effect of TPUS at two different intensities on rat Achilles tendon's microstructure. Twenty four male adult Wistar rats (aged 6 months) were submitted to right calcanean tendon radical tenotomy, with no ensuing tendon suture, and divided into four groups: control group (GC) did not receive any treatment; group 1 (G1) was treated with 20%, 1 MHz TPUS at 0.3 W/cm²; with effective radiation area of 1,0 cm²; group 2 (G2) was treated with same parameter TPUS, but at 1.5 W/cm² intensity; group 3 (G3) received simulated treatment (equipment off). In all three groups, treatment consisted of one daily 5-minute session, for ten days. On the 11th post-operative day animals were euthanized and their tendons removed for qualitative and quantitative analysis by polarized light microscopy (PLM), light microscopy (LM), and atomic force microscopy (AFM). Both PLM and AFM analysis results showed better collagen fibre organization, aggregation and orientation at G1. The quantitative analysis of fibroblasts (mean 400.7 fibroblast/field) and capillary vessels (mean 2.22 vessels/field) through LM showed no statistically significant differences between groups ($p>0.05$). It may hence be said that the process of tendon regeneration in adult rats may benefit from treatment with TPUS at low intensity.

KEY WORDS: Achilles tendon/rehabilitation; Rats; Ultrasonic therapy

INTRODUÇÃO

O tendão calcâneo é um dos tendões mais afetados no corpo humano. Lesões nessa estrutura podem resultar em sérias complicações e em longo período de reabilitação^{1,2}. A aplicação de modalidades terapêuticas para acelerar o processo de recuperação dessa estrutura é fundamental para reduzir o impacto social e econômico do indivíduo acometido pelo trauma.

Há décadas o ultra-som terapêutico (UST) é amplamente utilizado no tratamento de desordens musculoesqueléticas principalmente para acelerar processos de cicatrização tecidual pela redução de edema, controle do processo inflamatório, aumento do número de fibroblastos e síntese de colágeno, neoangiogênese, analgesia e aumento do metabolismo².

Apesar de alguns resultados clínicos e experimentais considerados eficazes^{2,3}, há muita controvérsia na literatura sobre a seleção dos parâmetros que devem ser utilizados para o tratamento do tecido tendíneo³, modos de operação, duração, técnica de aplicação, intervalo entre sessões, patologia, estágio da lesão, profundidade, composição tecidual e idade. Sabe-se porém que a qualidade do tecido tendíneo é altamente dependente do modo como o colágeno se organiza. Diversos estudos indicam que a forma de deposição e remodelamento do colágeno na matriz extracelular ao longo do processo de regeneração do tendão é influenciável pelo ultra-som terapêutico⁴.

O estudo dos efeitos UST sobre o remodelamento do colágeno do tendão pode contribuir para a seleção de parâmetros adequados para melhor qualidade do reparo tecidual. Assim, o presente estudo tem o objetivo de comparar dois protocolos de ultra-som terapêutico pulsado (USTP) no processo de regeneração do tendão calcâneo de ratos animais adultos. O objetivo principal deste estudo foi investigar, por meio de microscopia de força atômica, microscopia de polarização e microscopia de luz, o estado de concentração, agregação e topografia do tecido colágeno, bem como a neoangiogênese e a população de fibroblastos no foco da lesão.

METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos. Foram utilizados 24 animais (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, machos, com 24 a 26 semanas de idade e peso corporal entre 350 e 450 g.

Os animais foram inicialmente pesados e submetidos a anestesia geral por via intraperitoneal utilizando-se uma combinação de anestésicos (Ketamina, a 95 mg/kg de peso e Xilazina 2%, a 12 mg/kg), em doses correspondentes à massa corporal de cada animal.

Foi feita uma incisão longitudinal de aproximadamente 7 mm de comprimento sobre a pele no local correspondente ao terço médio do tendão calcâneo, onde foi efetuada a tenotomia no sentido transversal ao eixo do tendão. A seguir a pele foi suturada com fio absorvível (Catgut 4,0) e submetida a limpeza local (álcool iodado), não havendo posteriormente qualquer tipo de imobilização do segmento.

