

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FONOFORESE E ELETROESTIMULAÇÃO
NEUROMUSCULAR EM CÃES: UMA CONTRIBUIÇÃO
PARA A FISIOTERAPIA VETERINÁRIA**

TESE DE DOUTORADO

Charles Pelizzari

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**FONOFORESE E ELETROESTIMULAÇÃO
NEUROMUSCULAR EM CÃES: UMA CONTRIBUIÇÃO PARA
A FISIOTERAPIA VETERINÁRIA**

por

Charles Pelizzari

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Alceu Gaspar Raiser

Santa Maria, RS, Brasil

2011

- 1.
2. P384f Pelizzari, Charles
3. Fonoforese e eletroestimulação neuromuscular em cães : uma contribuição para a
4. fisioterapia veterinária / por Charles Pelizzari. – 2011.
5. 52 f. ; il. ; 30 cm
- 6.
7. Orientador: Alceu Gaspar Raiser
8. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências
9. Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2011
- 10.
11. 1. Medicina veterinária 2. Cão 3. Eletroterapia 4. Diclofenaco sódico 5.
- CLAE
12. 6. Fonoforese I. Raiser, Alceu Gaspar II. Título.
- 13.
14. CDU 619:636.7

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado**

**FONOFORESE E ELETROESTIMULAÇÃO
NEUROMUSCULAR EM CÃES: UMA CONTRIBUIÇÃO PARA
A FISIOTERAPIA VETERINÁRIA**

**elaborada por
Charles Pelizzari**

**como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária**

**Alceu Gaspar Raiser, Dr.
(Presidente/Orientador)**

**Vera Maria Villamil Martins, Dr^a
(UDESC)**

**Marcelo Meller Alievi, Dr
(UFRGS)**

**Alexandre Mazzanti, Dr
(UFSM)**

**Carlos Afonso de Castro Beck, Dr,
(UFRGS)**

Santa Maria, 02 de março de 2011

AGRADECIMENTO

A Universidade Federal de Santa Maria.

A CAPES pela disponibilização da bolsa de estudos.

Aos meus pais Hilário e Lourdes, pelo apoio e incentivo.

Ao professor Dr. Alceu Gaspar Raiser, pela orientação no Doutorado.

Ao professor Dr. Alexandre Mazzanti, sempre solícito nas horas de necessidade.

A minha esposa Soraia, que esteve presente em todas as etapas deste trabalho, meu agradecimento e amor eterno.

A professora Vera Maria Villamil Martins coordenadora do Núcleo de Fisiatria e a professora Mere Erika Saito coordenadora do Laboratório de Patologia Clínica do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc) por permitirem o uso de equipamentos para a realização da pesquisa.

A Professora Rosângela Gonçalves Piccinini Machado e ao mestrando Michel Leandro de Campos do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP) de Araraquara, São Paulo, pela ajuda no processamento das amostras.

Ao professor Antônio Pereira de Souza e sua esposa Dona Creusa Figueiredo de Souza por cederem o espaço para o alojamento dos animais.

Ao Fabiano, à Larissa e Marina Gabriela (Bia) pela ajuda na reta final.

Aos colegas de curso, funcionários e demais pessoas que colaboraram durante este período, meu sincero muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	09
2. ARTIGO 1.....	14
3. ARTIGO 2.....	30
4. DISCUSSÃO.....	46
5. CONCLUSÃO.....	48
6. BIBLIOGRAFIA.....	49

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

FONOFORESE E ELETROESTIMULAÇÃO NEUROMUSCULAR EM CÃES: UMA CONTRIBUIÇÃO PARA A FISIOTERAPIA VETERINARIA

AUTOR: CHARLES PELIZZARI

ORIENTADOR: DR. ALCEU GASPAR RAISER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de março de 2011.

