

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**FERNANDO MILANEZ DIAS**

**EFEITOS DA FONOFRESE COM IBUPROFENO ASSOCIADO A  
NANOPARTÍCULAS DE OURO EM MODELO ANIMAL DE LESÃO MUSCULAR  
TRAUMÁTICA**

**CRICIÚMA**

**2018**

**FERNANDO MILANEZ DIAS**

**EFEITOS DA FONOFRESE COM IBUPROFENO ASSOCIADO A  
NANOPARTÍCULAS DE OURO EM MODELO ANIMAL DE LESÃO MUSCULAR  
TRAUMÁTICA**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino Pinho

**CRICIÚMA**

**2018**

**FERNANDO MILANEZ DIAS**

**EFEITOS DA FONOFRESE COM IBUPROFENO ASSOCIADO A  
NANOPARTÍCULAS DE OURO EM MODELO ANIMAL DE LESÃO MUSCULAR  
TRAUMÁTICA**

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção do Grau de Doutor em Ciências da Saúde na área de Ciências da Saúde no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Criciúma, 21 de dezembro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira - Orientador

Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico - Relator

Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller - Avaliador

Prof. Dr. Willians Cassiano Longen - Avaliador

Prof. Dr. Alessandro Haupenthal - Avaliador

Fernando Milanez Dias - Doutorando

### **Folha Informativa**

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

*“Se alguém rezar pedindo paciência, Deus dará a paciência ou a oportunidade de ser paciente? Se pedimos coragem, Deus dará a coragem ou a oportunidade de ser corajosos?”.*

*(Trecho do filme “o todo poderoso 2”)*

Dedico este trabalho aos meus pais, minha esposa e  
minha filha, com todo o meu amor!

## RESUMO

As lesões musculares estão entre as lesões mais frequentes na prática esportiva tornando-se as principais causas de afastamento de atletas de suas modalidades. Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que a resposta inflamatória e as espécies reativas de oxigênio produzidas por esse processo estão diretamente envolvidas no processo de recuperação tecidual. Portanto, a gravidade ou regulação desses sistemas pode determinar a eficácia da reparação muscular. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito terapêutico da fonoforese com o fármaco anti-inflamatório ibuprofeno associado a nanopartículas de ouro em músculo esquelético de ratos expostos a um modelo de lesão muscular traumática. Foram utilizados 80 ratos Wistar (2 meses pesando entre 250-300g) divididos em oito grupos: Sham; Lesão muscular (LM); LM + Ultrassom pulsado (USP); LM + Ibuprofeno (IBU); LM + GNPs; LM + USP + IBU; LM + USP + GNPs e LM + USP + IBU + GNPs. O modelo de trauma muscular foi desenvolvido de acordo com Rizzi et al., (2006), onde os animais foram anestesiados com isoflurano 4 %, de forma inalatória, e posteriormente, a lesão no gastrocnêmio foi realizada por um único impacto por trauma direto em prensa lesionadora. Os animais receberam tratamento com ultrassom pulsado com duração de seis minutos, frequência de 1.0 MHz, intensidade de 0.8 W/cm<sup>2</sup>, área de radiação efetiva 1 cm<sup>2</sup> e o gel com nanopartículas de ouro com ibuprofeno foi utilizado sobre o tecido cutâneo como meio condutor do ultrassom. O tratamento com fonoforese foi aplicado diariamente durante 5 dias sendo a primeira sessão 12 horas após a lesão muscular. A área tratada foi a região central do gastrocnêmio. Duas horas após a última sessão de fonoforese, os animais foram mortos por decapitação e o músculo gastrocnêmio foi cirurgicamente removido e devidamente processado e armazenado para as análises histológicas, proteínas inflamatórias, parâmetros de estresse oxidativo e proteínas envolvidas no reparo tecidual. Nas análises de citocinas pró-inflamatórias apenas o grupo LM + USP + IBU + GNPs apresentou uma redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1, com concomitante aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias. Nas análises de estresse oxidativo, apenas o grupo LM + USP + IBU + GNPs apresentou reversão do quadro quando comparado ao grupo LM. Na análise histológica o grupo LM apresentou grande infiltrado celular e núcleo centralizado e apenas o grupo LM + USP + IBU + GNPs demonstrou melhora estrutural, também nos resultados de dor o grupo LM + USP + IBU + GNPs demonstrou diferença significativa em comparação ao LM. Acreditamos que os efeitos da fonoforese com fármacos anti-inflamatórios associados a nanopartículas de ouro possam potencializar a redução da resposta inflamatória e regular o estado redox celular preservando a fibra muscular dos danos adicionais induzidas por esse processo.

**Palavras-chave:** Lesão muscular; Fonoforese, Ultrassom pulsado, Ibuprofeno e inflamação.

## ABSTRACT

Muscular injuries are among the most frequent injuries in athletic practice, becoming the main causes for the removal of athletes of their modalities. In recent years, studies have shown that the inflammatory response and the reactive oxygen species produced by this process are directly involved in the tissue recovery process. Therefore, the severity or regulation of these systems can determine the effectiveness of muscle repair. The objective of this work was to investigate the therapeutic effect of the phonophoresis with the anti-inflammatory drug ibuprofen associated with gold nanoparticles in the skeletal muscle of rats exposed to a model of traumatic muscular injury. We used 80 Wistar rats (2 months weighing between 250-300g) divided into eight groups: Sham; Muscle injury (LM); LM + pulsed ultrasound (USP); LM + Ibuprofen (IBU); LM + GNPs; LM + USP + IBU; LM + USP + GNPs and LM + USP + IBU + GNPs. The muscle trauma model was developed according to Rizzi et al. (2006), where the animals were anesthetized with isoflurane 4%, in an inhalation form, and subsequently, the lesion in the gastrocnemius was performed by a single direct trauma impact on the injured press. The animals were treated with pulsed ultrasound with a duration of six minutes, a frequency of 1.0 MHz, intensity of 0.8 W / cm<sup>2</sup>, effective radiation area 1 cm<sup>2</sup> and the gel with gold nanoparticles with ibuprofen was used on the cutaneous tissue as a conductive medium. ultrasound. The phonophoresis treatment was applied daily for 5 days and the first session was 12 hours after the muscle injury. The treated area was the central gastrocnemius region. Two hours after the last phonophoresis session, the animals were killed by decapitation and the gastrocnemius muscle was surgically removed and properly processed and stored for histological analyzes, inflammatory proteins, oxidative stress parameters and proteins involved in tissue repair. In the pro-inflammatory cytokine analyzes only the LM + USP + IBU + GNPs group showed a reduction in TNF- $\alpha$  and IL-1 levels, with a concomitant increase in the levels of anti-inflammatory cytokines. In the analysis of oxidative stress, only the LM + USP + IBU + GNPs group presented a reversal of the condition when compared to the LM group. In the histological analysis, the LM group presented a large cell infiltrate and a centralized nucleus and only the LM + USP + IBU + GNPs group showed a structural improvement, also in the pain results the LM + group USP + IBU + GNPs showed a significant difference in comparison to the LM (<0.01). We believe that the effects of phonophoresis with anti-inflammatory drugs associated with gold nanoparticles may potentiate the reduction of the inflammatory response and regulate the cellular redox state, preserving the muscle fiber from the additional damages induced by this process.

**Keywords:** Muscle injury; Phonophoresis, pulsed ultrasound, Ibuprofen and inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição da musculatura esquelética (Sophie et al., 2014).....	13
Figura 2 - A imigração de macrófagos tipo 1 e tipo 2 na lesão muscular. ....	18
Figura3-Principais fontes de geração de ERO dentro do músculo traumatizado.....	21
Figura 4 - Visão global do amplo potencial das microbolhas carregadas com drogas (Bart Geers, 2012). ....	22
Figura 5 - Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e a matriz lipídica (penetração transcelular).....	23
Figura 6 - Mecanismo de trauma muscular. (A) A prensa lesionadora sem elevação. (B) Altura para iniciar o impacto (18cm) (C) Momento da queda/impacto a ser realizada em região posterior da pata direita dos animais.....	31
Figura 7 - Ultrassom pulsado terapêutico (Imbramed, Brazil).....	32
Figura 8 - Linha de tempo de indução, tratamento e eutanásia dos animais. Fonte: do autor.....	32
Figura 9 - A. Avaliação da hiperalgesia térmica ao frio. B Avaliação da hiperalgesia Mecânica.....	34
Figura 10 – Microscopia eletrônica de transmissão de GNPs com diâmetro de 20 nm. GNPs esféricas preparadas em solução aquosa. A barra de escala equivale a 5 nm.....	39

Figura 11 - Imagens representativas de cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio corados com coloração de (H&E) de animais submetidos a um protocolo de lesão muscular traumática e tratados com ultrassom terapêutico (USP) (Stewart MD et al, 2016).....40

Figura 12 – Efeitos da fonoforese com GNPs e IBU, sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, após modelo de lesão muscular traumática. Níveis de TNF- $\alpha$  (A), IL1- $\beta$  (B) e IL6 (C), avaliados por ELISA. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).....42

Figura 13 – Efeitos da fonoforese com GNPs e IBU, sobre os níveis de IL-10 e IL-4, após modelo de lesão muscular traumática. Níveis de IL10 (A) e IL4 (B), avaliados por ELISA. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).....43

Figura 14 - Efeitos da fonoforese com GNPs e IBU, ambos sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) (A), os níveis totais de glutathiona reduzida (GSH) (B) e catalase (CAT) (C) 5 dias após lesão muscular traumática. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo controle; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).....44

Figura 15 - Efeitos da fonoforese com GNPs, IBU, ambos sobre os níveis de DCFH (A) e Nitrito (B) 48 horas após 5 dias de lesão muscular traumática. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo controle; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).....45

Figura 16 - Efeitos da fonoforese com GNPs e IBU, ambos sobre os níveis de Carbonil (A) e Sulfidril (B) 5 dias após lesão muscular traumática. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo controle; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey). Fonte: do autor.....46

Figura 17 - Efeitos da fonoforese com GNPs e IBU, ambos sobre a avaliação do escore de nocicepção ao frio 24 horas (A), 120 horas (B). E ao limiar mecânico, 24 horas (C) e 120 horas (D) após modelo de lesão muscular traumática. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo controle; # $p < 0,05$  versus Grupo LM; \$ $p < 0,01$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).....47

## LISTA DE ABREVIÇÕES

Akt - Proteína Cinase B, do inglês Protein kinase B.

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroides.

COX - Ciclo-oxigenase.

CAT – Catalase.

ERO – Espécies reativas de oxigênio.

FGF - *Fator de crescimento* fibroblástico.

GNPs – Nano partículas de ouro, do inglês, Gold Nanoparticles.

GPx - Glutathione peroxidase.

GSH –Glutathione.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio.

IKK – Complexo IκB Cinase.

IKb - Indutor do Fator Kappa B.

IL10 – Interleucina.

IL1B – Interleucina 1b.

IL6 – Interleucina 2b.

M1 – Macrófagos tipo 1.

M2 – Macrófagos tipo 2.

MEF2 - *Potenciador* específico de *miocito*.

MPO – Mieloperoxidase.

NAC – N-acetilcisteína.

MyD88 - Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88.

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida.

NOs – Óxido nítrico sintase.

NFκB – Fator Nuclear Kappa B, do inglês Factor Nuclear Kappa B.

$O_2^-$ . Ânion superóxido.

$^1O_2$ . Oxigênio singlet.

PDGF - *Fator de crescimento* derivado de plaquetas.

SOD - *Superóxido dismutase*.

TRL 4 - *Receptor Semelhante ao Toll da drosophilla, do inglês Toll Like Receptor*.

TNF $\alpha$  - Fator de necrose tumoral.

TGF  $\alpha$  - Fator de Transformação de Crescimento.

USP - Ultrassom pulsado.

VEGF - *Factor de crescimento* Vascular endotelial.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 LESÃO MUSCULAR .....	13
1.2 LESÃO MUSCULAR E INFLAMAÇÃO.....	15
1.3 LESÃO E ESTRESSE OXIDATIVO .....	19
1.4 TERAPIA COM ULTRASSOM PULSADO E FONOFORESE .....	22
1.5 IBUPROFENO.....	25
1.6 NANOTECNOLOGIA.....	26
2 OBJETIVOS .....	29
2.1 OBJETIVO GERAL .....	29
2.1.1 Objetivos Específicos .....	29
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS .....	30
3.2 ANIMAIS.....	30
3.3 MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA.....	31
3.4 TRATAMENTO.....	32
3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO.....	33
3.6 HISTOLOGIA .....	34
3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	35
3.7.1 Espécies Reativas.....	35
3.7.2 Marcadores de danos oxidativos.....	35
3.7.3 Defesas antioxidantes .....	36
3.7.4 Determinação do conteúdo proteico.....	37
3.7.5 Determinação do conteúdo de citocinas.....	37
4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS GNPS .....	37
5 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS.....	39
6 RESULTADOS .....	40
6.1 HISTOLOGIA .....	40
6.2 AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS .....	41
6.3. SISTEMA ANTIOXIDANTE: .....	43
6.4 PRODUÇÃO DE OXIDANTES:.....	44
6.5 DANO OXIDATIVO: .....	45
6.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO.....	46

7 DISCUSSÃO .....	48
8 CONCLUSÃO.....	57
REFERENCIAS.....	58
ANEXO.....	75

.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LESÃO MUSCULAR

Atividades fundamentais para a sobrevivência e manutenção da qualidade de vida como: comer, beber, respirar, andar, trabalhar e inúmeras práticas esportivas estão entre as diversas atividades desempenhadas por cerca de 640 músculos esqueléticos que compõem o corpo humano (Filho et al., 2015). O músculo estriado esquelético é envolvido por tecido conjuntivo denso não modelado, o epimísio. Este envia septos de tecido conjuntivo frouxo, o perimísio, dividindo-o em feixes (ou fascículos) de fibras musculares e levando vasos sanguíneos e linfáticos e nervos. Cada célula muscular é envolvida pela lâmina basal, por fibras reticulares e uma pequena quantidade de tecido conjuntivo frouxo, que formam o endomísio. Ele ancora as fibras musculares entre si e contém capilares sanguíneos e axônios. (Sophie et al., 2014) (figura 1).

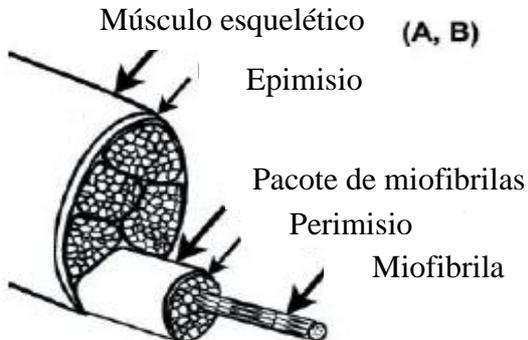


Figura 1 - Composição da musculatura esquelética (Sophie et al., 2014).

Além de ser rica em tecido conjuntivo altamente vascularizado, a musculatura esquelética também possui algumas funções, como movimento, respiração e manutenção da postura (Boldrin e Morgan, 2007). Devido a todas essas funções, o músculo é suscetível a várias lesões na vida diária, como trauma mecânico, estresse térmico, agentes miotóxicos, isquemia, dano neurológico e outras condições patogênicas. A causa mais comum de lesão muscular é trauma mecânico ou lesão direta, que eventualmente leva à degradação de proteínas musculares e necrose (Mendonça e Netto, 2009).

O trauma em atletas pode ser decorrente de uma variedade de mecanismos, dentre eles incluem: lesões diretas (lacerações, distensões, contusões) frequentemente associados como resultado de esportes de contato; e lesões indiretas, relacionadas à isquemia e disfunções neurológicas. Estima-se que aproximadamente 90% das lesões decorrentes do esporte são vinculadas a contusões ou estiramentos. Já as lacerações musculares são as menos frequentes (Matheus et al., 2008; Fernandes et al., 2011; Baoge et al., 2012; Victor et al., 2012; Draghi e et al, 2013).

As lesões diretas podem ser classificadas como: leve, moderada e grave, conforme os aspectos clínicos. Nos casos leves (Grau I), apenas algumas fibras musculares são lesionadas e pode-se observar: edema, desconforto, mínima ou nenhuma perda de força ou restrição ao movimento. Os estiramentos e contusões moderados provocam um maior dano ao músculo com notável perda da função (Grau II). Neste caso, ocorre um discreto hematoma no local com eventual equimose dentro de dois ou três dias. No caso da perda de função muscular e dor intensa a lesão é classificada como estiramento ou contusão grave (grau III) (Fernandes et al., 2011). Os grupos musculares dos membros inferiores são os mais acometidos no esporte de contato e isto tem instigado pesquisadores a averiguar modelos de lesão muscular para analisar o processo de reparo tecidual e procurar outras estratégias terapêuticas para o tratamento das lesões musculares indiferente da causa.

A prática esportiva e a participação em competições nas mais diversas modalidades vêm resultando em crescente número de lesões musculoesqueléticas, as quais representam de 10-55% de todas as lesões no esporte (Filho et al., 2015). No futebol, as lesões musculares esqueléticas são responsáveis por 31% de todas as lesões e a sua prevalência tanto no futebol quanto em outras modalidades no esporte é documentado na literatura internacional. Noventa e dois por cento das lesões que ocorrem no futebol atingem os quatro principais grupos musculares dos membros inferiores: 37% isquitibiais, 23% adutores, 19% quadríceps e 13% gastrocnêmio e sóleo (Gigante et al., 2013). Estas lesões frequentemente são decorrentes de uma hiperextensão, uma contração forçada de um membro, por contusão direta ou até mesmo pelo desgaste da musculatura esquelética (Victor et al., 2012).

O traumatismo direto desencadeia um processo inflamatório imediato, com dor localizada, edema, presença ou não de hematoma, impotência funcional

com limitação da força e da mobilidade articular, rigidez e dor ao alongamento passivo. Os músculos mais frequentemente acometidos por contusões são: quadríceps e gastrocnêmicos. O músculo gastrocnêmico especificamente, por ser extremamente exigido nas atividades físicas de extremo impacto e possuir um risco aumentado de lesões e rupturas têm sido bastante investigado. (Matheus et al., 2008; Filho et al., 2015). Em humanos, os músculos gastrocnêmio e sóleo contribuem entre 22 e 35,8% do impulso total necessário para realização do salto vertical, e devido a essas características, o músculo gastrocnêmico é muito suscetível a lesões (Andrade et al., 2007).

O processo de regeneração após a lesão muscular envolve etapas específicas: degeneração ou necrose, inflamação, reparação e remodelamento. Embora os processos biológicos destas fases têm muita sobreposição, suas diferentes etapas, podem ser muito distintas em pontos de tempo sequenciais quando descritas por análise histológica por exemplo (Fielding et al., 1993; Tidball, 2010; Frenette et al., 2000; Macintyre et al., 2000).

Essas lesões, levam trauma ao tecido muscular, perturbando a integridade do sarcolema e lâmina basal, caracterizada pela ruptura e posterior necrose das miofibrilas, lesão dos vasos sanguíneos com formação de hematoma entre os cotos das miofibrilas, bem como, o deslocamento do núcleo celular para o centro da célula, o que ocorre como meio de proteção (Jankowski et al., 2002). 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 reiteração (Grounds, 1991). Entender as etapas do processo de regeneração muscular é fundamental para adequar as condutas à fase de recuperação do tecido.

## 1.2 LESÃO MUSCULAR E INFLAMAÇÃO

As lesões musculares são muito comuns em traumatologia e medicina desportiva e a sua recuperação consiste de eventos moleculares e celulares responsáveis pela reparação funcional. Embora o tecido tenha a capacidade de se regenerar, o processo cicatricial pode ser lento e muitas vezes incompleto (Chan, 2003; Filho et al., 2015). O processo de reparação tecidual pós-lesão, compõe-se de

três fases diferentes que se sobrepõem de forma contínua e temporal e que estão inter-relacionadas: degeneração/inflamação, reparação e remodelação.