O animais receberam água e ração balanceada (*ad libitum*) e foram mantidos em ambiente higienizado, com iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

- Grupo controle (GC) n=6, não receberam tipo algum de tratamento;
- Grupo 1 (G1) n=6, tratados por 5 minutos com USTP 20%, intensidade média de 0,3 W/cm² e frequência de 1 MHz, com área de radiação efetiva do cabeçote (ERA) de 1 cm².
- Grupo 2 (G2) n=6, tratados por 5 minutos com USTP 20%, intensidade média de 1,5 W/cm² e frequência de 1 MHz, ERA de 1 cm².
- Grupo 3 (G3) n=6, receberam tratamento placebo, com o equipamento desligado, sendo portanto considerado grupo placebo.

Tratamento

O equipamento utilizado foi um aparelho de ultra-som terapêutico pulsado (Ibramed, Amparo, SP, Brasil), em regime temporal de pulso a 20% nos parâmetros acima, variando entre os grupos G1 e G2 apenas a intensidade, de 0,3 W/cm² e 1,5 W/cm², sendo aplicado gel para ultra-som, utilizando a técnica de movimentação do cabeçote longitudinalmente sobre a área de lesão. Inicialmente o equipamento foi aferido no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, para se obterem os valores reais de emissão de energia.

A terapia por USTP iniciou-se 24 h após a tenotomia, compondo-se de 10 sessões consecutivas de 5 minutos cada, com intervalo de 24 h, realizadas num mesmo período circadiano (manhã), pela técnica de varredura da superfície da área lesada.

No 11^a dia pós-operatório (24 horas após a última sessão) os animais foram submetidos à mesma anestesia aplicada para a cirurgia, seguida de eutanásia por injeção intracardíaca de KCL; foi removido o tendão calcâneo direito desde a inserção calcanear até a junção miotendínea por dissecação.

Preparação das amostras e análise dos dados

Para uma avaliação histológica do reparo tendíneo, os tendões removidos foram fixados em solução de formalina a 10% durante 24 horas e desidratados em banhos sucessivos de álcool (70, 90, 95 e 100%) e imersos em xilol por 1 hora. Cortes semi-seriados de 5,0 µm de espessura foram realizados no sentido longitudinal do tendão para então submeter as lâminas à coloração de hematoxilina e eosina; as lâminas foram fotografadas em três campos da área de lesão, num aumento de 40 vezes, através de um microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Alemanha).

As imagens obtidas foram analisadas no *software* Imagetool 3.0 (University of Texas Health Science Center in San Antonio), no qual foram morfológicamente identificados, marcados e contabilizados os fibroblastos e capilares sanguíneos presentes na fotomicrografia.

Para a análise da topografia das amostras foi utilizado um microscópio de força atômica (MFA) BioProbe (Park Scientific Instruments) em meio aéreo, operando no modo de contato, frequência de varredura de 0,8 Hz, num campo de análise de 100X100 μm . As lâminas foram hidratadas por cerca de 30 minutos em água destilada e obtidas três imagens de sua topografia sob uma disposição aleatória na área correspondente à lesão. Em seguida, os dados dimensionais da superfície obtida foram analisados pelo software IP2.0 (Park Scientific Instruments), obtendo-se o valor da espessura dos feixes de colágeno.

Também foi analisada qualitativamente a forma de organização das fibras e feixes de colágeno, pelas imagens tridimensionais obtidas pela MFA.

Para a análise de birrefringência, ou seja, das propriedades anisotrópicas ópticas do tendão, foi utilizado um microscópio de luz polarizada (Leica) com objetiva (Pol) de 10x/0,22, condensador 0,0, compensador (Sénarmont) de $\lambda/0,4$, luz monocromática com $\lambda=546\text{ nm}$, obtida por meio de um filtro de interferência (Leica). Para tomar medidas pela microscopia de polarização, inicialmente as lâminas histológicas de cada grupo foram hidratadas por imersão em água destilada por cerca de 30 minutos, conforme o estudo de Vidal⁵. O eixo longo do tendão foi orientado a 45° em relação aos polarizadores do microscópio, para melhor análise do retardo óptico (OR)⁶ exibido nos diferentes grupos: o aumento do valor de birrefringência reflete o aumento das ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno, representando assim um aumento na cristalinidade e na agregação ordenada do colágeno tipo I.