Esta tese foi dividida em duas pesquisas distintas utilizando fonoforese e eletroterapia, na primeira pesquisa o objetivo foi constatar a concentração plasmática de diclofenaco sódico emulgel em cães com ou sem o uso de fonoforese e se a fonoforese induz maior absorção deste fármaco. Para a realização da fonoforese foram utilizados cinco cães em oito grupos distintos, denominados: Grupo1: aplicação de ultrassom (US) por 6 minutos, remoção do gel com papel toalha e após aplicação de dois gramas de diclofenaco sódico (DS) emulgel permanecendo por 6 minutos; Grupo2: aplicação de dois gramas de DS emulgel tópico permanecendo por 6 minutos; Grupo3 aplicação de dois gramas de DS emulgel, posteriormente recobrimo-o com gel comum para acoplamento e realizado US pelo tempo de 6 minutos; Grupo4: repetiu-se o protocolo do Grupo1 com o ultrassom desligado; Grupo5: repetiu-se o protocolo do Grupo3 com o ultrassom desligado; Grupo6: aplicação de dois gramas de DS emulgel tópico e realizado diretamente sobre este o US pelo tempo de 6 minutos; Grupo7: repetiu-se o protocolo do Grupo6 com o ultrassom desligado; Grupo8: administração oral de um comprimido de DS (40mg) por animal. A área de aplicação foi de 20cm². A frequência do ultrassom foi de 1MHz, modo contínuo, com intensidade de 0,4W cm⁻². Realizou-se a coleta de amostra sanguínea antes de executar os protocolos (Tempo zero), após uma hora (Tempo 1) e após 4 horas da aplicação (Tempo 2) em todos os grupos e posterior análise das mesmas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Houve diferença (P<0,05) apenas no Tempo 1 do Grupo8. Não foi possível verificar concentração plasmática de diclofenaco sódico com aplicação tópica, em cães submetidos ou não à fonoforese, apenas quantificou-se o diclofenaco sódico pela administração via oral. A facilitação da penetração transdérmica pelo ultrassom não foi verificada sob o protocolo especificado nesta pesquisa. Na segunda pesquisa o objetivo foi avaliar a ocorrência de ganho de massa muscular utilizando a estimulação elétrica neuromuscular de média frequência (corrente de Kotz – 2500Hz) no músculo quadríceps femoral de cães com atrofia muscular induzida e comparar a EENM sob diferentes tempos de tratamento. Para a realização da eletroterapia foram utilizados oito cães, pesando entre 15 e 25kg e distribuídos aleatoriamente em dois grupos denominados de GI (30minutos) e GII (60minutos). Para a indução da atrofia muscular, a articulação fêmoro-tíbio-patelar direita foi

imobilizada por 30 dias por transfixação percutânea tipo II. Foi realizada a EENM nos cães dos grupos GI e GII três vezes por semana, com intervalo mínimo de 48 horas entre cada sessão, pelo período de 60 dias. Foram mensuradas a perimetria das coxas, goniometria dos joelhos, atividade da enzima creatina-quinase (CK) e morfometria das fibras musculares do vasto lateral em cortes transversais colhido mediante a biópsia muscular. Não houve diferença quanto aos valores da perimetria da coxa e atividade da enzima CK. A goniometria revelou significância ($P < 0,05$) nos grupos GI e GII entre os tempos zero e 30. Os grupos GI e GII tiveram aumento significativo ($P < 0,05$) da área de secção quando comparados com o dia zero e noventa. Pode-se concluir que a EENM de média frequência ocasiona hipertrofia do músculo vasto lateral em cães após atrofia muscular induzida. A EENM com duração de 60 minutos (GII) promove um maior ganho de massa muscular em relação ao GI.

Palavras-chave: cão, eletroterapia, diclofenaco sódico, CLAE, fonoforese.

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PHONOPHORESIS AND NEUROMUSCULAR ELECTRICAL STIMULATION IN DOGS: A CONTRIBUTION TO THE VETERINARY PHYSIOTHERAPY

AUTHOR: CHARLES PELIZZARI

ADVISOR: DR. ALCEU GASPAR RAISER

Date and place of defense: Santa Maria, March 02nd, 2011.