A fase degenerativa é caracterizada por uma ruptura das fibras musculares, a qual resulta em necrose das miofibrilas, formação de hematoma e reação celular inflamatória. A necrose é caracterizada pelo rompimento do sarcolema e resulta no aumento da permeabilidade da fibra muscular, o que conseqüentemente acarreta no extravasamento de proteínas musculares normalmente restritas ao sarcoplasma, como a creatina quinase (CK), miosina de cadeia pesada (MHC) e troponina, para o plasma sanguíneo (Werner e Grose., 2003). Todo este processo degenerativo inicial induz à uma reação inflamatória, a qual é responsável pela eliminação de invasores estranhos, como agentes infecciosos e células lesionadas. Portanto, a inflamação é considerada uma resposta protetora que envolve células do hospedeiro, vasos sanguíneos, proteínas e outros mediadores, destinada a eliminar a causa inicial da lesão celular, bem como as células e tecidos necróticos que resultam da lesão original e iniciar o processo de reparo. A inflamação realiza sua função protetora diluindo, destruindo ou neutralizando os agentes nocivos (p. ex., micróbios e toxinas). Ela movimenta os eventos que curam e reparam os sítios de lesão. Sem inflamação, as infecções prosseguiriam sem controle e as feridas jamais cicatrizariam (Souza et al., 2013).

O período inicial do processo inflamatório é caracterizado por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia de neutrófilos para o local da lesão. A fase inflamatória aguda tem início com o reconhecimento do antígeno com posterior liberação de citocinas pró-inflamatórias estimulando a inflamação e a migração de leucócitos para local afetado (Bogliolo, 2004; Kumar, 2013). Esta etapa é acompanhada pela migração primeiramente de neutrófilos, seguidos por macrófagos fagocitários (M1) para o local da lesão, com o intuito de remover o tecido necrosado (Tidball, 2005). Souza et al., (2013) afirma que os neutrófilos, são as células reponsáveis pela liberação de citocinas que atraem e ativam outras células imunes durante as 6 primeiras horas. Seguido à esta intensa atividade fagocítica por macrófagos (M1) ocorre a proliferação inicial de células satélites entre o 2º e 3º dias após a lesão.

As células imunes infiltradas, como mastócitos e neutrófilos, podem ajudar a limpar os miotubos danificados no local da lesão. A degranulação dos mastócitos é uma das primeiras respostas inatas do sistema imunológico envolvidas

no dano muscular e no reparo que leva aos eventos inflamatórios consequentes. A degranulação de mastócitos é frequentemente observada em áreas circundantes de miofibrilas lesadas. Após lesão muscular, os mastócitos residentes no músculo esquelético são rapidamente ativados. Após a ativação, as células satélites degranulam e liberam citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL1  $\beta$ ) e histamina para recrutar mais mastócitos, neutrófilos e outras células imunitárias para o local da lesão (Radley e Grounds, 2006; Gordon e Galli, 1990). Como resultado, mais mastócitos e neutrófilos se infiltraram na lesão para promover a inflamação (Gorospe et al., 1996).

Os neutrófilos são um dos tipos de células imunes mais importantes na fase pró inflamatória após lesão muscular. Como os mastócitos, os neutrófilos residentes nos músculos esqueléticos podem ser ativados imediatamente após a lesão muscular e liberar as citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-  $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), IFN-  $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) e IL-1 $\beta$  (interleucina- 1 $\beta$ ) (Fielding et al., 1993; Hawke e Geary, 2001). Estes são atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas pelas plaquetas. Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana). Neutrófilos produzem radicais livres que auxiliam na limpeza da área lesada e são gradativamente substituídos por macrófagos do tipo 1, M1 (figura 2) derivados de monócitos (48 a 96 horas após a lesão) antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação. Sua função principal neste processo é de eliminação de possíveis microorganismos pela fagocitose (Balbino et al., 2005; Da Silva et al., 2010).

O número de macrófagos aumenta significativamente 2 dias após a lesão, juntamente com o declínio rápido do número de neutrófilos (Chazaud et al., 2009; Tidball, 2005). Os macrófagos desempenham papéis centrais na regulação da regeneração do músculo esquelético. Durante o processo de regeneração muscular, essas células passam por dois estágios diferentes de ativação e são categorizados em dois tipos principais: os macrófagos M1 classicamente ativados e os macrófagos alternativamente ativados M2 (Biswas e Mantovani, 2010). Os macrófagos M1 são pró inflamatórios, enquanto os macrófagos M2 são antiinflamatórios (Mantovani et al., 2004). No estágio inicial da regeneração muscular, os macrófagos M1 são o tipo de macrófagos mais dominante.

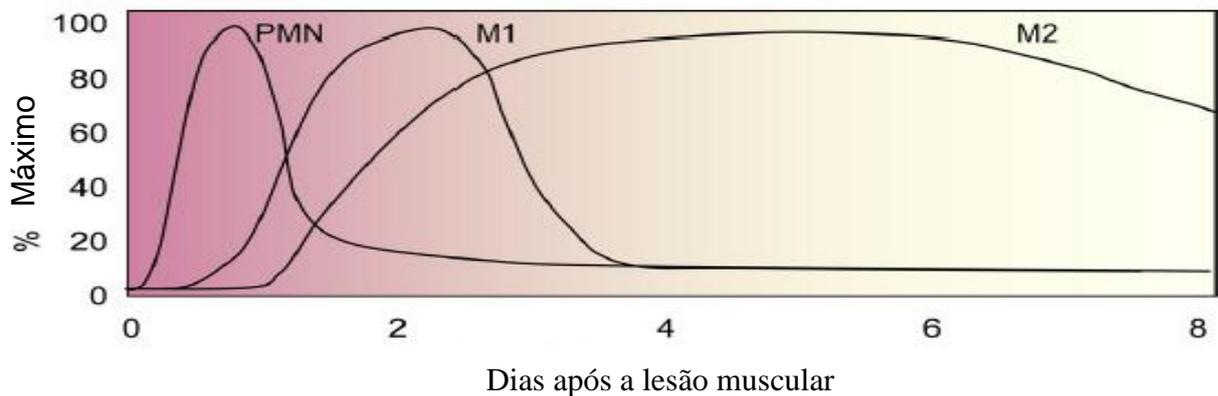


Figura 2 – A imigração de macrófagos tipo 1 e tipo 2 na lesão muscular (James G. Tidball e Armando Villalta, 2010)

Os macrófagos M1 funcionam inicialmente para remover os detritos musculares gerados pelo trauma. Os macrófagos M1 infiltrados na lesão também secretam grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Madaró e Bouche, 2014). Resultados encontrados por Abat et al., (2015), apontam que o aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  pode promover a inibição de síntese de proteínas no tecido muscular; e valores elevados de TNF- $\alpha$  podem causar inibição da diferenciação dos mioblastos pelas células satélites, limitando a resposta regenerativa.

Após secretadas, essas citocinas pró-inflamatórias, irão induzir a fosforilação de cascatas de sinalização principalmente das MAPs quinases ativando o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Em estado inerte, ou seja, sem estímulo nocivo celular, NF- $\kappa$ B está inativo por associação com a proteína I $\kappa$ B, quando ativado uma proteína kinase IKK fosforila I $\kappa$ B dissociando e levando a ubiquitinação e degradação da mesma. Após a dissociação, o NF- $\kappa$ B também é liberado com posterior translocação do citosol para núcleo celular ligando-se a sequências específicas do DNA promovendo a transcrição de genes alvos (Spinosa et al., 2006; Hayden, 2012).

Cerca de 4 dias após a lesão, há predominância de macrófagos não fagocíticos (M2). Neste prazo temos o término da fagocitose e da liberação de citocinas pró-inflamatórias: é o início da fase de reparo, com regeneração das fibras musculares e produção de tecido cicatricial conectivo. Nesta etapa temos liberação de citocinas anti-inflamatórias (interleucina-10/ IL-10 e Interleucina/ IL-4) e fatores de crescimento (TGF- $\alpha$ , Miogenina, MEF2) os quais irão estimular a proliferação e

diferenciação celular pelas células satélites, a deposição de colágeno e a angiogênese (Tidball, 2010). Segundo Minamoto e Salvini (2002), a atividade mioblástica ocorre no 6º dia após a lesão. Estas citocinas anti-inflamatórias auxiliam o reparo com aumento do número de células satélites bem como deposição de colágeno para modelagem do tecido e síntese de matriz extracelular (Tidball, 2010).

Ao final da fase inflamatória, inicia-se a fase de maturação ou remodelamento, que possui como característica mais relevante a deposição de colágeno de maneira organizada, e que devido a este contexto é considerada a fase mais importante clinicamente. Esta etapa é acompanhada pela fase de angiogênese com formação de novos vasos para fazer o reparo completo da lesão. Estudos realizados anteriormente sobre a lesão muscular traumática evidenciaram que este tipo de lesão ocasiona um elevado grau de inflamação e por consequência desenvolve outras condições mais graves como: degeneração tecidual, respostas imunes, perda da função e por consequência um desequilíbrio na condição biológica tecidual ocasionando o estresse oxidativo e um aumento constante das ERO (Silveira et al., 2012; Victor et al., 2012; Silveira et al., 2013). Portanto, afim de alcançar o processo de regeneração tecidual satisfatório, faz-se importante detectar a inflamação no estágio precoce visando seu controle, pois uma resposta inflamatória tardia, excessiva e/ou prolongada pode atrasar a regeneração tecidual, danificar fibras musculares, e até mesmo ocasionar fibrose muscular gerando uma lesão crônica (Stevenson, 2011; Liu et al., 2015).

### 1.3 LESÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

Uma das causas da ativação da inflamação, se dá pelo aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) como ânion superóxido e radical hidroxil em sangue e tecidos humanos e de animais, durante e após a lesão muscular (Pattwell, 2004). Durante a resposta inflamatória outras espécies reativas vão se formando como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) (Matsuo e Kaneko, 2001).

O aumento da produção das ERO, tem como consequência degeneração tecidual, respostas imunes, perda da função e por consequência um desequilíbrio na condição biológica tecidual, ocasionando o estresse oxidativo e um aumento constante das ERO (Silveira et al., 2012; Victor et al., 2012; Silveira et al., 2013).

Em concentrações fisiológicas, ERO desempenham importante papel na manutenção de funções celulares, como defesa, porém, quando produzidas em excesso, podem provocar estresse oxidativo, causando danos aos constituintes celulares como lipídeos, proteínas e DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007; Martins et al., 2016). Peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e fragmentação de ácidos nucléicos, resultando em disfunção ou morte celular e/ou no desenvolvimento de doenças (Valko et al., 2007; Roberts e Sindhu, 2009; Talukder, 2011) são alguns exemplos de prejuízos causados pelo excesso de ROS. Segundo Kalyanaraman (2013), o limite fisiológico e patológico do dano oxidativo pode ser uma função da extensão, duração e/ou de origem celular das espécies reativas produzidas.

Os principais e mais importantes mecanismos de produção de ROS na lesão muscular são: o aumento na produção de superóxido mitocondrial, a ativação do complexo NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido) oxidase e a ativação da xantina oxidase (Figura 3). Na mitocôndria, uma das formas de produção de ERO é devido ao escape de elétrons entre o complexo I e ubiquinona e entre ubiquinona e o complexo III gerando maior parte dos superóxidos produzidos (Drose e Brandt, 2012). Estima-se que de 2-4% do oxigênio mitocondrial seja reduzido a superóxido (Halliwell e Gutteridge, 2007). Para Robbins (1995), lesões celulares, como no tecido muscular, são acompanhadas por alterações funcionais e morfológicas nas mitocôndrias, em que o aparecimento de poros na membrana, altera sua permeabilidade permitindo entrada ou escape de substâncias e prejudicando a homeostase, podendo levar à morte celular.

A ativação de leucócitos, após o dano muscular, estimula a produção ERO, em particular, os neutrófilos são as maiores fontes de produção de superóxido pela reação NADPH-oxidase. O complexo NADPH oxidase produz quantidade significativas de superóxido em diferentes tecidos. Essa formação ocorre a partir da transferência de elétrons para o oxigênio em processos em que o tecido lesionado apresenta elevado consumo do mesmo. Este processo é conhecido como "*respiratory burst*" (Jiang et al., 2011) e ocorre em situações de intensa fagocitose. A geração de metabólitos do oxigênio resulta da rápida ativação de uma NADPH-oxidase de leucócito, chamada *oxidase de fagócito*, que oxida o NADPH, e no processo, converte o oxigênio em íon superóxido ( $O_2\bullet$ ). O superóxido é então convertido, por desmutação espontânea, em peróxido de hidrogênio ( $O_2\bullet + 2H^+ \rightarrow$

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Essas ERO atuam como radicais livres e destroem os micróbios. As quantidades produzidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são geralmente insuficientes para destruir a maioria das bactérias. No entanto, os lisossomos dos neutrófilos (chamados de *grânulos azurófilos*) contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), que, na presença de um halóide como o Cl<sup>-</sup>, converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em HOCl• (radical hipocloroso). O HOCl• é um potente oxidante e agente antimicrobiano (o NaOCl é o ingrediente ativo nos alvejantes) que destrói bactérias por halogenação ou por oxidação de proteínas e lipídios (Robbins, 2010). A XO liga-se a um elétron da redução do O<sub>2</sub> e forma o superóxido. A XO também pode ser convertida da forma reduzida (xantina desidrogenase) para forma oxidada por proteases intracelulares que pode ser ativada pelo cálcio. Além disso, citocinas como IL-1β e TNF-α podem aumentar a produção de oxidantes por uma estimulação direta de neutrófilos que produzem radical superóxido, aumentando a atividade da XO. Portanto, é necessário um balanço coordenado na produção de oxidantes após lesão muscular, para sinalizar células imunes sem ocorrência de dano oxidativo (Page e Powell, 1998).

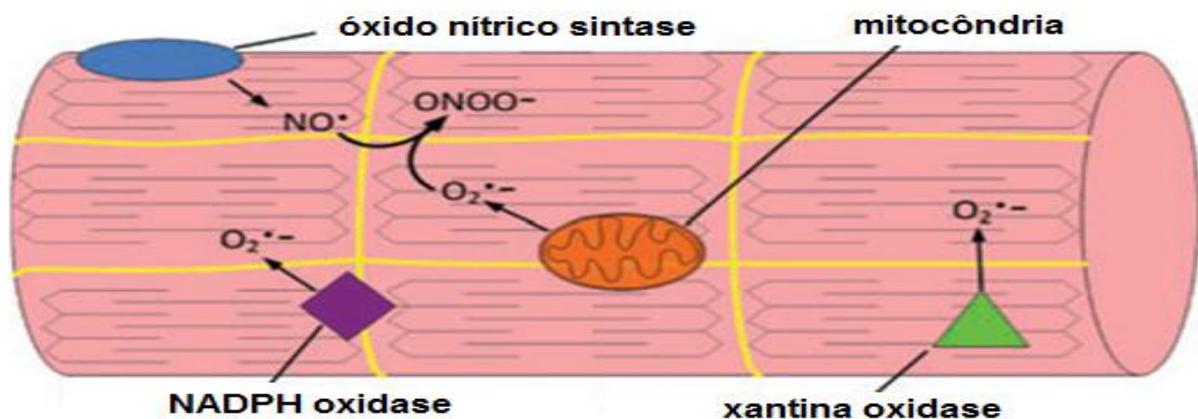


Figura 3 - Principais fontes de geração de ERO dentro do músculo traumatizado (Powers et al., 2009).

Dentre os principais danos oxidativos, está a lipoperoxidação, processo de oxidação de lipídeos resultante do ataque de ERO à membrana celular. Como resultado, as membranas sofrem alterações na fluidez e na permeabilidade, levando ao desequilíbrio homeostático e a morte celular (Matsuo e Kaneko, 2001). As proteínas também são alvo de ataques dos ERO. A oxidação dos aminoácidos resulta na formação de grupos carbonila, tióis oxidados, podendo levar a alterações na função normal da proteína. Outro alvo importante é o DNA. A formação de ERO próximo ao DNA pode resultar na oxidação de bases pirimidina e purina. Dentre as

bases, a guanina é altamente sensível à oxidação mediada por radicais livres. Essas alterações no DNA têm sido associadas à processos mutagênicos e carcinogênicos (Halliwell e Gutteridge, 2007). As defesas antioxidantes podem atuar de forma associada ou independente por duas vias: enzimáticas, sistema constituído por enzimas SOD, CAT e GPx. Essas enzimas são ativadas normalmente durante o metabolismo celular, porém suas atividades podem aumentar em função da presença aumentada de ERO. As vias não enzimáticas incluem as vitaminas E, C e betacaroteno, glutathione (GSH), N-acetilcisteína (NAC), entre outros (Urso e Clakson, 2003; Halliwell e Gutteridge, 2007).

#### 1.4 TERAPIA COM ULTRASSOM PULSADO E FONOFORESE

O ultrassom pulsado (USP) é uma terapia não invasiva que promove a regeneração e cicatrização muscular devido a seus efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos. A ação terapêutica não-térmica do USP se dá por meio da cavitação, estimulando o transporte de substâncias e aumentando a permeabilidade de membrana (Wilkin, 2004). É geralmente aceito que há três formas de aumentar a permeabilidade de membrana: (1) Convecção (fluxo acústico e redução da camada limite resultante) (Brucks et al., 1989; Simonin, 1995; Mitragotri et al., 1996), (2) Cavitação (Mitragotri et al., 1996; Tezel e Mitragotri, 2002; Polat et al., 2011) e (3) efeitos térmicos (Simonin, 1995; Polat et al., 2011). A forma mais efetiva é através da cavitação acústica, definida como o processo em que as bolhas de gás interagem com as pressões acústicas e oscilam em torno de um raio de equilíbrio (Tezel e Mitragotri, 2002; Dalecki, 2004; Polat et al., 2011;) (Figura 4).

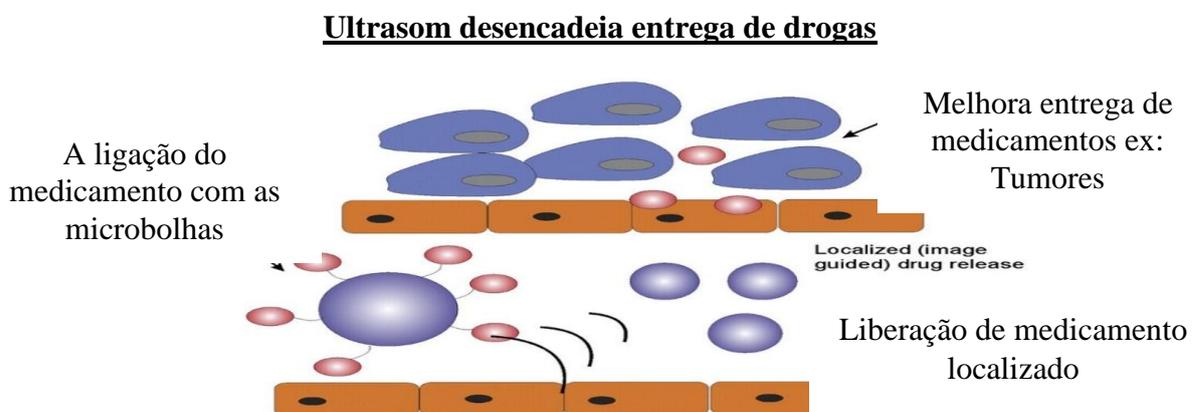


Figura 4 - Visão global do amplo potencial das microbolhas carregadas com drogas (Geers et al., 2012).

A cavitação é um fenômeno geral, associado com muitos efeitos físicos diferentes, podendo facilmente ser facilitador de entrada de alguns fármacos, tais como corticoesteróides (triamcinolona acetonida), anestésicos (lidocaína), agentes imunossupressores (ciclosporina), hormônios (insulina) e agentes anti-inflamatórios (diclofenaco e ibuprofeno) os quais são bem investigados na literatura (Liu et al., 2006; Kim et al., 2007; Yang et al., 2008; Silveira et al., 2012).

Um fármaco pode atravessar o estrato córneo através de três diferentes vias (Figura 5). São elas: via intercelular: o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica; via transcelular: o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária; via apêndices: rota paralela, na qual os fármacos podem ser absorvidos pelo folículo piloso, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (Gratieri et al., 2008).