Análise dos dados

Os dados gerados pela MFA (dimensão da secção transversa da fibra de colágeno, função rugosidade, alinhamento, predominância dimensional e homogeneidade), da polarização (valor de retardo óptico) e da histologia foram submetidos à análise de variância (Anova); para verificação de possíveis diferenças entre as amostras foi aplicado o teste *post hoc* de Newman-Keuls, sendo adotado o nível de significância $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Quanto à histomorfometria, a análise quantitativa de fibroblastos e capilares sanguíneos por microscopia de luz comum não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos: a análise dos resultados da contagem de células fibroblásticas por campo de lesão não mostrou diferença (Gráfico 1); tampouco a

de capilares sanguíneos (Gráfico 2).

No que se refere à mensuração da espessura dos feixes de colágeno por MFA, os feixes dos tendões do grupo controle (GC) são estatisticamente menos espessos quando comparados aos dos outros grupos, inclusive ao grupo placebo. Nessas medidas, não foi possível identificar diferença significativa entre os grupos G1, G2 e G3.

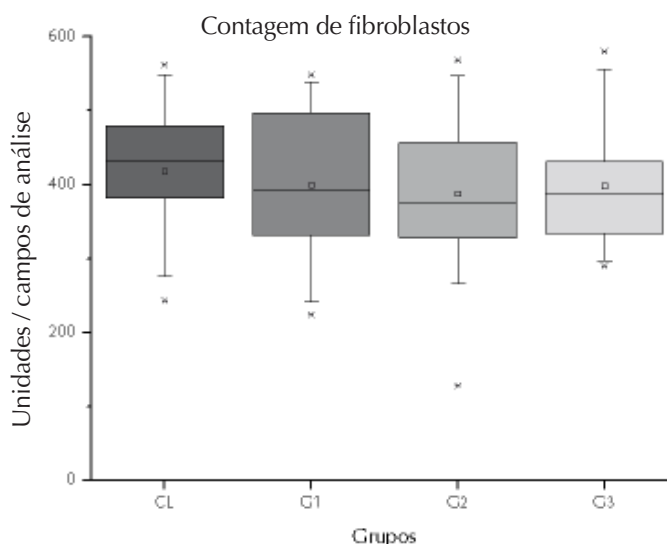


Gráfico 1 Contagem de fibroblastos obtida nas fotomicrografias dos grupos GC (controle), G1 (intensidade de 0,3 W/cm²), G2 (intensidade de 1,5 W/cm²) e G3 (placebo)

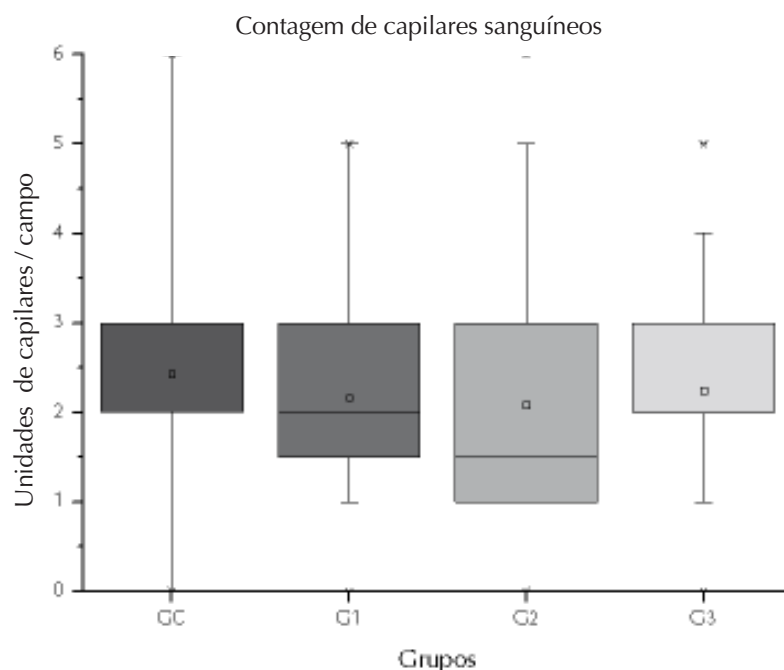


Gráfico 2 Contagem de capilares sanguíneos obtida nas fotomicrografias dos grupos GC (controle), G1 (intensidade de 0,3 W/cm²), G2 (intensidade de 1,5 W/cm²) e G3 (placebo)