The aim of the first study was to evaluate the plasma concentration of diclofenac sodium (DS) in dogs submitted to diclofenac phonophoresis and to evaluate if phonophoresis induces greater absorption of this drug. Five dogs were used in eight different groups at different times: Group 1, application of ultrasound for six minutes, removal of the ultrasound gel and topical application of two grams of DS gel for six minutes; Group 2, topical application of two grams of DS gel for six minutes; Group 3 topical application of two grams of DS gel and then covering it with common gel to apply ultrasound for six minutes; Group 4, similar to Group 1, but the ultrasound device was switched off; Group 5, similar to Group 3, but the ultrasound device was switched off, Group 6, the application of ultrasound was performed using only two grams of DS; Group 7, similar to Group 6, but the ultrasound device was switched off and Group 8, oral administration of 40mg of DS. The application area was 20cm². It was used a frequency of 1MHz, continuous ultrasound and intensity of 0,4W cm⁻². Blood collections were performed before treatment (T0), 1h (T1) and 4h (T2) after ultrasound application for all groups. DS concentrations in plasma were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). There was significant increase of DS plasma concentration only at T1 in the Group 8. It was not possible to detect any concentration of DS in the plasma of dogs after topical application of DS, even after DS phonophoresis. The facilitation of transdermal penetration by ultrasound has not been verified under the protocol specified in this research. The aim of the second study was to use medium frequency Neuromuscular Electrical Stimulation (NMES) in femoral quadriceps of dogs with induced muscular atrophy, evaluate the occurrence of gain in mass in these muscles and to compare NMES in different periods of treatment. Eight dogs, weighing between 15 and 25kg, were randomly placed in two groups: GI (NMES for 30min), GII, (NMES for 60min). For the induction of the muscular atrophy, the right femoral-tibial-patellar joint was immobilized for 30 days by the percutaneous transfixation type II method. NMES was carried out in the dogs of groups, three times a week, with an interval of 48h between each session, during 60 days. The parameters measured were: thigh perimetry, knee goniometry, creatine kinase (CK) enzyme activity and morphometry of the muscular fibers in transversal cuts of the vastus lateralis muscle, collected through a muscular biopsy. There was no significant difference regarding the values of thigh perimetry and CK enzyme activity. The goniometry presented a significant increase (P<0.05) in the groups GI and GII at 30 days from the surgical procedure for immobilization when

compared with time zero. As for the morphometry of the fibers of the vastus lateralis, a significant increase ($P < 0.05$) was observed in the transversal area of the treated groups GI e GII at 90 days from the surgical procedure for immobilization when compared with time zero. Thus, it can be concluded that NMES of medium frequency brings about hypertrophy of the vastus lateralis muscle in dogs after induced muscular atrophy. NMES for 60min (GII) presents a greater muscular gain related to the GI

Key words: dog, electrotherapy, diclofenac sodium, phonophoresis, HPLC.

15. INTRODUÇÃO

A reabilitação física de animais é uma área relativamente nova na Medicina Veterinária, que tem se tornado essencial para promover recuperação em cirurgias ortopédicas e de tecidos moles (CANAPP, 2007). Em estudo realizado na Irlanda constatou-se que a maioria dos cirurgiões veterinários reconhece que a fisioterapia deva ser amplamente utilizada, embora ressalte que falta comunicação entre o cirurgião e o especialista em reabilitação animal (DOYLE & HORGAN, 2006). Assim, deve-se buscar uma maior interação entre essas duas especialidades e selecionar modalidades terapêuticas de tratamento que contemplem ou que sejam eficazes nas afecções de pacientes veterinários.

Os parâmetros de aplicação da fisioterapia veterinária, no caso específico da Estimulação Elétrica Neuromuscular (EENM) e da fonoforese, na maioria das vezes, ocorrem por extrapolação de bibliografias consultadas da fisioterapia humana, sem estudos comprobatórios em animais, principalmente no cão, gerando dúvidas em relação à aplicação, quantidades de sessões e tempo de tratamento o que, em muitas vezes, pode ocasionar riscos a saúde do animal. Dessa forma, respostas sobre metodologias de aplicação estão sendo buscados com o intuito de fornecer conforto e evitar efeitos indesejados de fármacos causados ao paciente veterinário. Sendo assim buscou-se realizar dois trabalhos com modalidades físicas independentes utilizadas na fisioterapia.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são frequentemente usados na prática clínica em pacientes com traumas, fraturas e no pós-operatório por seu efeito analgésico (MÜLLER. et al., 2004). Embora os AINES constituam uma das classes de fármacos mais prescritas no mundo, seu uso continua sendo limitado pela incidência de seus efeitos indesejados, principalmente sobre o trato gastrointestinal (MÜLLER, 2004).

O diclofenaco é um AINE de grande valor para a analgesia pós-operatória, uma vez que estudo recente no homem e em animais sugerem que parte dessas propriedades seja devida a sua ação sobre mecanismos nociceptivos centrais que modulam a dor (CARDOSO, 2002). Entretanto, sua utilização pela via oral em cães é contra-indicada devido aos efeitos colaterais, principalmente sangramento gástrico (TASAKA, 1999). A utilização local de AINES como forma terapêutica no alívio de afecções inflamatórias e dolorosas apresenta inúmeras vantagens em relação ao uso sistêmico, principalmente evitando as reações gastrintestinais.