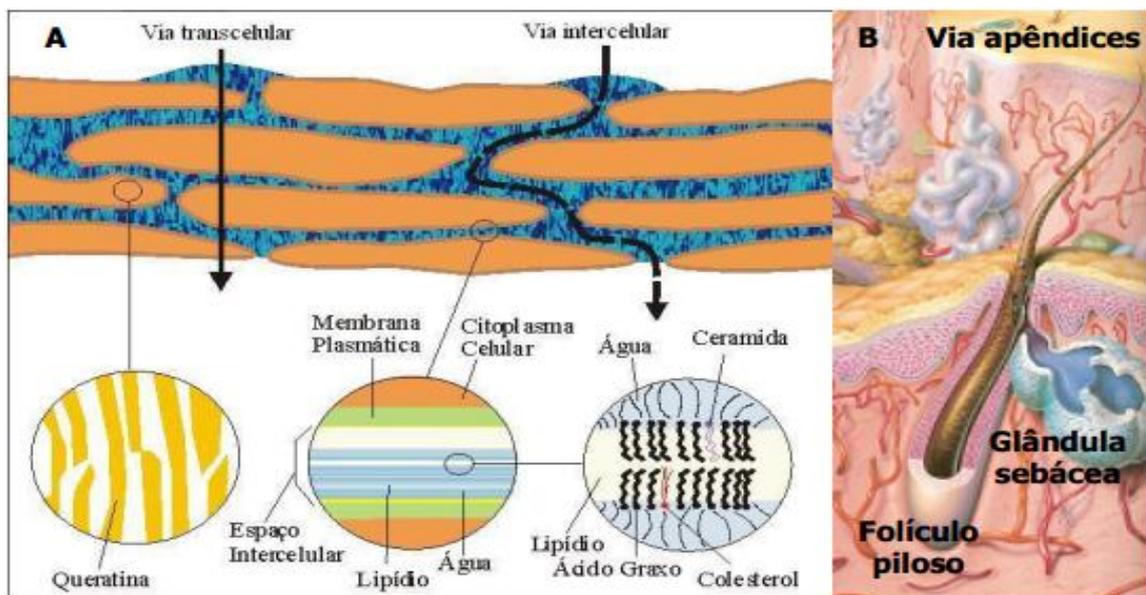


Figura 5 - A) Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular). B) Através dos corneócitos e a matriz lipídica (penetração transcelular) (Adaptado por Gratieri et al., 2008).

A fonoforese é a migração de moléculas de fármacos através da pele por estímulo mecânico por ultrassom (Hill et al., 2005). A eficiência do transporte transdérmico de fármacos induzido por ultrassom varia de 10 a 100 por cento, dependendo dos parâmetros do ultrassom e o tipo de fármaco. Assim esta técnica permite que os fármacos alcancem uma alta concentração local, enquanto que a

exposição sistêmica é minimizada (Hill et al., 2005; Alfredo et al., 2009; Silveira et al., 2012).

Pesquisadores observaram resultados variados em relação à benefícios terapêuticos da fonoforese (como alívio da dor e melhor amplitude de movimento) para tratar epicondilite (Stratford et al., 1989), dor na articulação temporomandibular, (Wing, 1982) e osteoartrite condições clínicas (Pottenger e Karalfa, 1989). A maioria dos autores, demonstrou que, quando comparado com tratamentos com placebo ou ultrassom isoladamente, a fonoforese proporciona melhora clínica pela diminuição dor e aumento da função.

Como mencionado anteriormente, eficácia do ultrassom na facilitação à entrega de vários medicamentos, como corticóides (triancinolona acetonido), anestésicos (lidocaína), imunossupressores agentes (ciclosporina), hormônios (insulina) e antiinflamatórios agentes químicos (diclofenaco, dimetilsulfóxido) já vem sendo investigada (Silveira et al., 2012; Park et al., 2013). Drogas anti-inflamatórias promovem inibição reversível das ciclooxigenases 1 e 2, que reduz a formação de precursores de prostaglandinas (mediadores inflamatórios), mas a administração oral dessas drogas, podem ter efeitos colaterais gastrointestinais, como dor abdominal, ulceração e irritação da mucosa gástrica, tornando estes medicamentos mais adequados para aplicação transdérmica (Herwadkar et al., 2012; Maestrelli et al., 2005).

Somados esses fármacos e a energia de baixa intensidade do USP, chega-se à conclusão que a fonoforese pode potencializar o reparo de tecidos. Trabalhos incluem um efeito anti-inflamatório caracterizado por uma redução na contagem total de leucócitos e macrófagos uma hora após a lesão muscular, além da resolução do processo inflamatório crônico, melhora do fluxo de sangue no músculo em isquemia crônica e a angiogênese (Gratieri et al., 2008; Signori et al., 2011; Tsuang, 2011). Estudos mostram que a fonoforese associada ao diclofenaco e ibuprofeno promove uma diminuição da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) induzida em ratos artríticos (Hsieh, 2018). A fonoforese com lidocaína apresentou um aumento no limiar de dor e significativa mudança no potencial de ação dos nervos sensitivos (Kim et al., 2007).

A entrega transdérmica de drogas oferece várias vantagens em relação aos sistemas de administração de fármacos tradicionais (tais como a entrega oral e injeções) incluindo supressão do metabolismo de primeira passagem, a minimização

de dor, e de liberação sustentada do possível medicamento (Bronaugh e Maibach, 1989).

## 1.5 IBUPROFENO

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. São utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios músculo-esqueléticos, e podem ser seletivos ou não. Os anti-inflamatórios não hormonais, incluindo o ibuprofeno, estão entre os medicamentos mais comumente usados dentro dessa classe (Sonaje et al., 2007; Warner et al., 1999).

Esta classe de drogas inibe as enzimas ciclo-oxigenase (COX), que convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (Rao et al., 2008). Prostaglandina H2 sintase, mais conhecida como ciclooxigenase, é uma glicoproteína dimérica integral da membrana, encontrada predominantemente no retículo endoplasmático. Atua como efetor secundário na via metabólica da cascata do ácido araquidônico. Nas células dos mamíferos existe pelo menos duas isoformas: COX-1 e COX-2 e acredita-se existir a COX-3. Estas enzimas são responsáveis pela formação de importantes mediadores biológicos, chamados prostanóides (incluindo prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano). A inibição farmacológica da COX pode causar alívio dos sintomas da inflamação e da dor (Bondesen et al., 2004).

Grande parte das evidências de interação entre as atividades secretoras de fagócitos, crescimento muscular e regeneração foi baseada na observação de que a administração de AINEs em indivíduos ou animais experimentais poderia afetar o curso da reparação muscular (Mishra et al., 1995). Como vimos, AINEs são fortes inibidores da ciclooxigenases (COX), e assim, podem prejudicar o metabolismo do ácido araquidônico que é necessário para a síntese de prostaglandinas (Bondesen et al., 2006). As prostaglandinas são capazes de afetar a proliferação, diferenciação e fusão (Zalin, 1987), e também são capazes de modular o crescimento da fibra muscular, a síntese e degradação de proteínas no músculo (Smith, 1983).

O grau de inibição da atividade da COX-1 e COX-2 no sangue total, *in vitro*, induzido pelos AINEs individualmente, mostrou que, com exceção do naproxeno e ibuprofeno, todos os outros inibiram a COX-2 mais intensamente que a COX-1, em concentrações terapêuticas (Bondesen et al., 2004). Porém sua administração por via oral possui alguns efeitos colaterais prejudiciais, como por exemplo gastrointestinais, como dor abdominal, formação de úlceras e irritação da mucosa gástrica. Tornando assim essas drogas mais adequadas para a transmissão dérmica. (Rahusen et al., 2004; Maestrelli et al., 2005; Herwadkar et al., 2012). Devido a esses efeitos colaterais atualmente muitos pesquisadores estão desenvolvendo tecnologias para administração tópica desses medicamentos para menor ação sistêmica.

Mesmo sabendo que há muitos avanços no entendimento dos mecanismos inflamatórios, necessitam de mais estudos sobre o tratamento da inflamação muscular. Atualmente o uso de nanopartículas de ouro está sendo muito utilizada no tratamento de várias condições inflamatórias, como no tratamento de lesões epiteliais, musculares, câncer e recentemente em modelo de Alzheimer. Entretanto, a associação entre fármacos anti-inflamatórios e as nanopartículas de ouro ainda não foi descrita, podendo alcançar efeitos promissores no tratamento de lesões musculares.

## 1.6 NANOTECNOLOGIA

A Nanotecnologia é um campo em desenvolvimento e possui um enorme potencial para impactar positivamente nas áreas da pesquisa em saúde. Importantes aplicações da nanotecnologia estão sendo empregadas na área da saúde e o conhecimento básico da interação dos nanomateriais com as células e suas consequências biológicas estão começando a evoluir (Bhattacharya e Mukherjee, 2008; Arvizo et al., 2013). A utilização das nanopartículas no campo biomédico tem demonstrado aumento devido à estabilidade química, facilidade de síntese e processo de fabricação, biodisponibilidade e não interferência com outros biomateriais, propriedades ópticas marcantes e baixa citotoxicidade (Arunachalam et al., 2014).

Dentre as nanopartículas, destacam-se as nanopartículas de ouro (GNPs) que recebem atenção especial devido às suas propriedades ópticas, eletrônicas,

redox e catalíticas (Daniel e Astruc, 2004). Além disso, as GNPS são consideradas ideais para pesquisa por terem preparo simples e forte tendência à ligação com grupamentos tióis e aminas (Hainfeld et al., 2006; Bhattacharya e Mukherjee, 2008). Outra justificativa à escolha pelo ouro deve-se à sua natureza relativamente não reativa e segura. Na medicina indiana, o ouro é usado para o tratamento de várias doenças. Na alopatia, o ouro vem sendo utilizado para tratar inflamações e artrite (Shukla et al., 2005).

No entanto, uma série de questões permanece sem resposta, como o destino das GNPs após sua entrada nas células. O estudo de Shuka et al., (2005) demonstra que a endocitose é a principal rota para a entrada das GNPs nas células e conforme Chithrani et al., (2003) permanecem principalmente nos endossomos, camada dupla esférica de lipídios da membrana.

Estudos indicam que a absorção celular das nanopartículas é dependente de propriedades como tamanho, forma e superfície (Chithrani et al., 2003; Shuka et al., 2005; Hyllier e Albertch, 2001). O estudo *in vivo* de Hyllier e Albertch (2001), mostrou que em camundongos as GNPs administradas oralmente apareciam em vários tecidos e que a quantidade de absorção e distribuição no corpo se correlacionava inversamente com o tamanho das partículas, portanto, quanto menor a partícula maior seu grau de permeabilidade celular. (Hyllier e Albertch, 2001). Sonavane, (2008) avaliou a distribuição biológica de GNPs por administração intravenosa com a sintetização em diversos tamanhos: 15, 50, 100 e 200 nm. Seus resultados afirmam que as GNPs são excelentes moléculas carreadoras com permeabilidade pela membrana na forma transcutânea dependente do tamanho.

Na maioria dos estudos analisados, as GNPs administradas sistemicamente foram absorvidas em grande quantidade principalmente pelo fígado e baço, e em pequenas quantidades no pulmão, rim, coração e cérebro, demonstrando baixa toxicidade (Kurniawan et al., 2017).

Estudos vem sendo realizados visando investigar os potenciais efeitos antiinflamatório e antioxidante das GNPs (Chen, 2013; Karthick et al., 2014; Silveira et al., 2014). Larsen et al., ( 2008) analisou os efeitos anti-inflamatórios *in vivo* dos íons de ouro sobre a supressão de macrófagos ativados e de danos na micróglia. Um trabalho de Sumbayev et al., (2013), demonstrou pela primeira vez, que as GNPs estabilizadas por citrato diminuiram, de maneira dependente do tamanho, a resposta celular induzida por IL-1- $\beta$  *in vitro* e *in vivo*. Também foi

observada reduções dos escores histológicos, densidade de microcapilares e infiltração de macrófagos em um modelo experimental de artrite. Tsai (2007) também investigou o uso de GNPs em modelo animal de artrite.

Além dos efeitos anti-inflamatórios, estudos vem sendo realizados acerca do papel antioxidante das GNPs (Barathmanikanth et al., 2010; Sul et al., 2010). O uso de GNPs em modelo de queimadura associadas à microcorrente demonstrou aumento na atividade da cadeia respiratória, diminuição do dano celular e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Silveira et al, 2014).

O papel efetivo da GNPs como agente antioxidante, é demonstrado através da relação direta da GNPs com os radicais livres, ocorrendo a absorção desses radicais sobre a superfície das nanopartículas, e a possibilidade de interação de troca entre o elétron não emparelhado dos radicais livres e os elétrons de condução de banda desses metais (Zhang et al., 2003). Modelos animais de condições inflamatórias realizados in vivo também demonstraram propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes das GNPs (Araújo et al., 2016; Tsai et al., 2012; Dohnert et al. 2012; Sumbayev et al. 2013).

A partir destes mecanismos descritos e devido aos efeitos terapêuticos isolados das terapias apresentadas, o objetivo desta tese foi avaliar os efeitos da fonoforese com ibuprofeno associado a nanopartículas de ouro em modelo animal de lesão muscular traumática.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da fonoforese com ibuprofeno associados com nanopartículas de ouro em um modelo de lesão muscular traumática.

#### **2.1.1 Objetivos Específicos**

Avaliar os efeitos do tratamento de fonoforese com ibuprofeno associado as nanopartículas de ouro em um modelo animal de lesão muscular traumática.

- a) Análise histopatológica da histoarquitetura muscular;
- b) A produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e danos oxidativos;
- c) Os níveis proteicos (ELISA) de citocinas pró inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL6) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL4);
- d) O efeito analgésico através da avaliação de hiperalgesia ao frio e hiperalgesia mecânica.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido para a Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, para avaliação e foi aprovado sob o número **010/2017-1**, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7) Anexo A.

#### 3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 80 ratos Wistar (2 meses pesando entre 250-300 g), provindos da colônia de reprodução do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Cada grupo teve um “n” de dez animais devido às análises histológicas, bioquímicas e moleculares. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas (comprimento 30 cm x Largura 20 cm x altura 13 cm) colocados sobre estantes e sobre os cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente foi controlada entre  $20 \pm 22^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em mamadeiras para roedores e ofertada *ad libitum*. Os animais foram divididos em 8 grupos com 10 ratos cada:

Grupo 1 – Controle

Grupo 2 – Lesão Muscular

Grupo 3 – LM + USP (Ultrassom pulsado  $0.8 \text{ W/cm}^2$ ) e gel salina (0,9%)

Grupo 4 – LM + GNPs (gel com GNPs – 20 mg/Kg)

Grupo 5 – LM + IBU (Ibuprofeno 2%)

Grupo 6 – LM + USP + GNPs

Grupo 7 – LM + USP + IBU

Grupo 8 – LM + USP + IBU + GNPs

### 3.3 MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA

O modelo de trauma muscular foi desenvolvido de acordo com Rizzi et al. (2006). Os animais foram anestesiados com isoflurano a 4%. Posteriormente, a lesão no gastrocnêmio foi realizada por um único impacto direto em prensa desenvolvida pelo Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS, Brasil). A lesão foi produzida por deslocamento de uma massa metálica (0,459 Kg) através de uma guia com 18 cm de altura. O impacto produz uma energia cinética de 0,811 J, conforme especificações do equipamento. Os animais controles foram anestesiados para assegurar a padronização, porém expostos ao equipamento sem receber trauma muscular.

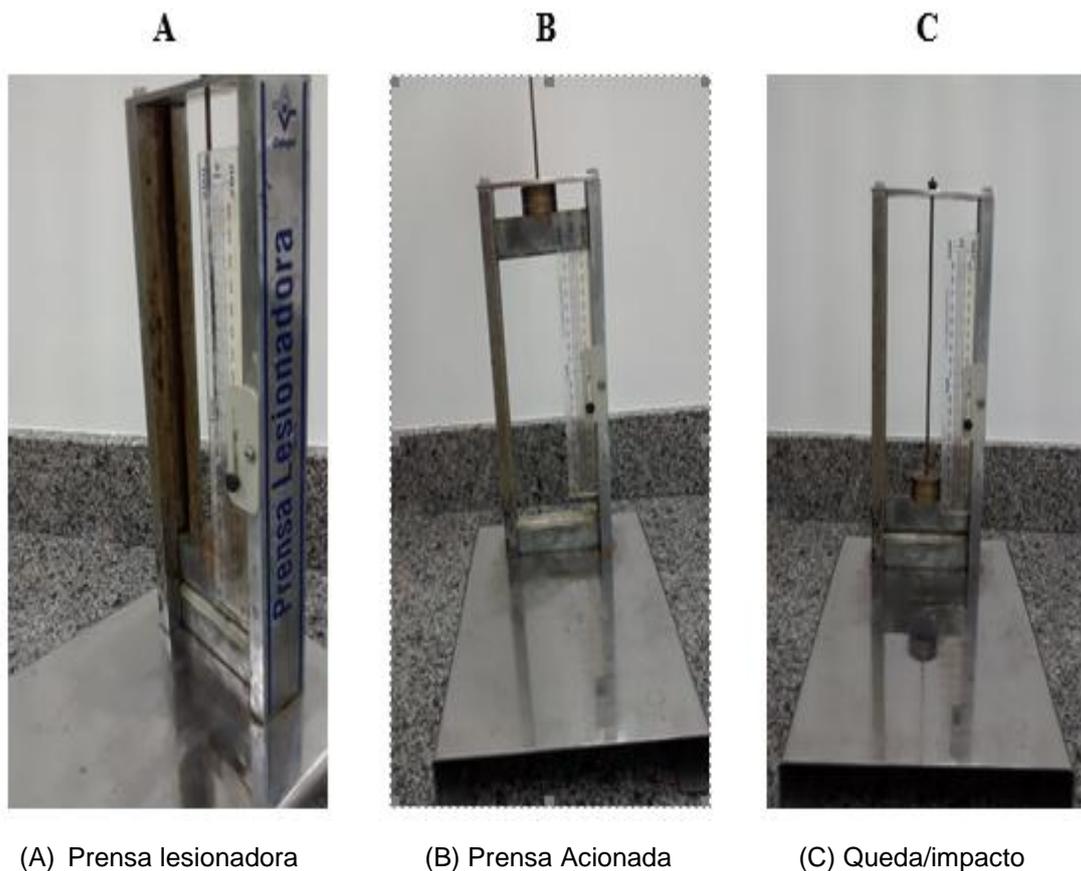


Figura 6 - Mecanismo de trauma muscular. (A) A prensa lesionadora sem elevação. (B) Altura para iniciar o impacto (18cm) (C) Momento da queda/impacto a ser realizada em região posterior da pata direita dos animais.

### 3.4 TRATAMENTO

Os animais receberam tratamento com ultrassom pulsado, ibuprofeno e GNPs em relação aos respectivos grupos. Durante o tratamento foi usado ultrassom pulsado terapêutico com os seguintes parâmetros: Marca Imbramed, Brazil (6 min de duração, frequência de 1.0 MHz, intensidade de  $0.8 \text{ W/cm}^2$ , área de radiação efetiva [ERA]  $1 \text{ cm}^2$ ).



Figura 7 - Ultrassom pulsado terapêutico (Imbramed, Brazil).

A área tratada com USP foi de aproximadamente  $1 \text{ cm}^2$ , na região central do gastrocnêmio com movimento circular do cabeçote de acordo com Saliba et al (2007). O gel salina, nanopartículas, ibuprofeno e nanopartículas com ibuprofeno foram utilizados sobre o tecido cutâneo como meio condutor do ultrassom nos respectivos grupos. A cada aplicação de ultrassom, os ratos foram anestesiados com isoflurano 4% e mantidos anestesiados com 2%.

O tratamento com ultrassom e os fármacos foi aplicado diariamente durante 5 dias sendo a primeira sessão 12 horas após a lesão muscular. Após 12 horas da última aplicação os animais foram anestesiados com isoflurano 4 % e a eutanásia foi feita por decapitação em guilhotina. A região central do gastrocnêmio de 7 animais por grupo foi cirurgicamente removida, processada e armazenada em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises bioquímicas e moleculares.