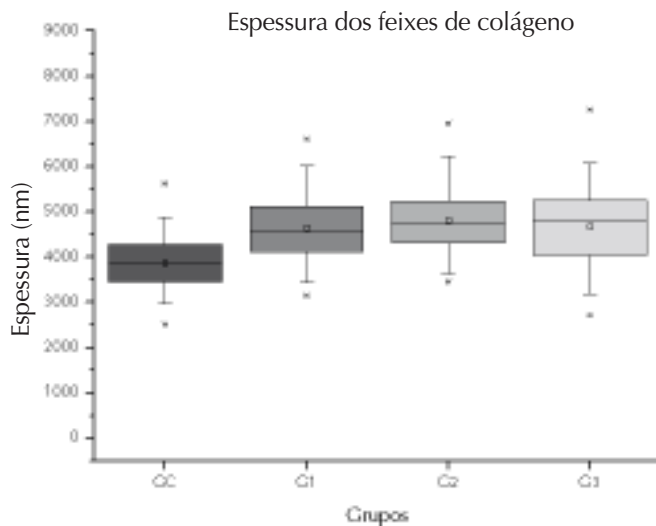


Gráfico 3 Medida da espessura dos feixes de colágeno por MFA (em micrômetro) dos grupos GC (controle), G1 (intensidade de 0,3 W/cm²), G2 (intensidade de 1,5 W/cm²) e G3 (placebo); * = diferença significativa ($p=0,05$)

Apenas na análise qualitativa das imagens obtidas por MFA foi possível observar diferenças entre os grupos quanto à microestrutura do tecido tendíneo. Os grupos GC e G3 apresentam características semelhantes, em que, apesar de uma aparente direção predominante seguindo o eixo do tendão, nota-se um comportamento heterogêneo dos feixes de colágeno, além de sua menor espessura, denotando assim uma variação importante. Quando comparado ao GC, o grupo placebo (G3) apresenta sutis diferenças, como a formação de feixes mais espessos e melhor organizados, porém pequenos feixes transversos ao eixo vertical podem ser observados. O comportamento heterogêneo característico ocorre em menor intensidade.

Nas lâminas dos grupos G1 e G2, por sua vez, ainda se observa o caráter heterogêneo, porém destacam-se fibras de maior espessura. As imagens do G2 sugerem deterioração do material, ou seja, a estrutura apresenta-se muito mais irregular e heterogênea, com fibras dispostas em direções cruzadas, além de grande quantidade de material amorfo. Comparativamente, o tecido parece mais desorganizado. No caso do G1, parece que há um comportamento mais homogêneo em relação às demais amostras, sendo facilmente identificável uma direção predominante e maior agregação das fibras.

A análise de birrefringência mostra valores estatisticamente maiores de retardo óptico no grupo G1 ($p=0,05$) quando comparados aos dos outros grupos, o que indica melhor organização do colágeno. Não foi encontrada significância na comparação entre os grupos GC, G2 e G3. É importante observar que os dados obtidos pela MFA são coincidentes com os obtidos pela microscopia de birrefringência.

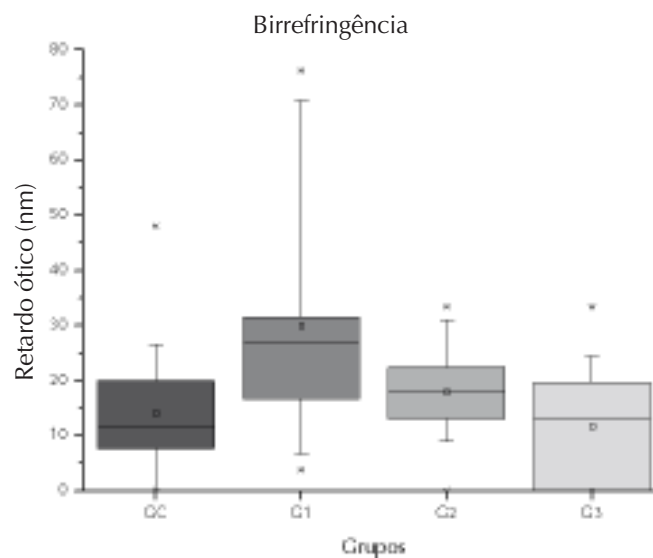


Gráfico 4 Retardo óptico (nm) medido por análise de birrefringência nas lâminas dos grupos GC (controle), G1 (intensidade de 0,3 W/cm²), G2 (intensidade de 1,5 W/cm²) e G3 (placebo)