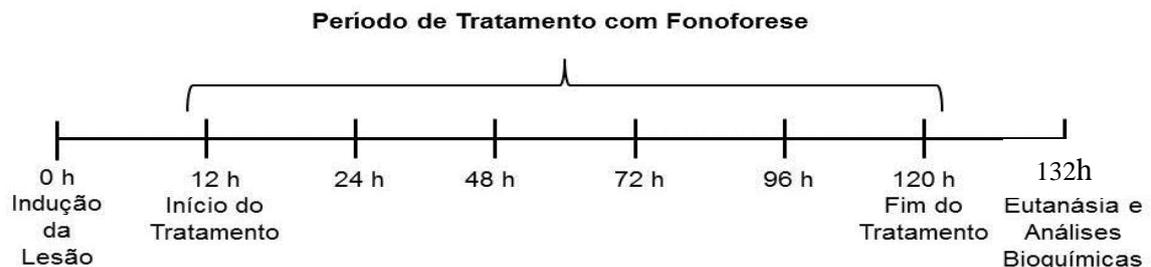


Figura 8 - Linha de tempo de indução, tratamento e eutanásia dos animais. Fonte: do autor.

### 3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO

As avaliações foram realizadas 24 e 120 horas após a lesão muscular traumática. Foi realizado a hiperalgesia térmica ao frio e a hiperalgesia mecânica como limiares de dor.

**Hiperalgesia térmica ao frio:** A avaliação do efeito analgésico foi realizada através dos modelos de Hiperalgesia térmica ao frio e hiperalgesia mecânica. A hiperalgesia térmica ao frio foi mensurada usando uma modificação do método da gota de acetona descrito por Choi et al., (1994). Após os animais serem ambientados, uma gota de acetona (50  $\mu$ L) foi colocada na superfície da pele da pata dos animais. As respostas comportamentais para a gota de acetona foram ranqueadas de acordo com a seguinte escala de escores: 0 = nenhuma resposta; 1= retirada rápida, batida ou tremor da pata (menor que 1 segundo); 2= repetição da batida, tremor ou elevação da pata (menor que 3 segundos); 3= comportamentos de suspensão ou de lambedura de pata (por mais que 3 segundos); 4= comportamentos de suspensão e por lambedura de pata (por mais de 3 segundos). Um ponto adicional foi acrescentado se ocorrer alguma vocalização.

**Hiperalgesia mecânica:** Para mensurar o limiar de retirada de pata frente a estímulo mecânico foram usados os filamentos de von Frey, de acordo com o método *Up-Down* como descrito previamente por Chaplan et al., (1994). Primeiramente os ratos foram aclimatizados por pelo menos 30 minutos antes do teste em caixas individuais fixadas em uma plataforma elevada com a superfície de malha de arame para permitir o acesso dos filamentos à superfície plantar da pata traseira dos animais. O calibre dos filamentos foi aumentado de forma crescente (2, 4, 6, 8, 10, 15, 26 g) com uma pressão suficiente para o filamento levemente se dobrar. A ausência da retirada de pata após 5 segundos levou ao uso do filamento seguinte, de maior calibre, sendo que a retirada de pata significou uma resposta positiva e levou o uso do filamento de menor calibre. Esse método continuou até um total de seis medidas ou até que quatro medidas positivas ou negativas consecutivas ocorram. A resposta do limiar de retirada de pata 50% foi então calculada a partir dos escores resultantes descritos conforme Dixon (1980). O limiar de retirada de pata foi expresso em gramas e será avaliado em diversos tempos após o

tratamento. Os dois testes foram realizados 24 e 120 horas após a indução do modelo de lesão muscular traumática.



Figura 9 - A. Avaliação da hiperalgesia térmica ao frio. B Avaliação da hiperalgesia Mecânica

### 3.6 HISTOLOGIA

Cinco dias após induzir o modelo de trauma muscular, três animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia por decapitação e o músculo gastrocnêmio foi perfundido com solução de paraformaldeído a 4% (pfa 4%) em tampão fosfato 0,1 m (pH 7,4). Os músculos foram removidos e pós-fixados por 24h na mesma solução pfa 4%, e em seguida embebidos em parafina após desidratação e diafanização, e seccionados em cortes de 5  $\mu$ m de espessura. As análises histológicas dos focos inflamatórios foram realizadas com hematoxilina-eosina (h&e). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (eclipse 50i, nikon, melville, ny, eua), com aumento de 200x, sendo que quatro campos oculares por corte (6-10 animais/grupo) foram capturados. As imagens foram registradas com auxílio da câmera nikon (sight ds-5m-l1, melville, ny, eua) e analisadas utilizando o software nih imagej 1.36b (nih, bethesda, md, eua), considerando a coloração nuclear das células inflamatórias (h&e). Os dados foram expressos como densidade óptica (DO) (Stewart et al., 2016).

## 3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 3.7.1 Espécies Reativas

**Diclorofluoresceína DCFH-DA:** A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'diclorofluoresceína (DCFH-DA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ROS de acordo com o método descrito anteriormente Dong (2010), com algumas modificações.

**Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO):** A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida e 0,1 % de NED (naphthyl-1 ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância será medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>). Os resultados foram calculados em µmol Nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

### 3.7.2 Marcadores de danos oxidativos

**Conteúdo de sulfidrila:** Para determinar grupamentos tióis totais na amostra foi utilizado o reagente de cor 5,51-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), que reduz grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo (TNB), que é mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412nm.

**Carbonilação de Proteínas:** A concentração de proteína das frações de proteína solúvel foi determinada de acordo com Levine et al., (1990). O teor de proteínas carboniladas foi medido pela formação inicial de derivados de hidrazona de proteína marcada usando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPT). Estes derivados foram extraídos sequencialmente com ácido tricloroacético a 10% seguido de tratamento com etanol / acetato de etilo, 1: 1 (vol / vol) e reextração com ácido tricloroacético a 10%. O precipitado resultante foi dissolvido em hidróxido de sódio 3%. Cada amostra teve sua própria leitura de branco, passando pelo mesmo tratamento sem a adição do

reagente de cor DNPT. Os resultados são mostrados para cada amostra lida a 370 nm em um espectrofotômetro.

### 3.7.3 Defesas antioxidantes

**Superóxido Dismutase (SOD):** É medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese, (1987). As amostras de musculo total foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15  $\mu$ L foram retiradas da mesma, a qual 5  $\mu$ L de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175185  $\mu$ L (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5  $\mu$ L adrenalina (60 mM em água destilada +15 mL/mL de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

**Atividade da Catalase (CAT):** A análise da atividade CAT foi realizada em duplicata e determinada de acordo como Aebi (1984). O gastrocnêmio foi inicialmente homogeneizado num tampão específico e uma alíquota foi sonicada num tampão fosfato 50 mM e a suspensão resultante foi centrifugada a 3000 g durante 10 min. O sobrenadante foi usado para ensaio enzimático. A atividade da CAT foi medida utilizando a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio a 240 nm. A atividade da enzima foi expressa como U / mg de proteína.

**Glutationa (GSH):** Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado em homogenato de musculo total após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500  $\mu$ m DTNB. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância será lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras.

### 3.7.4 Determinação do conteúdo proteico

O teor de proteína a partir do tecido muscular homogeneizado foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry, (1951). Reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado para ligar-se à proteína. O reagente será lentamente reduzido passando de amarelo para azul, a absorvância para leitura é de 700nm.

### 3.7.5 Determinação do conteúdo de citocinas

As amostras foram processadas e após, foram colocadas na placa para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10,) foi utilizado o método enzyme-linked immunoabsorbent assay (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA).

## 4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS GNPs

GNPs de tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich et al. (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O) (Nuclear, SP, Brasil). O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor. Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de ácido tetracloroáurico, foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 90 °C e sob agitação a 700 rpm. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando a 200 rpm durante 20 minutos. As soluções adquirem as colorações correspondentes a cada tamanho de GNPs sintetizadas apresentando um pH de 5,8. Por conseguinte, o pH foi ajustado a pH fisiológico com solução tampão e, posteriormente, centrifugadas (13.000 rpm por 15 min), lavadas duas vezes com água ultrapura e, finalmente, disperso em solução salina onde a concentração da solução também foi ajustada.

Após a síntese, as soluções de GNPs foram caracterizadas empregando-se a técnica de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da

banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), usando um espectrofotômetro modelo UV-1800, difração de raios-x, através do equipamento de LAB-X, modelo XDR – 6000 (Shimadzu). Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de SRP, foi realizada a temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL de cada uma das soluções, sendo que o espectro eletrônico das soluções foi monitorado diariamente ao longo de uma semana no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção, obtendo-se valor de 532 nm para GNPs de 20 nm.

Para medidas de difratometria de raios-x (DRX), uma alíquota de 9 mL da solução de GNPs foi centrifugada a 10.000 rotações por minuto por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o material sedimentado transferido para uma porta amostra e seco em estufa. O material foi caracterizado com os seguintes parâmetros: Comprimento de onda da radiação do tubo de cobre: 1.54056 Å, voltagem de 30 kV, corrente 30 mA. Velocidade de varredura: 2°/min, ao passo de 0.02°, entre 20-80° (Balasubramanian et al., 2010). O diâmetro médio das GNPs foi calculado usando a equação de Scherrer  $2\theta = 38^\circ$  (Yan et al., 2005). Onde, D é Diâmetro médio, K = 0,94, uma constante característica das partículas esféricas,  $\lambda$  é comprimento onda (raios-x usado): 1,54056,  $\beta$ : Largura da banda a meia altura (total na metade máxima do pico em radianos) e  $\theta$ : ângulo de Bragg (do pico de 100% de intensidade) (Balasubramanian et al., 2010).

A concentração de ouro foi mensurada por espectrofotometria de absorção atômica (Varian model AA 240Z; Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) obtendo concentração de 30 mg/L. A análise do Potencial Zeta, (ZetaPALS; Brookhaven Instruments, Nova Iorque, EUA) foi utilizado para medir os potenciais Zeta das GNPs. A temperatura foi mantida a 25 °C. A concentração de ouro nas soluções de GNPs foi determinada por espectrometria de absorção atômica (EAA) utilizando um espectrofotômetro modelo AA240 FS-FAST SEQUENTIAL ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETER marca VARIAN. Após todos os testes de caracterização foi observado que as GNPs estavam adequadas para o uso.

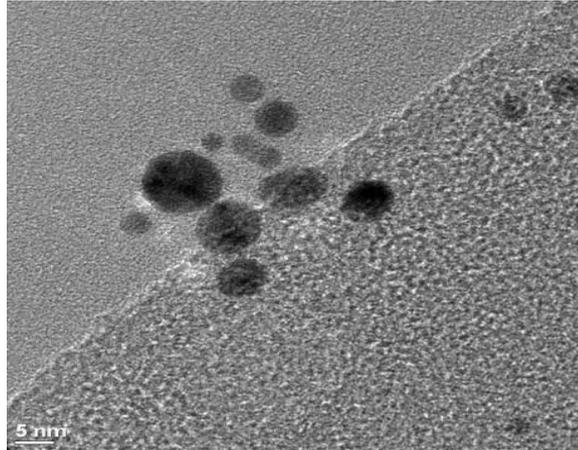


Figura 10 – Microscopia eletrônica de transmissão de GNPs com diâmetro de 20 nm. GNPs esféricas preparadas em solução aquosa. A barra de escala equivale a 5 nm.

## 5 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS

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 foi de  $P < 0,05$ . Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 HISTOLOGIA

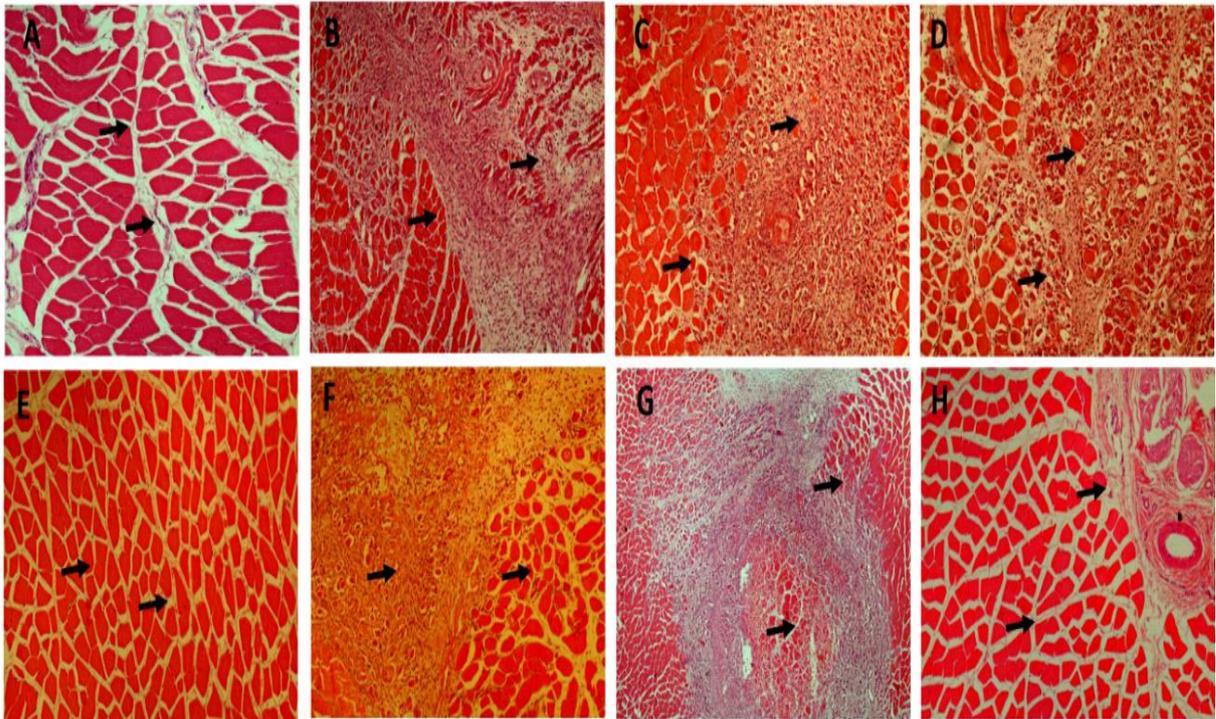


Figura 11 - Imagens representativas de cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio corados com coloração de (H&E) de animais submetidos a um protocolo de lesão muscular traumática e tratados com ultrassom terapêutico (USP).

Imagens representativas de cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio corados com coloração de (H&E) de animais submetidos a um protocolo de lesão muscular traumática e tratados com ultrassom terapêutico (USP), nanopartícula de ouro (GNPs) utópico, ibuprofeno (IBU) e a associação de todas as terapias. Na Figura 11A, temos o grupo controle que apresentou áreas com morfologia das fibras musculares de aspecto normal com núcleo periférico em ambas as imagens capturadas (seta preta). Na imagem da Figura 11B, referente ao grupo lesão muscular traumática, é possível observar áreas com aumento do influxo de células inflamatórias na área periférica à lesão (seta preta) com aumento expressivo de células inflamatórias nas áreas entre as fibras, compatível com lesão muscular traumática. Figura 11C, grupo tratado com USP terapêutico, observa-se áreas com aumento da quimiotaxia de células inflamatórias, leucócitos (seta preta),

na área entre as fibras musculares, com aspecto normal e presença de núcleo periférico e áreas com edema peri fibra muscular. Na Figura 11D, grupo tratado com GNP, observa-se áreas com aumento de células inflamatórias nos espaços entre as fibras musculares, células musculares com núcleo periférico com diâmetros aumentados das fibras, compatível com hiperplasia celular (seta preta). Na Figura 11E, grupo tratado com IBU, observa-se poucas áreas com aglomerado de células inflamatórias e também aumento do influxo dessas células nos espaços entre as fibras musculares (seta preta). Fibras musculares de morfologia normal. Figura 11F, grupo tratado com USP + GNPs apresenta áreas de grande influxo de células inflamatórias e presença de fibras musculares com aspecto de hiperplasia (seta preta). Figura 11G, grupo tratado com USP + IBU com intenso influxo de células inflamatórias entre as fibras musculares e apresenta fibras com características hipotróficas difusas. Imagem em aumento de 4x para melhor observação da abrangência do grau de infiltrado inflamatório neste grupo (seta preta). Figura 11H, grupo tratado com USP + GNPs + IBU apresenta poucas áreas de infiltrado de células inflamatórias (seta preta) e fibras musculares de aspecto e morfologia normal com núcleo periférico (seta preta) ainda apresentando áreas de congestão vascular. Aquisição das imagens em microscópio óptico: (n=3. Imagens capturadas em objetiva de 10x-aumento de 100x, exceto grupo LM + USP + IBU com objetiva de 4x).

## 6.2 AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS

Na figura 12, avaliamos os níveis proteicos das citocinas pró inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Observamos que, com relação aos níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 12A), os grupos LM, LM + USP, LM + GNPs, LM + IBU, LM + USP + GNPs e LM + USP + IBU apresentaram um aumento significativo quando comparados ao grupo controle. Na figura 12B, foi avaliado os níveis da IL-1 $\beta$ , observamos que os grupos LM, LM + USP, LM + GNPs, LM + IBU, LM + USP + GNPs e LM + USP + IBU, apresentaram um aumento significativo comparado ao grupo controle. Já o grupo LM + USP + IBU + GNPs, apresentou uma diminuição quando comparado ao grupo LM. Na figura 12C avaliamos os níveis de IL-6, observamos que o grupo LM apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle. Já o grupo LM +

USP + IBU + GNPs apresentou uma diferença significativa quando comparado ao grupo LM.

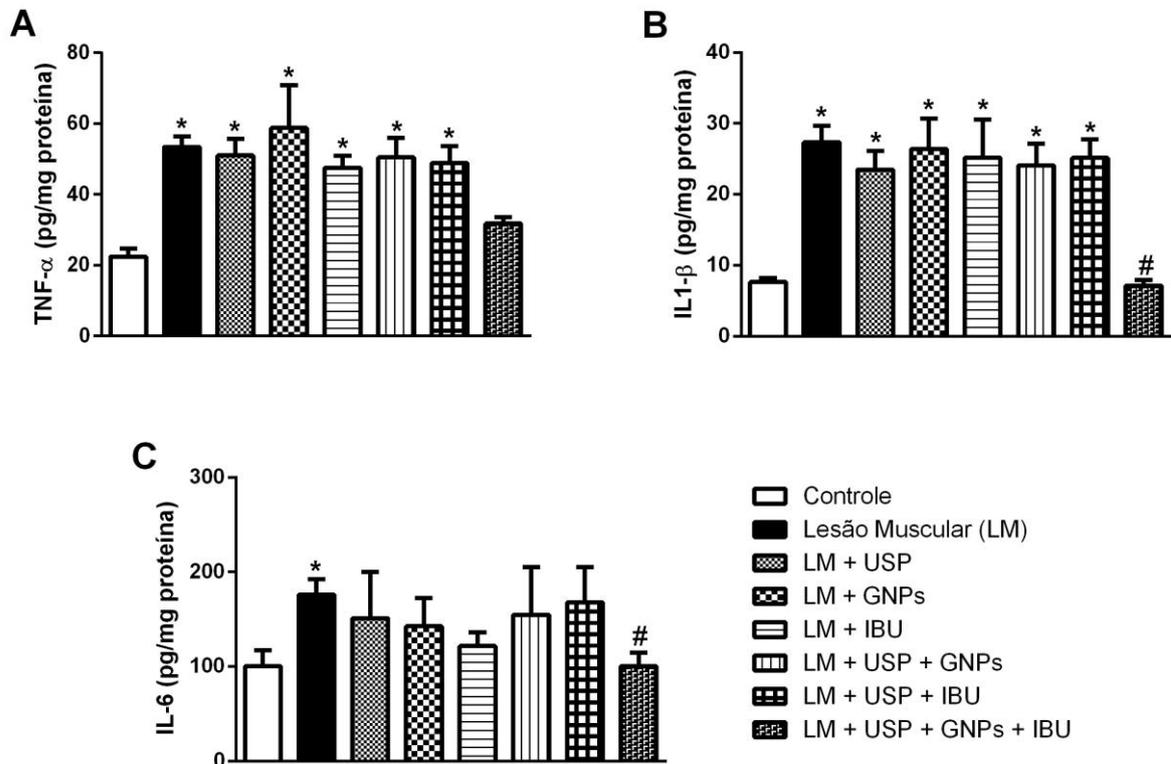


Figura 12 – Efeitos da fonoforese com GNPs e IBU, sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, após modelo de lesão muscular traumática. Níveis de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) e IL-6 (C), avaliados por ELISA. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

Nas citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 (Figura 13), foi observado que na citocina IL-10 (13A), grupo LM, demonstrou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle. Apenas o grupo LM + USP + GNPs + IBU, mostrou um aumento significativo quando comparado ao grupo LM. Agora quando comparamos a citocina IL-4 (13B), podemos observar que o grupo LM teve uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle, já o grupo LM + USP + IBU + GNPs reverteu esse quadro, mostrando uma diminuição significativa quando comparado ao grupo LM.

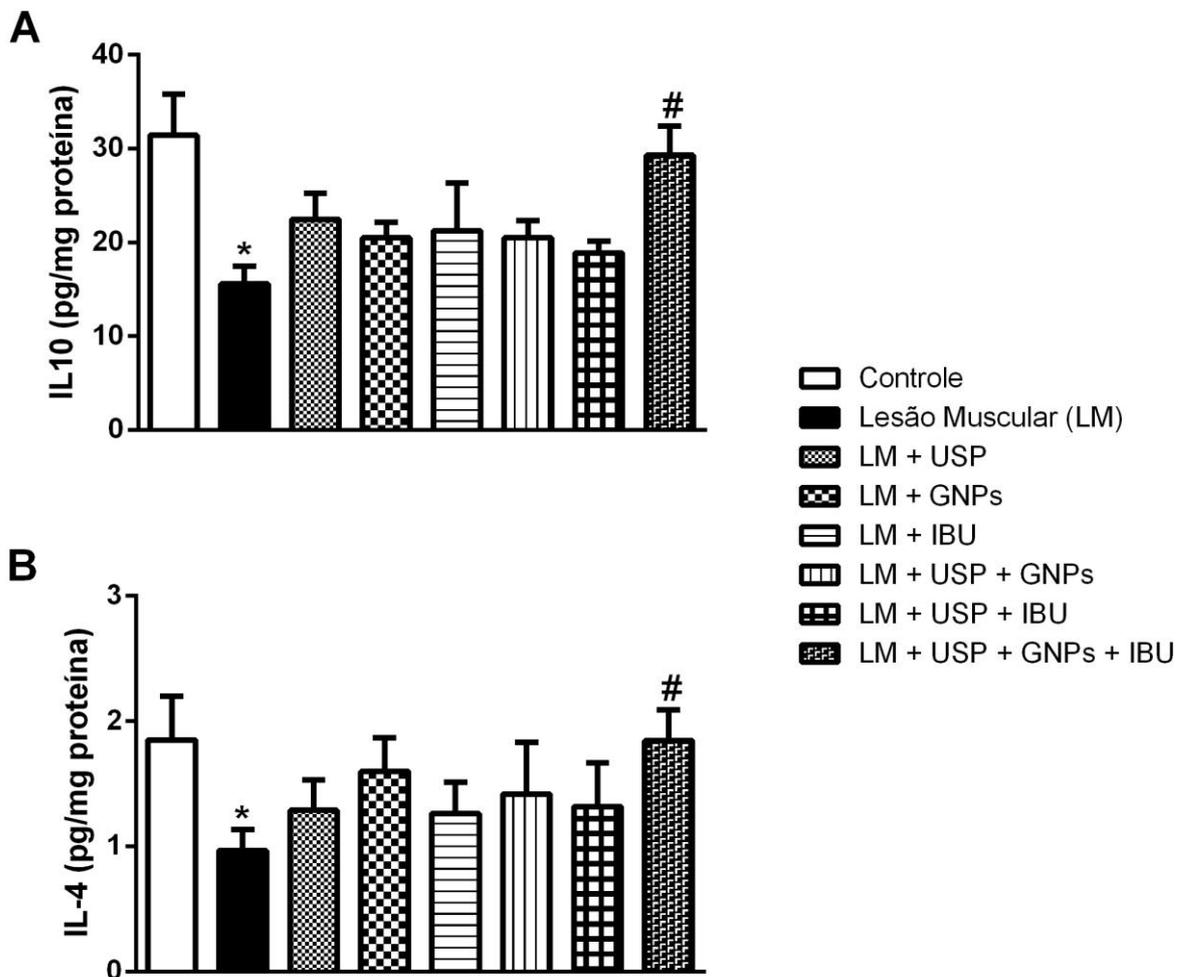


Figura 13 – Efeitos da fonoforese com GNPs e IBU, sobre os níveis de IL-10 e IL-4, após modelo de lesão muscular traumática. Níveis de IL10 (A) e IL4 (B), avaliados por ELISA. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

### 6.3. SISTEMA ANTIOXIDANTE:

Avaliamos a atividade da enzima superóxido desmutase e catalase e os níveis totais de glutathiona como parâmetros do sistema antioxidante. Em relação a atividade da enzima superóxido desmutase (Figura 14A), o grupo LM, mostrou um aumento significativo, quando comparado ao grupo controle. O grupo LM + USP +GNPs + IBU, mostrou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo LM. Na figura 14B foi avaliado os níveis totais de glutathiona, os grupos LM, LM + USP, LM + GNPs, LM + IBU, mostraram uma diminuição significativa quando comparados ao grupo controle. Já o grupo LM + USP + GNPs + IBU, mostrou um aumento significativo quando comparado ao grupo LM. Em relação a atividade da enzima superóxido dismutase (Figura 14C), os grupos LM, LM + USP, LM + GNPs,

LM + IBU, mostraram uma diminuição significativa quando comparados ao grupo controle. Já o grupo LM + USP + GNPs + IBU, mostrou um aumento significativo quando comparado ao grupo LM.

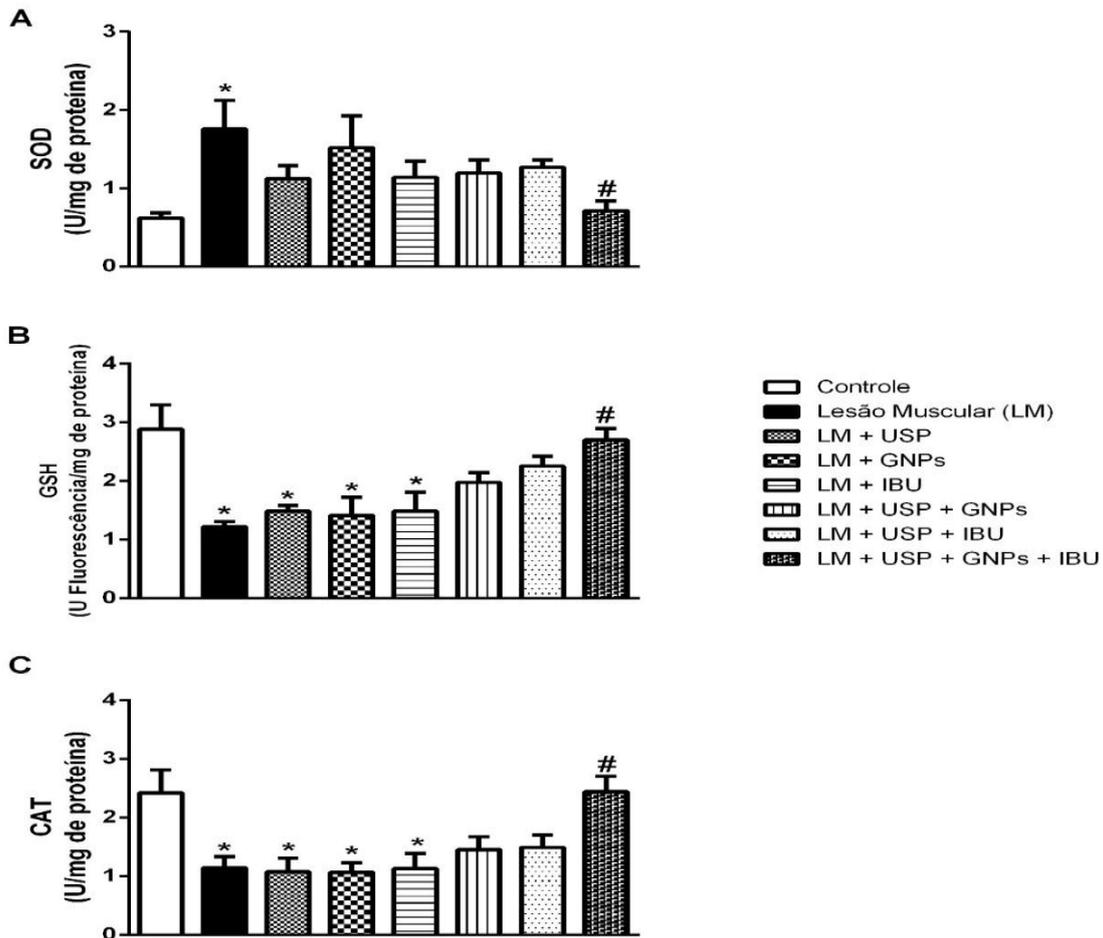


Figura 14 - Efeitos da fonoforese com GNPs e IBU, ambos sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) (A), os níveis totais de glutathiona reduzida (GSH) (B) e catalase (CAT) (C) 5 dias após lesão muscular traumática. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo controle; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

#### 6.4 PRODUÇÃO DE OXIDANTES:

Os níveis de DCFH e de nitrito foram analisados como parâmetros de produção de oxidantes (figura 15a e 15b). Na figura 15a avaliamos os níveis de DCFH, o grupo LM, mostrou um aumento significativo quando foi comparado ao grupo controle. Já o grupo LM + USP + IBU + GNPs, apresentou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo lesão. Na figura 15b os níveis de nitrito nos grupos LM, LM + USP, LM + GNPs e LM + IBU, apresentaram um aumento

significativo quando comparados ao grupo controle, entretanto, apenas o grupo LM + USP + GNPs + IBU apresentou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo LM.

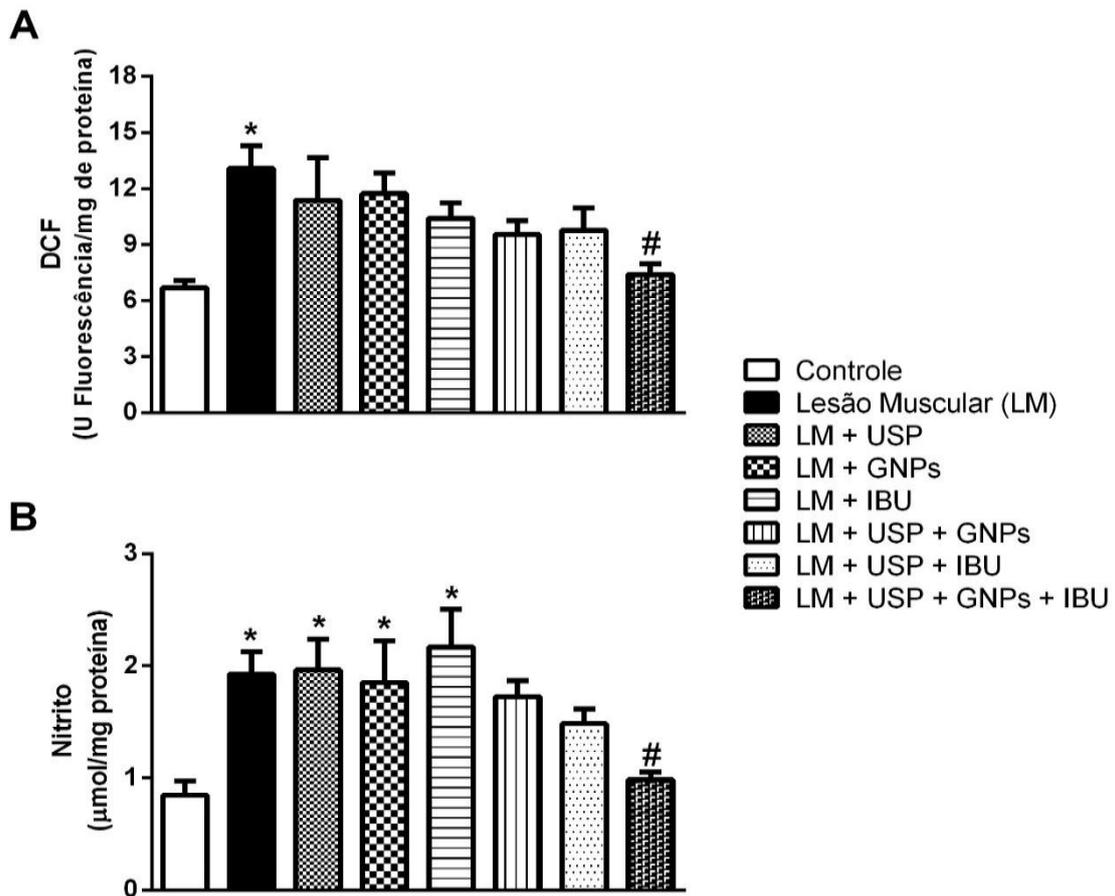


Figura 15 - Efeitos da fonoforese com GNPs, IBU, ambos sobre os níveis de DCFH (A) e Nitrito (B) 48 horas após 5 dias de lesão muscular traumática. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo controle; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

## 6.5 DANO OXIDATIVO:

Como marcadores de dano oxidativo foram avaliados os níveis de carbonil e conteúdo de sulfidril. Com relação ao carbonil, pode-se observar na figura 16A, apenas o grupo LM, mostrou diferença significativa quando comparado ao grupo controle. Já os grupos LM + USP + GNPs, LM + USP + IBU e LM + USP + GNPs + IBU mostraram um aumento significativo quando comparados ao grupo LM. Na figura 16B o conteúdo de grupamentos sulfidril nos grupos LM, LM + USP, LM + GNPs, LM + IBU, mostrou uma diminuição significativa quando comparados ao grupo controle.

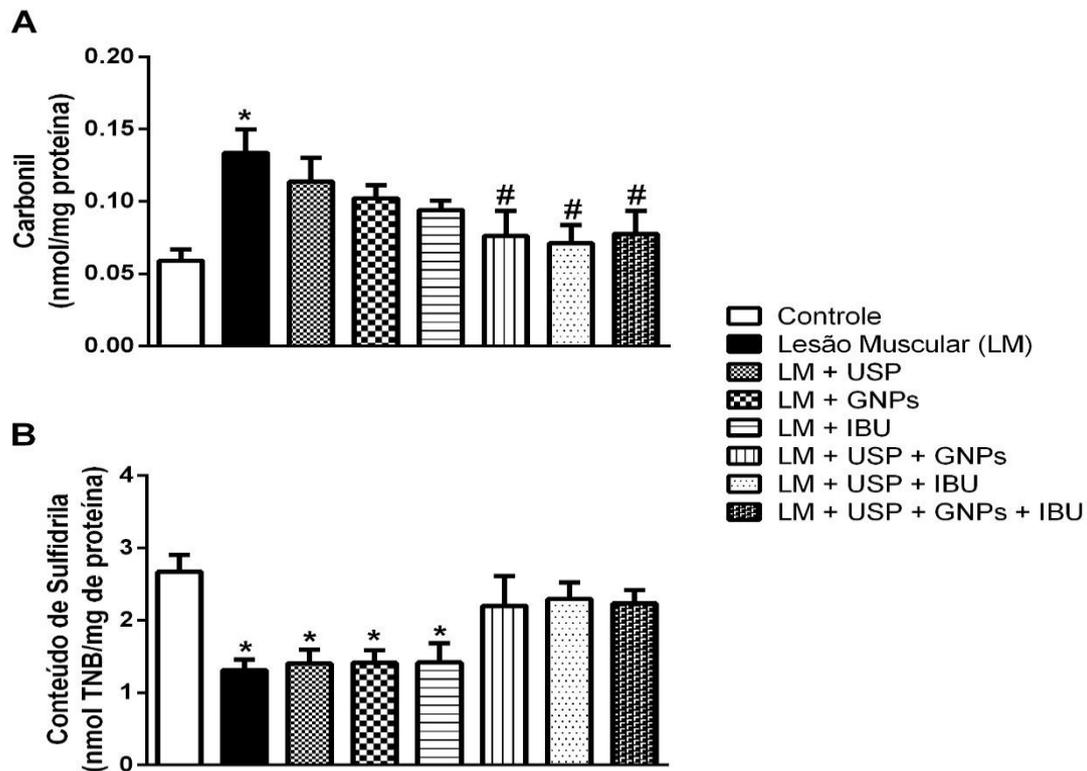


Figura 16 - Efeitos da fonoforese com GNPs e IBU, ambos sobre os níveis de Carbonil (A) e Sulfidril (B) 5 dias após lesão muscular traumática. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo controle; # $p < 0,05$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey). Fonte: do autor.

## 6.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO

Inicialmente avaliamos a dor decorrente da lesão muscular traumática após o modelo de lesão. Como critério de avaliação para a dor foi investigado a hiperalgesia mecânica (limiar mecânico) e hiperalgesia térmica ao frio (escore de nocicepção), como auxiliares na investigação dos efeitos decorrentes do tratamento em relação à dor. As avaliações foram realizadas 24 e 120 horas após a lesão muscular traumática.

Nas 24 horas após a lesão os grupos lesionados apresentaram um aumento no score de nocicepção ao frio comparados ao grupo controle e uma diminuição significativa no limiar mecânico e (figura 17a e 17c). Após 120 horas de trauma, no escore de nocicepção (figura 17b), o grupo LM mostrou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle. Os grupos LM + USP, LM + IBU, LM + USP + GNPs e LM + USP + IBU, mostraram uma diminuição significativa quando comparado ao grupo LM ( $p < 0,05$ ). Apenas o grupo LM + USP + GNPs + IBU,

mostrou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo LM ( $p < 0,1$ ). Sobre o limiar mecânico, após 120 horas (figura 16d), apenas o grupo LM, mostrou uma diferença significativa quando comparado ao grupo controle. Os grupos LM + GNP, LM + IBU e LM + USP + GNP, mostraram um aumento significativo quando comparados ao grupo LM ( $p < 0,5$ ). Já o grupo os grupos LM + USP, LM + USP + IBU e LM + USP + GNP + IBU, mostraram uma diferença significativa quando comparados ao grupo LM ( $p < 0,1$ ).