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi comparar doses baixas e altas (0,3 W/cm² e 1,5 W/cm²) de ultra-som, citadas na literatura^{4,6-9} como eficazes no processo de regeneração do tecido tendíneo, verificando qual a melhor intensidade para o tratamento com UST. E ainda, levando-se em consideração a idade adulta dos animais, verificar sua possível influência no processo de reparo tecidual.

A modalidade pulsada foi adotada e estabelecida como a mais eficaz, com base no estudo de Cunha *et al.*⁷, em que a modalidade da onda ultra-sônica pulsada (1 MHz, regime de 20% e intensidade de 0,5 W/cm²) mostrou ser mais eficaz que a modalidade contínua em lesões tendíneas agudas em processo de reparação, ocorrendo melhor organização, agregação e orientação das fibras colágenas, sendo que a modalidade contínua mostrou produzir até efeitos prejudiciais ao reparo, como maior desorganização do material. Da mesma forma, Yeung *et al.*¹⁰ confirmam a eficácia do tratamento com UST pulsado pelo método de aplicação subaquático em tendão de ratos (2,5 W/cm², 20%, por 5 min), obtendo aumento da síntese de colágeno, melhora do alinhamento e agregação das fibras colágenas, particularmente após quatro semanas de tratamento.

Alguns estudos observaram aumento da força de ruptura do tendão calcâneo lesado de ratos após tratamento com UST contínuo (1,5 W/cm², por 4 minutos) tendo verificado aumento da taxa de reparo, pelo aumento da síntese do colágeno e resistência mecânica (força de ruptura) observada precocemente na primeira semana^{11,12}. Mas, de modo geral na literatura, grande parte dos estudos que mostram a eficácia da ação do UST na regeneração tendínea adotam doses baixas, como 0,5 W/cm² e frequência de 1 MHz^{6,8,13-15}.

Interessante observar que outros estudos^{10,11,16} que aplicaram doses elevadas também demonstraram efeitos positivos na regeneração tendínea, porém na metodologia utilizada o meio de acoplamento foi a água (método subaquático). Segundo Draper *et al.*¹⁷, o método subaquático com água destilada tem eficiência de transmissão de energia de cerca de 59,4%, enquanto no método de contato com gel ultrassônico essa transmissão chegou a 72,6%. Considerando essas perdas, que ocorrem principalmente por reflexão, observa-se que a energia que atinge o tecido alvo são bem menores que as emitidas pelo transdutor. Ng *et al.*¹⁶ avaliaram os efeitos do UST contínuo (subaquático, em 1,0 W/cm² e 2,0 W/cm², por 4 minutos) nas propriedades estruturais e funcionais do tendão calcâneo e concluíram que tanto a dose considerada baixa (1,0 W/cm²) como a alta (2,0 W/cm²) foram efetivas no processo de reparo tendíneo, acelerando a regeneração tecidual e a restauração da força do tendão parcialmente lesado.

Para compreender a importância da ação do UST e avaliar a eficácia de sua intervenção, é necessário observar alguns aspectos fisiológicos do processo de reparo tecidual, especificamente do tecido tendíneo. Considerando-se os eventos celulares, vasculares e da própria matriz extracelular que compõem as fases do processo cicatricial, alguns estudos sugerem que a aplicação do UST nos estágios iniciais do processo de regeneração tendínea pode acelerar a cicatrização, promovendo melhora nas características biomecânicas, como capacidade de

absorção de energia e tensão máxima de ruptura¹⁸, aumento da síntese de colágeno e proliferação de fibroblastos¹⁹, liberação de fatores de crescimento estimulada pela degranulação de mastócitos²⁰, plaquetas e macrófagos, antecipando a fase proliferativa e de remodelamento²¹. Assim, é interessante que o tratamento com o UST, a fim de acelerar o processo cicatricial, seja realizado na fase inicial do processo inflamatório, o que justifica o tratamento já nos primeiros dias de pós-operatório.