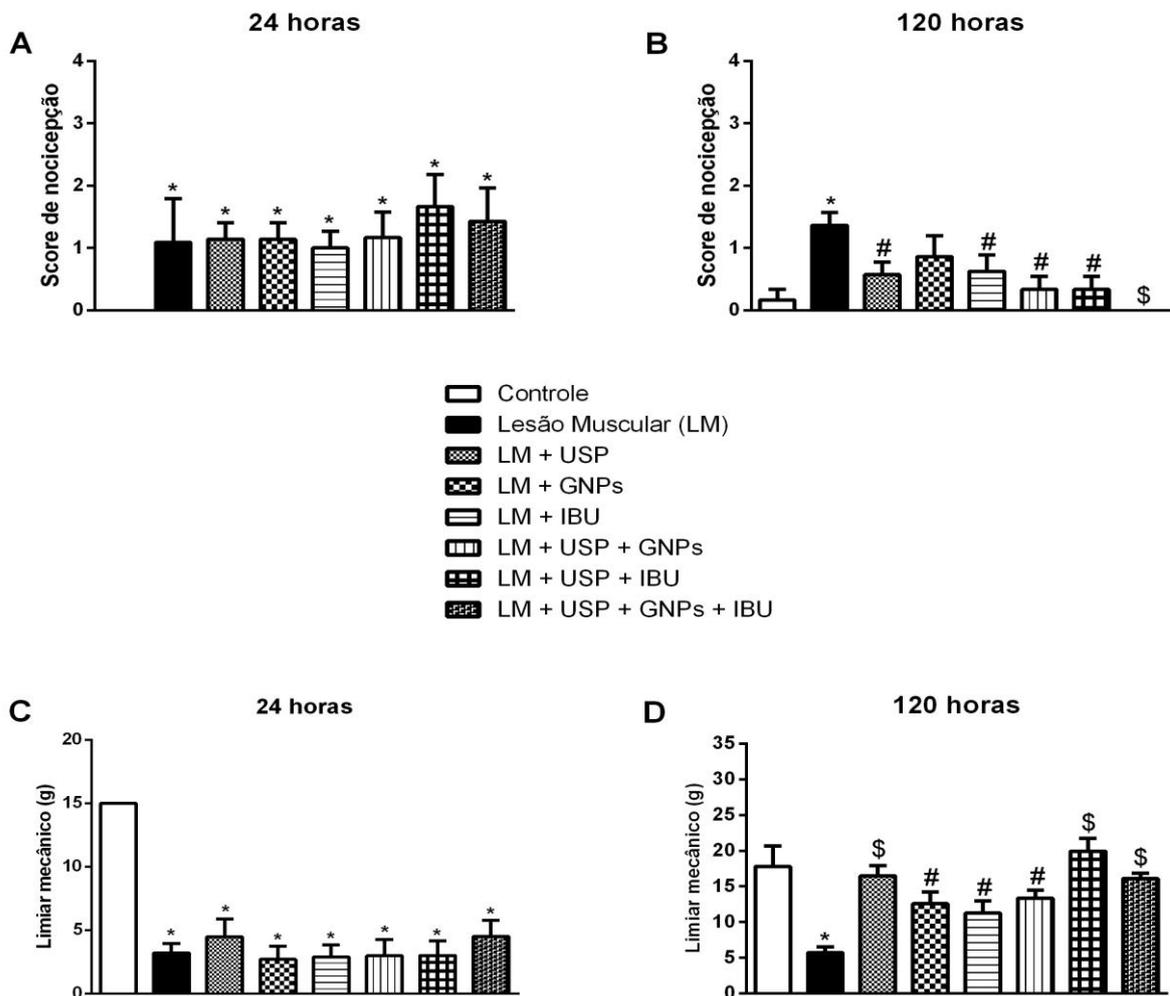


Figura 17 - Efeitos da fonoforese com GNP e IBU, ambos sobre a avaliação do escore de nociceção ao frio 24 horas (A), 120 horas (B). E ao limiar mecânico, 24 horas (C) e 120 horas (D) após modelo de lesão muscular traumática. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo controle; # $p < 0,05$  versus Grupo LM; \$ $p < 0,01$  versus Grupo LM (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

## 7 DISCUSSÃO

A prática esportiva e a participação em competições nas mais diversas modalidades vêm resultando em crescente número de lesões musculoesqueléticas. Dentre estas, as lesões musculares estão entre as mais frequentes, representando 10-55% de todas as lesões no esporte (Filho et al., 2015). Diante disso, alternativas que acelerem o processo cicatricial se tornam alvo de investigação de muitos pesquisadores, e o uso da fonoforese se destaca por demonstrar diminuição do estresse oxidativo e favorecer a resolução do processo inflamatório agudo, otimizando o reparo tecidual (Zórtea, 2015). O ibuprofeno é um medicamento com propriedades anti-inflamatórias amplamente utilizado no tratamento de lesões musculares (Mackey, 2016). Pesquisas recentes demonstraram o uso de nanopartículas como agente carreador de drogas e como possibilidade terapêutica para tratamento de uma série de doenças, como osteoartrite, câncer, Alzheimer e Parkinson. Diante disso, este trabalho teve como objetivo analisar o efeito da fonoforese com ibuprofeno associado às GNPs num modelo de lesão muscular traumática. A lesão muscular traumática acarreta na ruptura de fibras musculares e gera rápida invasão de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos (Tidball, 2017). Segundo Bosurgi L et al., (2011), os macrófagos constituem a maioria dos leucócitos intramusculares sendo responsáveis pela remoção dos detritos teciduais por meio da fagocitose, síntese de fatores de crescimento, quimosinas e citocinas as quais modulam todas as fases da reparação muscular.

Sob estímulos do microambiente fornecidos principalmente por neutrófilos infiltrados (isto é, presença de mediadores Th1, como *IFN- $\gamma$*  e *TNF- $\alpha$* ) durante as etapas iniciais do processo de regeneração, os macrófagos são ativados e adquirem um fenótipo pró-inflamatório, classicamente conhecido como M1 e caracterizado por aumento na atividade fagocitária e produção de mediadores pró-inflamatórios como IL - 1 $\beta$ , IL - 6, TNF -  $\alpha$  (Hurme et al.,1991). Resultados encontrados por Abat et al. (2015), apontam que o aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  pode promover a inibição de síntese de proteínas no tecido muscular; e valores elevados de TNF- $\alpha$  podem causar inibição da diferenciação dos mioblastos pelas células satélites, limitando a resposta regenerativa.

Em nosso estudo, o modelo de lesão muscular acarretou no aumento dos níveis de citocinas pró inflamatórias TNF-  $\alpha$ , IL - 1 $\beta$  e IL-6 nos grupos LM, LM + USP, LM + GNPs, LM + IBU, LM + USP + GNPs e LM + USP + IBU. Estes resultados corroboram com outros achados da literatura que descrevem aumento na concentração destas citocinas pró-inflamatórias, as quais são responsáveis por regular a expressão de moléculas de adesão requeridas para a infiltração tecidual de neutrófilos e macrófagos (Tidball e Villalta, 2010). Entretanto, o grupo LM + USP + GNPs + IBU apresentou uma redução dos níveis destes marcadores, o que indica que o uso da fonoforese com GNPs associado ao ibuprofeno, foi a única combinação terapêutica capaz de desencadear os efeitos anti-inflamatórios desejados.

O término da fagocitose e da liberação de citocinas pró-inflamatórias, dá início à fase de reparo, com regeneração das fibras musculares e produção de tecido cicatricial conectivo. Nesta etapa temos liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e IL-4, as quais irão estimular a proliferação e diferenciação celular pelas células satélites, a deposição de colágeno e a angiogênese (Tidball, 2010). Os achados neste trabalho demonstram que o grupo LM se encontra em fases iniciais do processo inflamatório, evidenciado pela alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e uma redução na expressão de citocinas como IL-10 e IL-4. No entanto, apenas o grupo submetido à fonoforese com GNPs associado ao ibuprofeno, constituiu um mecanismo capaz de otimizar o processo inflamatório causado pela lesão muscular, através da resolução acelerada da fase aguda, antecipando o início da fase de reparo mediante o aumento na expressão de IL-10 e IL-4.

Com base na literatura, acreditamos que este resultado se deva aos mecanismos de ação isolados das terapias utilizados, que aplicados em associação foram potencializados na promoção da regeneração tecidual. O ultra-som atua na diminuição do processo inflamatório, através da migração das células do sistema imunológico para o local da lesão e aceleração da fase de cicatrização tecidual. Conforme Victor (2012), o USP é também um facilitador no transporte de moléculas através do aumento da permeabilidade da membrana, tornando-se um meio de administração de drogas anti-inflamatórias (fonoforese) promovendo maior absorção do fármaco e potencializando os efeitos das terapias isoladas. Além destes, acrescenta-se o mecanismo de ação do ibuprofeno como inibidor da ciclo-

oxigenase, igualmente considerado agente atenuante do processo inflamatório (Schoenfeld, 2012; Bloch et al., 2018). O estudo de Kjaer et al (2016), revelou o papel importante do ibuprofeno na modulação da atividade de fibroblastos e na ativação de células satélites no processo de regeneração muscular em humanos, obtendo reparo de miofibras de forma mais rápida comparado ao grupo placebo a partir do uso deste medicamento. Estudo realizado por Vella et al., (2014), observou que o uso do Ibuprofeno foi capaz de acelerar a fase inflamatória do NF- $\kappa$ B levando a uma fase de resolução da inflamação mais rápido do que o grupo que não recebeu Ibuprofeno.

Diversos estudos também demonstram o potencial anti-inflamatório das nanopartículas de ouro no tratamento de vários modelos de lesão tecidual (Dohnert et al., 2012; Victor et al., 2012). O primeiro mecanismo proposto (Jeon et al., 2003) defende que as GNPs causam bloqueio da ativação de NF- $\kappa$ B por interagir com o componente Cys-179 do IKK- $\beta$  e conseqüentemente diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Outro mecanismo foi proposto no trabalho de Sumbayev et al.,(2013), demonstrando pela primeira vez, que nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato diminuem, de maneira dependente do tamanho, a resposta celular induzida por IL-1- $\beta$  *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo foi demonstrado que o efeito anti-inflamatório da nanopartícula de ouro está associado com a capacidade desta de interagir fisicamente com a IL-1 $\beta$  extracelular, dessa forma neutralizando a ligação ao seu receptor de membrana e causando inibição da cascata de sinalização. Ratificando estas afirmações, Tsai et al.,(2007) num modelo animal de artrite, encontraram inibição da proliferação e migração celular, da infiltração de macrófagos e diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$ . Outro estudo realizado por Pedersen et al., (2009) demonstrou os efeitos anti-inflamatórios das GNPs com diâmetro de 20 nm num modelo de traumatismo craniano de ratos através da redução significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  e de proteínas pró-apoptóticas.

Sabe-se que a lesão muscular com alto grau de inflamação pode resultar no acúmulo de ERO e ERN. De acordo com König et al., (2001) evidências demonstram que a lesão muscular aumenta a geração de ERO por vários mecanismos, os principais são o aumento na produção de superóxido mitocondrial, a ativação do complexo NADPH oxidase pela intensa fagocitose e a ativação da xantina oxidase por isquemia/reperfusão. Na ocorrência de processo inflamatório exacerbado com produção de ERO constante e elevada, os sistemas antioxidantes

podem se tornar insuficientes; esta situação de desequilíbrio acarreta em estresse oxidativo e provoca danos em biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em razão do exposto, neste trabalho analisamos produção de oxidantes, atividade do sistema antioxidante e dano oxidativo. A produção elevada de ERO e ERN no grupo de LM, conforme (Drose e Brandt, 2012) pode decorrer da ampla lesão causada nas células musculares, o que induz à disfunção mitocondrial e escape de elétrons na cadeia de transporte (CTE). Os escapes de elétrons entre o complexo I e ubiquinona e entre ubiquinona e o complexo III são considerados responsáveis pela maior parte dos superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ) produzidos (Powers e Jackson, 2008). A ampla migração de neutrófilos e macrófagos com aumento na atividade NADPH oxidase por meio da fagocitose também é considerada fonte de geração de ERO (Konig et al., 2001). O óxido nítrico e seus subprodutos também desempenham um papel importante na fisiopatologia da lesão muscular, principalmente em situações de isquemia/reperfusão e inflamação, aonde ocorre condições de acidose intracelular (Kalogeris et al., 2012).

A fim de comprovar que a lesão muscular produz ERO, analisamos os níveis de espécies reativas do nitrogênio e oxigênio através do Nitrito e DCF. O grupo LM demonstrou aumento dos níveis destes oxidantes, enquanto apenas a associação entre o US, ibuprofeno e nanopartículas de ouro, exerceu efeito protetor contra o aumento na produção de ERO e ERN. Acreditamos que esse resultado ocorreu devido aos efeitos das terapias, que de forma diferente e complementar, agiram contra a produção de oxidantes durante a resposta inflamatória (Powers e Jackson, 2008).

Quando analisamos o sistema antioxidante, observamos a atividade das enzimas SOD, CAT e GSH. A SOD é responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Ferreira et al., 2015), CAT e GSH catalisam a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. No grupo LM a atividade da SOD se encontra aumentada, enquanto CAT e GSH, reduzidas. Estes resultados demonstram o desempenho destes sistemas antioxidantes na busca pela homeostase celular. Decorrente do processo inflamatório intenso, os níveis de SOD estão elevados na tentativa de evitar maiores danos biológicos potencialmente causados pelo ânion superóxido, um radical altamente reativo, que é então transformado em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, apesar de

menos reativo, necessita também ser reduzido a água e oxigênio pela catalase e/ou pelo sistema glutathiona, por se tratar de um metabólito do oxigênio extremamente deletério, participando na produção de peroxinitrito. Em razão deste quadro de aumento na concentração de peróxido de hidrogênio, a utilização dos sistemas de CAT e GSH é aumentada. Estes dados corroboram com nossos resultados, demonstrando que o grupo LM apresenta alta formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em um sistema antioxidante ineficiente em sua neutralização resultando no acúmulo de ERO no local lesionado. Esse quadro foi revertido no grupo LM+USP+IBU+GNPs onde obtivemos uma potencialização destes mecanismos antioxidantes quando comparado ao grupo LM, associada a redução dos níveis de oxidantes.

Para avaliar o efeito dos tratamentos propostos como agentes reguladores do quadro de estresse oxidativo foi realizada a análise de dano oxidativo, a partir da análise de carbonilação proteica e grupamentos sulfidrilas. O grupo LM apresentou um aumento nos níveis de carbonilação proteica com redução de grupamentos sulfidrilas. O grupo LM + USP + GNPs + IBU apresentou uma redução nos níveis de carbonilação proteica com valores próximos ao grupo controle. Os níveis de sulfidrilas apresentaram um aumento no grupo LM+USP+IBU+GNP, retornando a níveis semelhantes ao grupo controle, demonstrando a capacidade de proteção aos grupamentos sulfidrilas da associação entre o USP, ibuprofeno e nanopartículas de ouro, reestabelecendo a homeostase e atenuando os danos causados pelo estresse oxidativo.

Corroborando com nossos achados, alguns estudos relatam os efeitos do ultrassom sobre o aumento na expressão de células satélites, proliferação fibroblástica e principalmente, reduzindo a produção de ERO e ERN em modelos experimentais de lesão muscular, demonstrando seu potencial anti-inflamatório e antioxidante (Low e Reed, 2001; Starkey, 2001; Saliba et al., 2007; Chan et al., 2010; Dohnert et al., 2012; Silveira et al., 2013). Além disso, a estimulação ultrassônica pode influenciar na permeabilidade da membrana plasmática através da modulação de canais iônicos como o de Ca<sup>2+</sup>, o que impede a sua entrada excessiva na célula e preserva a membrana mitocondrial, evitando a morte celular causada pelo influxo de cálcio e o agravamento do quadro inflamatório e do estresse oxidativo (Wilkin et al., 2004).

Alguns estudos demonstram que estes efeitos do ultrassom estão atribuídos principalmente a cavitação gerada pela frequência vibracional. Em razão

da cavitação um efeito de micromassagem ocorre no tecido, capaz de aumentar a permeabilidade da membrana e a síntese de proteínas, levando resolução do edema e do processo inflamatório de forma efetiva, o que influencia indiretamente na resolução do estresse oxidativo (Tezel et al., 2002; Zórtea, 2014).

Associado aos mecanismos do ultrassom descritos anteriormente, um estudo de Ma (2010) demonstrou que as nanopartículas de ouro apresentam a capacidade de inibir a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, através da inibição do NF- $\kappa$ B e da atividade da AKT após a indução com LPS em macrófagos. Outro estudo ainda em macrófagos demonstrou efeito similar, através da redução na formação de óxido nítrico quando utilizado nanopartículas de ouro associadas a *Rubia cordifolia* (Singh, 2013). Barathmanikanth (2010) sugere que as nanopartículas de ouro agem como agente antioxidante, devido a sua capacidade de ligação com espécies reativas de oxigênio e radicais livres inibindo sua capacidade de reação (efeito scavenger). Além destes mecanismos, as nanopartículas apresentam a capacidade de potencializar os efeitos do ibuprofeno, considerado um antioxidante indireto em razão de sua capacidade de inibir a atividade da COX (Huang et al., 2011), e também apresentar propriedades capazes de eliminar e prevenir a formação de certas espécies de radicais livres (Van Antwerpen e Nève, 2004). A partir dos dados encontrados neste estudo, o ultrassom é considerado um facilitador na permeação de moléculas como as nanopartículas de ouro que quando associadas a um fármaco como o ibuprofeno, é capaz de potencializar os diversos mecanismos de ação demonstrados neste trabalho. A resposta inflamatória repercute com alterações estruturais nos tecidos. De acordo com Carpenter S e Karpati G, (1984), em fibras musculares lesionadas ou em processo de reconstrução observa-se a presença de infiltrado celular, que significa o aparecimento de células inflamatórias ou células miogênicas; núcleos centralizados, caracterizando biogênese proteica e contração acelerada dos miofilamentos, apontando acúmulo de cálcio.

Para demonstrar a efetividade do nosso tratamento frente às alterações estruturais induzidas pelo modelo de trauma muscular realizamos uma análise histológica cinco dias após lesão. Morfologicamente é possível observar que o grupo LM apresenta destruição da área transversa da fibra muscular compatível com o modelo de lesão, sendo possível observar áreas com aumento do influxo de células inflamatórias na área periférica à lesão e nas áreas entre as fibras (Bertolini, 2008).

Entretanto no grupo LM + USP + GNPs + IBU o aspecto morfológico das fibras apresentava-se com características normais, com presença de núcleo periférico, além de poucas áreas com infiltrado de células inflamatórias. Este resultado parece ser consequência da diminuição e/ou aceleração do processo inflamatório agudo promovido pelo uso das terapias associadas, as quais também indicam favorecer a rápida transição para a resposta crônica evitando os efeitos deletérios da fase aguda.

Acreditamos que esse resultado foi obtido pelos potenciais efeitos destes métodos terapêuticos sobre o tecido. Conforme Fyfe et al. (1982, 1984), durante a fase inflamatória do processo de cicatrização, o USP poderia ativar as células imunológicas para migrar para o local da lesão. Em dois estudos separados, os autores mostraram indução com USP ( $0,5 \text{ W / cm}^2$ ) de degranulação de mastócitos e liberação de histamina em modelos de lesão *in vivo*. Resultados similares foram relatados pelos mesmos autores para mastócitos dérmicos, demonstrando que a terapia por USP pode acelerar a fase de cicatrização inflamatória para lesões / úlceras cutâneas *in vivo* (ratos Wistar, 0,75-3 MHz, 0,25-3 W /  $\text{cm}^2$ ).

No estudo de Liao (2016), utilizando diclofenaco de sódio, também AINEs, foi verificado via análise histológica uma diminuição na proliferação de células inflamatórias e do edema em um modelo de lesão articular em ratos. Em nosso trabalho não obtivemos resultados satisfatórios no uso do ibuprofeno separadamente. Acreditamos que o ibuprofeno não foi capaz de reverter o infiltrado celular por se tratar de um modelo de lesão traumático de alta intensidade, diferente dos outros modelos já utilizados na literatura. O estudo realizado por Toufexi et al.,(2016) obteve resultados benéficos, porém com 10 dias de utilização do fármaco sobre um modelo de lesão articular.

Os efeitos das GNPs sobre o processo de regeneração tecidual também já foram investigados. Juan Ge et al.,2018, realizaram um estudo onde ratos foram expostos a um modelo de lesão muscular através de incisão anterolateral na pele feita para expor o músculo tibial anterior, e posteriormente tratados com hidrogel de GNPs. Após 4 semanas de tratamento com o gel, o corte foi preenchido por tecido e a regeneração confirmada por análise histológica. No nosso modelo, no entanto, o uso das GNPs aplicado de forma tópica não desencadeou esta mesma resposta ao tecido danificado, o que pode estar relacionado ao menor prazo de utilização das GNPs. Através da análise histológica, nossos resultados apontam que apenas o

grupo LM+ USP+ GNPs+ IBU obteve reversão das alterações causadas pela lesão muscular e do quadro inflamatório agudo.

As mudanças estruturais replicadas pelo grupo que recebeu todas as terapias apenas se fizeram possíveis devido aos seus efeitos combinados, as três terapias possuem efeitos anti-inflamatórias e antioxidantes, mas apenas utilizadas em conjunto foi possível obter resultados significantes. Supõe-se que devido as GNPs serem ótimas carreadoras de droga quando utilizadas associadas a fármacos tendem a potencializar o efeito do mesmo. O ultrassom por sua vez aumenta a permeabilidade da membrana por meio da cavitação facilitando a entrada do fármaco (fonoforese) e também das GNPs para o local da lesão. As GNPs por possuírem carga positiva se ligam aos radicais livres diminuindo os danos causados pelas células inflamatórias, também reduzindo a vinda de mais células imigratórias como os monócitos ao local da lesão, acelerando a fase inflamatória aguda tornando o meio mais propício a fase de regeneração tecidual. Além de alterações histológicas relacionadas ao processo inflamatório, a lesão traumática leva à perda de função e principalmente à dor. Os mecanismos de indução da dor pela inflamação têm sido extensivamente estudados, no entanto, os mecanismos de resolução da dor não são totalmente compreendidos.

A alta incidência de dor como queixa principal da lesão faz com que esse sinal clínico deva ser mais bem estudado. Em nosso estudo, avaliamos a dor por meio de dois métodos: a hiperalgesia mecânica (limiar mecânico) e térmica (limiar nociceptivo) em 24 hrs e 120 hrs após o modelo de trauma muscular. Nossos resultados mostram que 24 horas após a lesão todos os grupos apresentaram dor tanto no limiar mecânico como no escore de nocicepção pelo frio. Entretanto, ao analisarmos nossos resultados 120 hrs após lesão, o grupo LM + GNPs foi o único que não demonstrou redução significativa dos parâmetros analisados em comparação ao grupo LM. Maior redução foi obtida pelo grupo LM + USP + GNPs + IBU ( $p < 0,01$ ). Em relação ao limiar mecânico todos os grupos tratados alcançaram resultados satisfatórios, porém, os grupos LM + USP, LM + USP + IBU e LM + USP + GNPs + IBU demonstraram diferença significativa maior ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo LM.

Os mecanismos de ação que podem fundamentar o efeito analgésico das terapias utilizadas neste estudo já foram documentados (Altan, 2018; Haar, 2007; Gopikrishna e Parameswaran, 2003). O USP é considerado uma das modalidades

fisioterapêuticas mais importantes no tratamento da dor musculoesquelética, sendo um método conhecido por aumentar a proliferação celular, aumentar a permeabilidade de membrana e diminuir o influxo de cálcio e sódio comum na lesão muscular, assim auxiliando na resolução do processo inflamatório e na formação do edema (Altan, 2018). Outro efeito bastante descrito na literatura do USP é o micromassagem, onde a passagem das ondas mecânicas induz deformação tecidual gerando um aumento no retorno venoso e linfático. Estudos propostos por Haar (2007) e Machado (1991) apontam que o USP também atua através da diminuição da produção de vasodilatadores.

O ibuprofeno é um Aines não seletivo capaz de gerar diminuição na produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (Gopikrishna & Parameswaran, 2003), as quais são responsáveis pelos fenômenos de vasodilatação ou vasoconstrição. Ao inibir a vasodilatação, o ibuprofeno secundariamente reduz a permeabilidade da membrana, dificultando a diapedese e infiltração celular nos tecidos. Este menor infiltrado de células, acarreta em menor liberação de mediadores pró-inflamatórios, o que reduz o estímulo aos nociceptores.

Islam et al., (2017) utilizando GNPs reduzidas com um extrato de *Euphorbia Mili* observaram diminuição na dor e edema, e propuseram que as GNPs podem agir como agentes moduladores da geração de impulsos dolorosos, corroborando com os achados deste estudo. Sugerimos que este efeito analgésico obtido foi decorrente da diminuição de citocinas pró inflamatórias pela inibição da cascata do NF-KB e pelo efeito scavenger de radicais livres. Em outro estudo, Sangsu Bang et al. (2018) obtiveram resultados que também corroboram com nossos achados aonde o acúmulo de citocinas pró inflamatórias provocam dor ao se ligar aos receptores dos nociceptores nos diferentes tecidos após uma lesão muscular. Além disso, neste mesmo estudo foi observado que a dor decorrente do processo inflamatório pode ser amenizada através da regulação da fagocitose (Sangsu Bang et al., 2018).

Tomados em conjunto, nossos resultados permitem observar que a diminuição de citocinas pró inflamatórias e o aumento das anti-inflamatórias, ocorreu simultaneamente à diminuição do quadro algico e da formação de ROS e foi acompanhado por mudanças estruturais nos tecidos, como redução da proliferação celular e centralização de núcleos.

## 8 CONCLUSÃO

A associação entre as nanopartículas de ouro e o ibuprofeno administrados através do ultrassom pulsado, promoveu efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, além do efeito analgésico e do retorno a morfologia normal do tecido muscular após lesão traumática. Elucidados através da resolução acelerada da fase aguda, antecipando o início da fase de reparo tecidual, mediante a diminuição de citocinas pró-inflamatórias e concomitante aumento de citocinas anti-inflamatórias, além de melhora na morfologia do tecido muscular, com reversão do quadro de estresse oxidativo. Estes efeitos estão envolvidos diretamente na analgesia proporcionada pela fonoforese com GNPs e ibuprofeno.

Apesar dos efeitos promissores encontrados neste estudo, mais pesquisas devem ser realizadas através de metodologias diferentes com análises da imunohistoquímica e imunofluorescência no intuito de avaliar a polarização de macrófagos e seus fenótipos. Além disso, estudos devem ser direcionados para melhor compreensão da interação das GNPs com esses tipos de fármacos, bem como sua utilização em diferentes concentrações, diâmetros e tempos de tratamento na lesão muscular

A fonoforese apresentou efeito promissor no transporte de moléculas através do aumento da permeabilidade da membrana, tornando-se um meio eficiente na administração de moléculas como as GNPs associadas ao ibuprofeno. Contudo, mais estudos devem ser direcionados para melhor compreensão da interação das GNPs com esses tipos de fármacos, bem como sua utilização em diferentes concentrações, diâmetros e tempos de tratamento na lesão muscular.

## REFERENCIAS

Abat F, Valles S-L, Gelber P-E, Polidori F, Jorda A, Garcías-Herreros S, Monllau J-C, Sanchez-Íbañez. An experimental study of muscular injury repair in a mouse model of notexin-induced lesion with EPI technique. *BMC Sports Science, Medicine, and Rehabilitation*. 2015; 7 (7): 1-7.

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984; 105:121-126.

Alfredo PP, Anaruma CA, Pião AC, João SM, Casarotto RA. Effects of phonophoresis with Arnica montana onto acute inflammatory processing rat skeletal muscles: an experimental study. *Ultrasonics*. 2009; 49(4-5): 466-471.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001; 302(2-3):141-5.

Alfredo PP, Anaruma CA, Pião AC, João SM, Casarotto RA. Effects of phonophoresis with Arnica montana onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: an experimental study. *Ultrasonics*. 2009 May;49(4-5):466-71

Altan L, Kasapoğlu Aksoy M, Kösegil Öztürk E. Efficacy of diclofenac & thiocolchioside gel phonophoresis comparison with ultrasound therapy on acute low back pain; a prospective, double-blind, randomized clinical study. *Ultrasonics*. 2018 Jan;91:201-205.

Andrade RM, Gagliardi JFL, Kiss MAPD. Relação entre índices de muscularidade e o desempenho do salto vertical. *Revista brasileira de ciência e movimento*, 2007;15(1):61-7.

Araújo, Raimundo Fernandes de, Aurigena Antunes de Araújo, Jonas Bispo Pessoa, Francisco Paulo Freire Neto, Gisele Ribeiro da Silva, Ana Luiza C.S. Leitão Oliveira, Thaís Gomes de Carvalho, et al. 2017. "Anti-Inflammatory, Analgesic and Anti-Tumor Properties of Gold Nanoparticles." *Pharmacological Reports* 2016. 69 (1): 119–29.

Arunachalam AM et al. Diagnostics and Therapeutic Application of Gold Nanoparticles. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014 ; Vol 6, Suppl 2, 74-87.

Arvizo RR et al. Intrinsic Therapeutic Applications of Noble Metal Nanoparticles: Past, Present and Future. *Chem Soc Rev*. Author manuscript; available in PMC. 2013.

Balbino CA et al. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*;2005;41(5).

Baoge et al.,. Treatment of Skeletal Muscle Injury: A Review. Volume 2012 (2012), Article ID 689012, 7 pages.

Balasubramanian S.K, Yang L.,Yung L.Y, Ong C.N, Ong WY, Yu LE. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*.2010; 31: 9023-9030.

Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60: 1289–1306.

Barathmanikant S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SR, Youn HS, Eom S, Gurunathan S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *Journal of Nanobiotechnology*. 2010; 8: 16.

Bar-shai M, Carmeli E, Ijubuncic P, Reznick AZ. Exercise and immobilization in aging animals: The involvement of oxidative stress and NF-kB activation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008; 44: 202-214.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for sod. *Meth Biochem Anal*. 1987; 32:279-312.

Bertolini GRF, Karvat J, Kakihata CMM, Vieira L, Silva JLDC, Ribeiro LFC, Brancalhão RMC. Analysis of the muscle tissue of Wistar rats submitted to the sciatic nerve compression model and cryotherapy. *Einstein (Sao Paulo)*. 2018 Sep 17;16(3).

Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm *Nat Immunol*. 2010;11(10): 889-96.

Bloch Y, Bouchareychas L, Merceron R, Składanowska K, Van den Bossche L, Detry S, Govindarajan S, Elewaut D, Haerynck F, Dullaers M, Adamopoulos IE, Savvides SN. Structural Activation of Pro-inflammatory Human Cytokine IL-23 by Cognate IL-23 Receptor Enables Recruitment of the Shared Receptor IL-12Rβ1. *Immunity*. 2018 Jan 16;48(1):45-58

Boldrin e morgan I, activating muscle stem cells: therapeutic potential in musclediseases. *curr. opin. neurol*. 2007; 20:577-82.

Bogliolo I, Brasileiro F, Bogliolo G. *Patologia geral*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 3ed.

Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, Pavlath GK. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physio*. 2004; 287: C475–C483.

Bondesen BA, Mills ST, Pavlath GK. COX-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms. *Am J Physiol Cell Physio*. 2006; 290: C1651–C1659.

Bronaugh H, Maibach E. *Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology-Drug Delivery*. Marcel Dekker, New York and Basel, 1989.

Brooks DG, Brooks WQ, Giu AD, Luster JV. Ravetchv Structure and expression of human IgG FcRII (CD32): 1989. functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple gene.

Bosurgi L, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Macrophages in injured skeletal muscle: a perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration. *Front Immunol.* 2011;2:1-10

Caso J.R. , Lizasoain I. , Lorenzo P. , Moro M.A. , Leza J.C. O papel do fator de necrose tumoral alfa na piora induzida pelo estresse da isquemia cerebral em ratos *Neuroscience.* 2006;142:59-69.

Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F, Lovik M, Macfarlane S, Meyer PD, M'rabet I, Serafini M, Van Eden W, Van Loo J, Vas DW, Vidry S, Winklhofer-roob BM, Zhao J. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr.* 2009; 101 Suppl 1:S1-45.

Cantini M e Carraro U. Macrophage-released fator stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995; 54, 121–128.

Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, Zaniolo G, Mazzoleni F, Vittiello I. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci* 2002; 23, 189–194.

Carpenter. S, Karpati G. *Pathology of skeletal muscle.* New York: Churchill Livingstone. 1984; v. 1.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by cross-linked hemoglobin. *Biomaterials.* 2004; 25:843–850.

Creus KK, Paepe B, Bleecker JL. Idiopathic inflammatory myopathies and the classical NF-kappaB complex: current insights and implications for therapy. *Autoimmun.* 2009; Rev 8: 627–632.

Chazaud BB, Sonnet C, Lafuste P. Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, *et al.* As células satélites atraem monócitos e usam macrófagos como suporte para escapar da apoptose e aumentar o crescimento muscular. *J Cell Biol.* 2003;163(5):1333-3.

Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C..Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev.* 2009;37 (1): 18-22.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994; 53:55–63.

Chan YS *et al.*,. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. 2003.*J Appl Physiol* 95: 771–780,

Chan, YS et al. Using low-intensity pulsed ultrasound to improve muscle healing after laceration injury: an in vitro and in vivo study. *Ultrasound Med Biol.*2010. 36;(5), 743-51.

Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. *Nano Lett.* CrossRefView Record no Scopus.2003:662.

Chen H et al. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. *Plus One.* 2013; Volume 8.

Choi Y. e cols Behavioral siGNPs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59:369-376, 1994.

Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews.* 2004; 104: 293–346.

Da Silva et.al. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1): 17-21.

D'autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8:813-824.

Dalecki D. Mechanical bioeffects of *ultrasound*. *Annu Rev Biomed.* 2004;6:229-48.

Drose, S; Brandt, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol.*2012. 748 145-69

Durán N, Mattoso LHC, Morais PC. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. *Artliber* 2006; 1ª ed. São Paulo.

Draghi F et al. Muscle injuries: ultrasound evaluation in the acute phase. *J Ultrasound.* 2013 May 8;16(4):209-14.

Dohnert, Marcelo B., Mirelli Venâncio, Jonathann C. Possato, Rodrigo C. Zeferino, Luciana H. Dohnert, Alexandra I. Zugno, Cláudio T. De Souza, Marcos M S Paula, and Thais F. Luciano. 2012. "Gold Nanoparticles and Diclofenac Diethylammonium Administered by Iontophoresis Reduce Inflammatory Cytokines Expression in Achilles Tendinitis." *International Journal of Nanomedicine* 7: 1651–57.

Dong J, Sulik KK, Chen SY. The role of NOX enzymes in ethanolinduced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicol Lett* 2010;193:94–100.

Dyson M. Mecanismos Involved in therapeutic ultrasound. *Physioterapia* 1987; 73(3):116-130.

Eming SA et.,al. Gene therapy and wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25:79-92,

Ekstrand J, Hägglund M, e Waldén M. Injury incidence and injury patterns in professional football: The UEFA injury study. *British Journal of Sports Medicine*. 2011; 45(7), 553–558.

Fernandes TL et al. Muscle injury: physiopathology, diagnostic, treatment and clinical presentation. *Rev. bras. ortop.* [online]. 2011; 43(3):247-55.

Ferreira, CM; Silva, AM; Sudo, RT; Takiya, CM; Machado, JC. Laceration in rat gastrocnemius. Following-up muscle repairing by ultrasound biomicroscopy (in vivo), contractility test (ex vivo) and histopathology. *Acta Cir Bras.*2015. 30;(1), 13-23.

Filho CFM et al. Laceration in rat gastrocnemius. Following-up muscle repairing by ultrasound biomicroscopy (in vivo), contractility test (ex vivo) and histopathology. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2015; 30 (1): 13.

Fielding RA, Manfredi TJ, Ding WJ, Fiatarone MA, Evans JG. Cannon. Acute-phase response in exercise .3. Neutrophil and Il-1-beta accumulation in skeletal-muscle. *Am J Physiol*. 1993; 265 (1):166-R172

Fisher BD, Hiller CM, Renne SGA. A comparison of continuous ultrasound and pulsed ultrasound on soft tissue injury. *Journal Physiotherapy Science* 2003; 15: 65-70.

Flohé L, Gunzler W. Assay of glutatione peroxidase. *Methods in Enzymology*.1984; 105: 114-21.

Freitas LBS, Freitas TP, Rocha LG, Silveira P, Pinho RA, Streck EL. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative. *Cell Biology International* 2007; 31:482-488

Frenette J., Cai B. and Tidball J. Complement activation promotes muscle inflammation during modified muscle use. 2000. *Am. J. Pathol*. 156, 2103-2110.

Fukushima K, Badlani N, Usas A. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *The American Journal of Sports Medine*. 2001; 29: 394-402.

Fyfe M, Chahl L: Mast cell degranulation: a possible mechanism of action of therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1982, 8:62-65.

Fyfe M, Chahl L: Mast cell degranulation and increased vascular permeability induced by 'therapeutic' ultrasound in the rat ankle joint.*Br J Exp Pathol* 1984, 65(6):671-676.

Geers B, Dewitte H, De Smedt SC, Lentacker I. Crucial factors and emerging concepts in ultrasound-triggered drug delivery. *J Control Release*. 2012 Dec 28;164(3):248-55.

Gratieri T et al. Princípios Básicos e Aplicação da Iontoforese na Penetração Cutânea e Fármacos. *Quim Nova*. 2008; 31(6):1490-98.

Gigante A et al. The effects of growth factors on skeletal muscle lesions. *Joints*. 2013; 1(4):180-186.

Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin *Nature*, 1990;346 (6281):274-6.

Gorospe JR, Nishikawa BK, Hoffman EP. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *J Neurol Sci*, 1996;135 (1) (1996):10-7.

Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60:1307-1315.

Gopikrishna V, Parameswaran A. Effectiveness of prophylactic use of rofecoxib in comparison with ibuprofen on postendodontic pain. *J Endod*. 2003; 29(1): 62-64.

Guspa S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol*. 2002; 22;185-94.

Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Path Res Pract* 1991;187:1-22.

Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TN, Smilowitz HM. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *British journal of radiology*. 2006; 79: 248–253.

Haar TG. Therapeutic applications of ultrasound. *Biophysics & Molecular Biology* 2007; 93: 111–129.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine*. 4<sup>a</sup> ed. New York. 2007; University Press.

Halliwell B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans*. 1996; 24(4): 1023-7.

Hassan MA, Campbell P, Kondo T: The role of Ca(2+) in ultrasound-elicited bioeffects: progress, perspectives and prospects. *Drug Discov Today* 2010, 15(21-22):892-906.

Hayden MS, Ghosh S. Nf-Kappab. The First Quarter-Century: Remarkable Progress and Outstanding Questions. *Genes Dev*. 2012; 26, 203–234.

H Wang , W Wei , SY Zhang , YX Shen , NP Wang , L Yue , *etal*. Nanopartículas de melatonina-selênio protegem o fígado contra lesão imunológica induzida pelo bacilo Calmette-Guerin e lipopolissacarídeo *Acta Pharmacol. Sin* .2005;6:745-52.

Hawke TJ, Geary DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. (vol 91, pg 534, 2001). *J Appl Physiol*,2001; 91 (6): U36–U36.

Herwadkar A, Sachdeva V, Taylor LF, Silver H, Banga AK. Low frequency sonophoresis mediated transdermal and intradermal delivery of ketoprofen. *Int J Pharm.* 2012; 423: 289–296.

Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional Regulation Via the Nf-Kappab Signaling Module. *Oncogene.* 2006;.25, 6706–6716.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976; 74(1):214-26.

Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers *in vitro*. *Ultrasound in Medicine & Biology.* 2005; 31: 1701–1706.

Hillyer JF , Albrecht RM. Persorção gastrointestinal e distribuição tecidual de nanopartículas de ouro coloidal de tamanhos diferentes *J. Pharm. Sci.* 2001;90:1927-36.

Hsieh YL, Chen HY, Yang CC. Early Intervention with Therapeutic Low-Intensity Pulsed Ultrasound in Halting the Progression of Post-traumatic Osteoarthritis in a Rat Model. *Ultrasound Med Biol.* 2018 Dec;44(12):2637-2645.

Huard J et al. Muscle Injuries and Repair: Current Trends in Research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84 (5): 822 -832.

Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M.. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc.* 1991; (7):801-10.

Huang TL, Chang CC, Lee CH, Chen SC, Lai CH, Tsai CL. Intra-articular injections of sodium hyaluronate (Hyalgan®) in osteoarthritis of the knee. A randomized, controlled, double-blind, multicenter trial in the Asian population. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12:221–8.

Islam NU, Khan I, Rauf A, Muhammad N, Shahid M,, Shah MR. Antinociceptive, muscle relaxant and sedative activities of gold nanoparticles generated by methanolic extract of *Euphorbia milii*. *BMC Complement Altern Med.* 2017 May 29;15:160.

Jankowski RJ, Deasy BM, Cao B, Portões C, Huard J J. O papel da expressão de CD34 e da fusão celular na capacidade de regeneração de células progenitoras miogênicas. *Cell Sci.* 22 de novembro de 2002; 115 (Pt 22): 4361-74.

Jarvinen TA et.al. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014; 24;3(4):337-45.

Järvinen TA, Järvinen TLI, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *The American Journal of Sports Medicine*. 2005; 33(5): 745-764.