Ainda, um estudo de Young & Dyson²¹ sobre a ação do UST na angiogênese, sugere que essa modalidade terapêutica pode influenciar positivamente a fase inicial do processo de reparo tecidual no que se refere à angiogênese, isto é, na fase inflamatória.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na histomorfometria (quantificação de fibroblastos e capilares sanguíneos) entre os grupos analisados, o que pode estar relacionado ao grau de sensibilidade no método aplicado, ou ao fato de todos os grupos terem sido submetidos a estímulo mecânico, uma vez que as patas lesadas não foram imobilizadas. Pode ter ocorrido antecipação ou prolongamento da fase inflamatória pelo uso do USTP, porém como não foi realizada a contagem diferencial das espécies de leucócitos (neutrófilos e macrófagos), não é possível definir por dados quantitativos o estágio da regeneração.

Os resultados da mensuração de espessura dos feixes de colágeno por MFA mostram uma diferença entre o GC e os demais grupos. Levando-se em consideração que o G3 (placebo) não foi submetido aos efeitos do UST, sugere-se que esses resultados podem ser explicados pela manipulação dos animais, provocando estresse mecânico no tendão lesado, gerando efeito piezoelétrico sobre o colágeno pois, exceto no GC, foi feito tração e estabilização da pata lesada durante o tratamento com UST.

Essa hipótese está de acordo com um dos princípios de ação do UST sobre o tecido conjuntivo, no qual o colágeno é

um componente fundamental, que tem comportamento piezoelétrico³. A piezoelectricidade é uma característica de determinadas estruturas que têm a capacidade de conversão de energia mecânica gerada por deformação dimensional em energia elétrica. Em sistemas biológicos, a geração de potenciais elétricos pode ser interpretada como sinalização celular e estímulo para organização tecidual, promovendo, no caso do tendão estimulado pelo UST, melhora da organização e agregação de fibras colágenas por trocas elétricas nas superfícies externas²²⁻²⁴.

O fato de não haver diferença estatisticamente significativa na espessura dos feixes de colágeno entre os grupos G1 e G2 pode ter ocorrido pela mesma hipótese, ou seja, devido à sobreposição, aos efeitos do UST pulsado, ao efeito piezoelétrico do estresse mecânico sobre o tendão causado pela manipulação dos animais.

Os mais recentes estudos para aplicação do UST indicam, pelo menos em parte, a cavitação acústica ou a ação ultrassônica de formação de microbolhas como responsável pelos efeitos do UST – evidenciando, por exemplo, que os efeitos de sonoforese e de transferência de genes são melhoradas na presença de bolhas. A micromassagem é iniciada nos fluidos ao redor das bolhas, conduzindo o estresse nas membranas de células vizinhas, o que pode criar poros transientes através dos quais íons e moléculas podem ser transportados²⁵. No estudo de Barnett *et al.*²⁶ a cavitação é considerada responsável pela maior parte dos efeitos biológicos; tendo usado UST na intensidade de 0,5 W/cm², os autores concluíram que este possivelmente promove efeitos positivos no processo de reparo tecidual devido aos mecanismos da cavitação.

A observação das imagens feitas por microfotografia atômica sugere que a dose de UST mais baixa (0,3 W/cm², aplicada no G1) foi a mais eficiente, pois produziu melhores resultados em relação à dose mais alta (1,5 W/cm²). A diferença qualitativa observada pode estar relacionada à maior energia fornecida

pelo UST no G2, acima do necessário para a regeneração (nessa fase da regeneração no modelo experimental utilizado), como apontado por Cunha *et al.*⁷, sendo as amostras provenientes dos animais do G2 comparativamente mais desorganizadas e irregulares que as do G3.

O resultado da análise da microfotografia por luz polarizada, coincidentemente, mostra o tecido do grupo G1 como o de melhor organização. Da mes-

ma forma, é provável que esse resultado seja devido aos efeitos piezoelétricos do UST e do próprio estresse mecânico, provocado pela manipulação dos animais; e, ainda, à quantidade de energia ideal do UST, fornecida em dosagem eficiente, suficiente apenas para produzir os efeitos desejados. Contudo, mais estudos são necessários para compreensão dos efeitos do USTP sobre a estrutura de tecidos tendíneos em regeneração.