Jeon KI, Byun MS, Jue DM. Gold compound auranofin inhibits IkappaB kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKKbeta subunit. *Exp Mol Med*. 2003; 35(2):61-6.

Jiang F, Zhang Y, Disting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev*. 2011;63:218-42.

Ji SM, W JJK, Tack JK, Sang KY, Min DC, Hhyun K, Dong WK, Won KL, Kwang HL. Nanopartículas de ouro atenuam a produção de no induzida por Ips através da inibição das vias nf-kb e ifn- $\beta$  / stat1 em células raw264.7

Juan Ge, Kai Liu, Wen Niu, Mi Chen, Min Wang, Yumeng Xue, Chuanbo Gao, Peter X, Bo Lei. Gold and gold-silver alloy nanoparticles enhance the myogenic differentiation of myoblasts through p38 MAPK signaling pathway and promote in vivo skeletal muscle regeneration, 2018.

Konig, D; Wagner, KH; Elmadfa, I; Berg, A. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. *Exerc Immunol Rev*. 2001. 7 108-33.

Kjaer M. Mackey AL, Rasmussen LK, Kadi F, Schjerling P, Helmark IC, Ponsot E, Aagaard P, Durigan JL, Activation of satellite cells and the regeneration of human skeletal muscle are expedited by ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory medication. *FASEB J*. 2016 Jun;30(6):2266-81.

Karthick V et al. Effect of biologically synthesized gold nanoparticles on alloxan-induced diabetic rats—An in vivo approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;

Kalogeris T e cols. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012; 298: 229–317. doi: 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7

Kirkendall DT, Garrett WE. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. *Clin Orthop Relat Res* Oct. 2002; S81-S89.

Kim TY, Jung DI, Kim YI, Yang JH, Shin SC. Anesthetic Effects of Lidocaine Hydrochloride Gel using Low Frequency Ultrasound of 0.5 MHz. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* .2007; 10(1): 1-8.

Kitchen, S.S.; Partridge, C.J. A review of therapeutic ultrasound: I. Background, physiological effects and hazards. *Physiotherapy*, v.76, p.593, 1990.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins patologia básica. Rio de Janeiro. Elsevier. 2013; 9 ed.

Kurniawan, Alfin, Farrel Gunawan, Adi Tama Nugraha, Suryadi Ismadji, and Meng Jiy Wang. 2017. "Biocompatibility and Drug Release Behavior of Curcumin Conjugated Gold Nanoparticles from Aminosilane-Functionalized Electrospun poly(N-Vinyl-2-Pyrrolidone) Fibers." *International Journal of Pharmaceutics*. 2017. 516 (1–2): 158–69.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 15: 680-685.

Larsen A. , Kolind K. , Pedersen D.S. , Doering P. , Pedersen M.O. , Danscher G. , Penkowa M. , Stoltenberg M. O tratamento com partículas metálicas de ouro reduz a inflamação neuronal e a morte celular apoptótica após lesão cerebral focal *Histochem. Cell Biol.*2008;130:681-92.

Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 1: a001651.

Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004; 20: 61–86.

Lescaudron L, Peltekain E, Fontaine-perus J, Paulin D, Zampieri M, Garcia I, Parrish E. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord*. 1999; 9, 72–80.

Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 1990; 186:464-478.

Li YP. TNF- $\alpha$  is a mitogen in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2003; 285: 370–376.

Liao AH, Chung HY, Chen WS, Yeh MK. Efficacy of Combined Ultrasound-and-Microbubbles-Mediated Diclofenac Gel Delivery to Enhance Transdermal Permeation in Adjuvant-Induced Rheumatoid Arthritis in the Rat. *Ultrasound Med Biol*. 2016 Aug;42(8):1976-85.

LI G. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. *Physiological Research*. 2005; 54: 193-199.

Liu XH et al. Effects of Nitric Oxide on Notexin-Induced Muscle Inflammatory Responses. *Int J Biol Sci*. 2015; 11(2): 156–167.

Liu Y, Yang H, Takatsuki H, Sakanishi A. Efeito da exposição de ultra-som em Ca<sup>2+</sup> + atividade ATPase da membrana plasmática das células arborescens calos Aloe. *Ultrasom Sonochem*. 2006; 13:232-6.

Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008; 137:473-7.

Longaker MT, Peled ZM, Chang J, Krummel TM. Fetal wound healing: progress report and future directions. *Surgery*. 2001; 130(5): 785-7.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951; 193:265-275.

Low, J.; Reed, A. Ultra-som terapêutico. *Eletroterapia aplicada: princípios e prática*. São Paulo: Manole, 2001. Cap.6, p.187-228

MacIntyre D.L., Reid W.D., Lyster D.M. and McKenzie D.C. Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. *Eur. J. Appl. Physiol*. 2000;81: 47-53.

Madaro L, Bouche M. From innate to adaptive immune response in muscular dystrophies and skeletal muscle regeneration: the role of lymphocytes. *BioMed Res Int* (2014).

Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Song MD, Kang H, Kim DW, Moon WK, Lee KH. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide*. 2010; 1;23(3):214-9.

Maestrelli ML. González R, Rabasco AM, Mura P. Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm*. 2005; 298, pp. 55–67.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization *Trends Immunol*,2004;25(12):677-689.

Matheus JPC et al. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. *Rev Bras Fisioter*.2008 ;12(3):241-7.

Markert CD. Nonthermal Ultrasound and Exercise in Skeletal Muscle Regeneration. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2005; 86: 1304-1310.

Matheus JPC et al. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. *Rev Bras Fisioterapia*. 2008;12(3):241-7.

Matsuo M, Kaneko T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z, editor. *Free Radicals in Exercise and Aging Champaign*. Human Kinetics. 2001; 78: 1-33.

Martins LB, Lana JP, Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Yamada LT, Vieira LQ, Teixeira MM, Ferreira AV. TNF and IL-18 cytokines may regulate liver fat storage under homeostasis conditions. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016 Dec;41(12):1295-1302.

Meshali MM, Abdel-Aleem HM, Sakr FM, Nazzal S, El-malah Y. In vitro phonophoresis: effect of ultrasound intensity and mode at high frequency on NSAIDs transport across cellulose and rabbit skin membranes. *Pharmazie*. 2008; 63:49-53.

Mendonça RJ, Netto JC. Aspectos celulares da Cicatrização. *An Bras Dermatol*. 2009;84(3):257-262.

Minamoto VB, Salvini TF. Long-term regeneration of rat skeletal muscle after periodic contusions. *Rev bras fisioter*. 2002; 6, (3): 147-154

Mishra DK, Friden J, Schmitz M, Lieber RL. Anti-inflammatory after muscle injury. *J Bone Joint Surg* .1995; 77: 1410–1519.

Machado CM. Eletroterapia prática. 2ª ed. São Paulo; 1991.

Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharmaceutical Research*.1996;13(3):411-20.

Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, Atala A, Mukhopadhyay D, Soker S. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical cancer research*. 2005; 11: 3530–3534.

Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005; 86:1304–10.

Page S, Powell M. Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1381: 191-202

Paliwal S, Mitragotri S. Therapeutic opportunities in biological responses of ultrasound. *Ultrasonics*.2008; 48(4): 271–278.

Park JE, Abrams MJ, Efron PA, Barbul A. Excessive nitric oxide impairs wound collagen accumulation. *J Surg Res*.2013; 183(1):487-92.

Pattwell DM, McArdle A, Morgan JE, Patridge TA, Jackson MJ. Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2004 Oct 1;37(7):1064-72.

Pedersen MO, Larsen A, Pedersen DS, Stoltenberg M, Penkowa M. Metallic gold reduces TNF $\alpha$  expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury. *Brain Research*. 1271: 103-13. 2009.

Poderoso JJ, Carreras MC, Llistero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1996; 328(1):85-92.

Prisk V, Huard J. Muscle injuries and repair: The role of prostaglandins and inflammation. *Histology Histopathology*. 2003; 18(4): 1243-1256.

Pinto SS, Castillo AA. Lesão Muscular: Fisiopatologia e Tratamento. Rev. Fisioterapia em Movimento, 1998; 12(2):23-36.

Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: anti-inflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res.* 2004; 94: 119– 126.

Polat BE, Hart D, Langer R, Blankschtein D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: mechanisms, scope, and emerging trends. *J. Control Release.* 2011; 152: 330-348.

Powers SK, Jackson mj. Exercise induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2009; 88(4):1243-76.

Pottenger FJ, Karalfa BL. Utilization of hydrocortisone phonophoresis in United States Army physical therapy clinics. *Mil Med.* 1989; 154:355–358.

Robbins. Patologia Básica. 2010; 9ª Ed.

Radley HG, Grounds MD. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice *Neurobiol Dis*, 23 (2) (2006), pp. 387-397

Rao PN, Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* 2008; 11:81–110.

Rahusen FT. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury. *Am j Sports med.* 2004; 32(8):1856-9.

Reid MB, Moody MR. Dimethyl sulfoxide depresses skeletal muscle contractility. *Journal of applied physiology.* 1994; 76: 2186–2190.

Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas DSC, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, González J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(7): 704-13.

Rosim GC, Barbieri CH, Lanças FM, Mazzer N. Diclofenac phonophoresis in human volunteers. *Ultrasound in Medicine & Biology.* 2005; Vol. 31, No. 3, pp. 337-43.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 2009; 84:705-12.

Saliba S, Mistry DJ, Perrin DH, Gieck J, Weltman A. Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing. *Journal of athletic training* 42(3): 349-54. 2007.

Sangsu B, Xie YK, Zhang ZJ, Wang Z, Xu ZZ, Ji RR. GPR37 regulates macrophage phagocytosis and resolution of inflammatory pain. *J Clin Invest.* 2018 Aug 1;128(8):3568-3582.

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. *Langmuir.* 2005(21):10644.

Serrano AL, Baeza-rajá B, Perdiguero M, Muñoz-canoves P. Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metabolism.* 2008; 7: 33–44.

Schäfer MM, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research.* 2008;58:165-171.

Stratford PW, Levy DR, Gauldie S, Miferi D, Levy K. The evaluation of phonophoresis and friction massage as treatments for extensor carpi radialis tendinitis: a randomized controlled trial. *Physiother Can.* 1989;41:93–99.

Sena MM, Chaudhry ZF, Collins CH, Poppi RJ. Determinação directa do diclofenaco em formulações farmacêuticas contendo vitaminas B, usando espectrofotometria de UV e regressão por mínimos quadrados parciais. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 36: 743-749.

Signori LU, Costa ST, Neto AF, Pizzolotto RM, Beck C, Sbruzzi G, Silva AM, Plentz RD. Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. *Physiotherapy.* 2011; 97:163-9.

Shi ME et al. Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. *Stem Cells.* 2009; 27(4):949-60.

Schoenfeld, 2012. Does exercise-induced muscle damage play a role in skeletal muscle hypertrophy. *J Strength Cond Res.* 2012 May;26(5):1441-53.

Shukla R et al. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment. A Microscopic Overview. 2005; *Langmuir.*

Silva OL. Estudo do mecanismo da ação do ultra-som na estimulação do tecido ósseo. (Dissertação). São Paulo: UNESP; 1987.

Silveira PC, DA Silva LA, Tromm PT, Scheffer DDA, De Souza CT, Pinho RA. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide phonophoresis on oxidative stress parameters after injury induced by eccentric exercise. *Ultrasonics.* 2012; 52(5):650-4.

Silveira PC, Da Silva LA, Pinho CA, De Souza CT, Ronsani MM, Scheffer DDA, Pinho RA. Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2):431-6.

Silveira PCL et al. Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds. *Materials Science and Engineering*. 2014; 44 -380–385.

Simonin JP. On the mechanisms of in vitro and vivo phonophoresis. *Journal Of Controlled Release*. 1995; 33:125-141.

Smith RH, Palmer RM, Reeds PJ. Protein synthesis in isolated rabbit forelimb muscles. The possible role of metabolites of arachidonic acid in the response to intermittent stretching. *Biochem J*. 1983; 214: 153–161.

Sonaje K, Italia JL, Sharma G, Bhardwaj V, Tikoo K, et al. Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *Pharm*. 2007; Res 24: 899–908.

Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008; 66(2):274-80.

Souza CT Silva LA, Tromm CB, Da Rosa G, Bom K, Luciano TF, Tuon T, , Pinho RA. Creatine supplementation does not decrease oxidative stress and inflammation in skeletal muscle after eccentric exercise. *J Sports Sci*. 2013; 31(11):1164-76

Stevenson R et al. Nanoparticles and Inflammation. *The Scientific World Journal*. 2011; 11, 1300–1312.

Sumbayev VV et al. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 $\beta$ -induced pro-inflammatory responses. *Small*. 2013; 11;9(3):472-7.

Sumbayev, Vadim V., Inna M. Yasinska, Cesar Pascual Garcia, Douglas Gilliland, Gurprit S. Lall, Bernhard F. Gibbs, David R. Bonsall, Luca Varani, François Rossi, and Luigi Calzolari. 2013. "Gold Nanoparticles Downregulate Interleukin-1 $\beta$ - Induced pro-Inflammatory Responses." *Small* 9 (3): 472–77.

Sul OJ, Kim JC, Kyung TW, Kim HJ, Kim YY, Kim SH, Kim JS, Choi HS. Gold nanoparticles inhibited the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclast formation by acting as an antioxidant. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2010; 74(11): 2209-13.

Starkey, C. Recursos terapêuticos em fisioterapia. 2.ed. São Paulo: Manole, 2001. 404p

Singh AK, Tripathi YB, Pandey N, Singh DP, Tripathi D, Srivastava ON. Enhanced antilipoplysaccharide (LPS) induced changes in macrophage functions by *Rubia cordifolia* (RC) embedded with Au nanoparticles. *Free Radic Biol Med*. 65:217-23. 2013

Spinosa HS, Górnaiak SL, Bernardi, MM. Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária. 4a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, c2006. p. 918

Stewart M. D., Lopez S., Nagandla H., Soibam B., Benham A., Nguyen J., Valenzuela N., Wu H. J, Burns A. R, Rasmussen T. L, Tucker H. O, Schwartz R. J. Mouse myofibers lacking the SMYD1 methyltransferase are susceptible to atrophy, internalization of nuclei and myofibrillar disarray. *Dis Model Mech.* 2016; 9:347-59.

Talukder MA, Johnson WM, Varadharaj S, Lian J, Kearns PN, El-Mahdy MA, Liu X, Zweier JL. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:388-96.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288 (2) (2005), pp. R345-R353.

Tidball JG, Yillalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 298(5):1173-87.

Tidball JG. Regulação do crescimento muscular e regeneração pelo sistema imunológico . *Nat Rev Immunol* . 2017; 17 : 165-178.

Tsai CH, Shiau A, Chen S. Amelioration of collagen-Induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis & Rheumatism.* 2007; 56: 544-554.

Tsai, Chiau-Yuang, Shiou-Ling Lu, Chia-Wen Hu, Chen-Sheng Yeh, Gwo-Bin Lee, and Huan-Yao Lei. 2012. "Size-Dependent Attenuation of TLR9 Signaling by Gold Nanoparticles in Macrophages." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (1): 68–76.

Tsuang YH, Liao LW, Chao YH, Sun JS, Cheng CK, Chen MH, Weng PW. Effects of Low Intensity Pulsed Ultrasound on Rat Schwann Cells Metabolism. *Artificial Organs.* 2011; 35(4): 373–383.

Tezel A e Mitragotri S. Investigations of the role of cavitation in low-frequency sonophoresis using acoustic spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* 2002; 91:444–453.

Torabinejad M, Cymerman JJ, Frankson M, Lemon RR, Maggio JD, Schilder H. Eficácia de vários medicamentos no tratamento da dor seguinte instrumentação completa. *J Endod.* 1994; 20: 345-54.

Toufeixi E, Dailianis S, Vlastos D, Manariotis ID. Mediated effect of ultrasound treated diclofenac on mussel hemocytes: first evidence for the involvement of respiratory burst enzymes in the induction of dcf-mediated unspecific mode of action. *Aquat Toxicol.* 2016 Jun;175:144-53.

Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55-75

- Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003; 189: 41-54.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44-84.
- Van Antwerpen P, Nève J. In vitro comparative assessment of the scavenging activity against three reactive oxygen species of non-steroidal anti-inflammatory drugs from the oxicam and sulfoanilide families. *Eur J Pharmacol*. 2004 Aug 2;496(1-3):55-61.
- Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*. 1998; 104:2–8.
- Vella L, Markworth JF, Peake JM, Snow RJ, Cameron-Smith D, Russell AP. Ibuprofen supplementation and its effects on NF- $\kappa$ B activation in skeletal muscle following resistance exercise. *Physiol Rep*. 2014 Oct 24;2
- Victor EG et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012; 10:11.
- Warner TD, Giuliano F, Yojnovic J, Bukasa A, Mitchell JA. Selectividades de drogas não esteróides para ciclo-oxigenase-1 em vez de ciclo-oxigenase-2 estão associadas com toxicidade gastrointestinal em humano: uma análise completa in vitro. *Proc Natl Acad Sci EUA*.;96:7563-7568. 1999.
- Werner SL, Barken D, Hoffmann A. *Science*. 2005; 309:1857–1861.
- Werner, S; Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. v.83, p.835-870, 2003.
- Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *International journal of sports medicine*. 2004; 25:73-77.
- William D, O'Brien J: Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2007, 93:212-255.
- Wing M. Phonophoresis with hydrocortisone in the treatment of temporomandibular joint dysfunction. *Phys Ther*. 1982;62:32–33.
- Yan WF, Petkov V, Mahurin SM, Overbury SH, Dai S. Powder XRD analysis and catalysis characterization of ultra-small gold nanoparticles deposited on titania-modified SBA-15. *Catal. Commun*. 2005; 6, 404-408.

Yang JH, Kim TY, Lee JH, Yoon SW, Yang KH, Shin SC. Anti-Hyperalgesic and Anti-Inflammatory Effects of Ketorolac Tromethamine Gel using Pulsed Ultrasound in Inflamed Rats. *Archives of Pharmacal Research*. 2008; 31: 511-517.

Zhang z, A. Berg, H. Levanon, R.W. Fessenden, D. Meisel, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 7959.

Zalin RJ. The role of hormones and prostanoids in the in vitro proliferation and differentiation of human myoblasts. *Exp Cell Res*. 1987; 172: 265–281.

Z Nie , Liu KJ , Zhong CJ , LF Wang , Yang Y , Q Tian , *et al.*Atividade aprimorada de eliminação de radicais livres por nanopartículas de ouro funcionalizadas com antioxidantes: uma nova inspiração para o desenvolvimento de novos antioxidantes artificiais. *Radic Livre Biol. Med* . 2007;43:1243-54.

Zortéa D, Silveira PC, Souza PS, Fidelis GS, Paganini CS, Pozzi BG, Tuon T, De Souza CT, Paula MM, Pinho RA. Effects of phonophoresis and gold nanoparticles in experimental model of muscle overuse: role of oxidative stress. *Ultrasound Med Biol*. 2015 Jan;41(1):151-62.

**ANEXO**

**ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais**



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação dos possíveis efeitos da fonoforese com nanopartículas de ouro (GNPs) ligadas a fármacos anti-inflamatórios no tratamento de lesão muscular traumática.**", registrada com o protocolo nº **010/2017-1**, sob a responsabilidade de **Paulo Cesar Lock Silveira**, junto à equipe: Fernando Milanez Dias, Gustavo de Bem, Carolini Mendes, Rubya Pereira Zacaron - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **07/03/2017**.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/03/2017 a 22/12/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	160
Idade/Peso	60 dias / 200 – 300g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**Evaluation of the possible effects of phonophoresis with gold nanoparticles (GNPs) linked to anti-inflammatory drugs in the treatment of traumatic muscular injury.**"

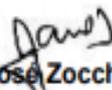
Protocol number: **010/2017-1**

Principal Investigator: **Paulo Cesar Lock Silveira**

Researchers: **Fernando Milanez Dias, Gustavo de Bem, Carolini Mendes, Rubya Pereira Zacaron.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 07 de março de 2017.

  
**Jairo José Zocche**  
Coordenador da CEUA