CONCLUSÃO

Conclui-se, com base nos resultados, que o tratamento com UST pulsado, sobretudo na dose de menor intensidade (0,3 W/cm²), mostrou-se eficaz na regeneração tendínea em ratos adultos. Deve-se atentar para os efeitos da manipulação dos animais, gerando atividade piezoelétrica, uma vez que esta pode ter influência sobre o processo de regeneração tecidual.

REFERÊNCIAS

- 1 Wren TAL, Yerby SA, Beaupre GS, Carter DR. Mechanical properties of human Achilles tendon. *Clin Biomech.* 2001;16:245-51.
- 2 Robertson VJ. Dosage and treatment response in randomized clinical trials of therapeutic ultrasound. *Phys Ther Sport.* 2002;3:124-33.
- 3 Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther.* 2001;81(7):1351-58.
- 4 Leung MCP, Ng YF, Yip KK. Therapeutic ultrasound enhances medial collateral ligament repair in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2006;32(1):449-52.
- 5 Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron.* 2003;34(8):423-32.
- 6 Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Salate ACB. Comparative study of the efficacy of topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(3):345-50.
- 7 Cunha A, Parizotto NA, Vidal BC. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Achilles tendon (Tendo Calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol.* 2001;27(12):1691-6.
- 8 Saini NS, Roy KS, Bansal PS, Singh B, Simran PS. A preliminary study on the effect of ultrasound therapy on the healing of surgically severed Achilles tendons in five dogs. *J Vet Med Physiol Pathol Clin Med.* 2002;49(6):321-8.
- 9 Tsai WC, Pang JH, Hsu CC, Chu NK, Lin MS, Hu CF. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor ?. *J Orthop Res.* 2006;24(6):1310-6.
- 10 Yeung CK, Guo X, Ng YF. Pulsed ultrasound treatment accelerates the repair of Achilles tendon rupture in rats. *J Orthop Res.* 2006;24(2):193-201.
- 11 Jackson BA, Schwane JA, Stracher BC. Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 1991;23(2):171-6.
- 12 Frieder S, Weisberg J, Fleming B, Stanek A. A pilot study: the therapeutic effect of ultrasound following partial rupture of Achilles tendons in male rats. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1988;10(2):39-46.
- 13 Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. *Phys Ther.* 1989;69(10):816-25.
- 14 Enwemeka CS, Reddy K. The biological effects of laser therapy and other physical modalities on connective tissue repair processes. *Laser Ther.* 2000;12:22-30.
- 15 Enwemeka CS, Rodriguez OO, Gall NG, Walsh NE. Morphometrics of collagen fibril populations in HeNe laser photostimulation tendons. *J Clin Laser Med Surg.* 1990;8:47-62.
- 16 Ng COY, Ng YF, See EKN, Leung MCP. Therapeutic ultrasound improves strength of Achilles tendon repair in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29(10):1501-6.
- 17 Draper DO, Sunderland S, Kirkendall D, Ricard M. A comparison of temperature rise in human calf muscles following applications of underwater and topic gel ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1993;17(5):247-51.
- 18 Enwemeka CS. The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing: a biomechanical study. *Am J Phys Med Rehabil.* 1989;68(6):283-7.
- 19 Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29(3):326-32.

Referências (cont.)

- 20 Fyfe MC, Chahl LA. Mast cell degranulation: a possible mechanism of action of therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 1982;8(Suppl 1):62.
- 21 Young SR, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. *Ultrasound Med Biol.* 1990;16(3):262-9.
- 22 Yasuda I. On the piezoelectric activity of bone. *J Jpn Orthop Surg Soc.* 1954;28:267.
- 23 Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Jpn.* 1957;10:1158-69.
- 24 Bassett CA, Becker RO. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science.* 1962;137(3535):1063-4.
- 25 Ter Haar GR. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93(1-3):111-29.
- 26 Barnett SB, Ter Haar GR, Ziskin MC, Nyborg WL, Maeda K, Bang J. Current status of research on biophysical effects of ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 1994;20(3):205-18.