O diclofenaco sódico (DS) é contra-indicado para cães por possuir efeitos colaterais gastrintestinais quando administrado pelas vias usuais: oral, intramuscular e intravenosa (TASAKA, 1999), mas possui ação anti-inflamatória e analgésica comprovada (CARDOSO, 2002).

O Ultrassom é uma modalidade de terapia física muito utilizada em medicina veterinária. O termo ultrassom significa “além do som”. Trata-se de vibrações mecânicas, produzidas eletricamente (LOW & REED, 2001), inaudíveis, de alta frequência que podem produzir efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos (PRENTICE, 2003). Na prática médica essa modalidade terapêutica é uma das mais utilizadas, principalmente com a intenção de estimular a cicatrização e aliviar a dor (DRAPPER & PRENTICE, 2004).

O ultrassom pode produzir respostas significativas em células, tecidos e órgãos por meio de efeitos térmicos e biofísicos não térmicos (DRAPPER & PRENTICE, 2004). Os efeitos térmicos são alcançados se a temperatura local atingir entre 40° e 45°C. Temperaturas acima disto são deletérias para as células (LOW & REED, 2001). Os efeitos não térmicos incluem cavitação e microfluxo acústico (DRAPPER & PRENTICE, 2004). A cavitação é a formação de pequenas bolhas gasosas nos tecidos como resultado da vibração do ultrassom, geralmente com tamanho de 1 microm (10⁻⁶m) (LOW & REED, 2001), que se comprimem e se expandem devido às alterações de pressão produzidas pelo ultrassom nos fluidos do tecido (DRAPPER & PRENTICE, 2004).

A cavitação pode ser classificada como estável ou instável (transitória). Na primeira, as bolhas oscilam dentro das ondas de pressão, mas permanecem intactas (LOW & REED, 2001), ocorre a formação de uma microcorrenteza acústica, que é o

movimento unidirecional dos fluidos ao longo dos limites das membranas celulares, promovendo alterações na permeabilidade das membranas das células e da taxa de difusão através das mesmas, o que facilita o trânsito de íons e metabólitos (STARKEY, 2001). Este efeito exerce sobrecarga viscosa causando alterações terapêuticas úteis. Na cavitação transitória o volume da bolha se altera rapidamente e então colapsa (implode) (LOW & REED, 2001).

A fonoforese é uma técnica fisioterapêutica que utiliza o ultrassom com o objetivo de estimular a absorção de fármacos aplicados na pele de maneira segura, indolor e não invasiva. É uma técnica que pode ser utilizada em animais, mas requer avaliação e/ou adequação para que seja comprovada sua eficiência na absorção de fármacos como o diclofenaco sódico.

Todos os cães com problemas ortopédicos ou neurológicos são candidatos à terapia física, particularmente os que desempenham atividades físicas intensas como esporte e guarda. A fisioterapia também é aplicada a cães em recuperação pós-cirúrgica (CANAPP, 2007; LEVINE et al., 2008). A reabilitação direcionada às condições ortopédicas é uma das mais importantes áreas de atuação da fisioterapia em cães. Dentre suas indicações estão a recuperação de fraturas, distúrbios articulares, rupturas de ligamentos e afecções tendíneas (DAVIDSON et al., 2008).

A formulação do protocolo de tratamento depende da identificação dos distúrbios apresentados. A priorização dos problemas, opção pelos métodos de tratamento apropriado e sua frequência irão determinar o sucesso da recuperação. O temperamento do paciente e os equipamentos disponíveis devem ser considerados na escolha das modalidades terapêuticas (VEENMAN, 2006).

A atrofia muscular pode ser resultado do desuso prolongado de um membro em decorrência de afecções ortopédicas, neurológicas (SALTER et al., 2003; MILLIS, 2004) e após procedimentos cirúrgicos que necessitem de imobilização articular prolongada (MORRISSEY et al., 1985; APPEL et al., 1986; SALBEGO 2006), sendo observada tanto em animais (MILLIS, 2004; MAZZANTI, 2002; SALBEGO; 2006) quanto em seres humanos (GOULD et al., 1983; GIBSON et al., 1988). Entre as sequelas encontradas pode-se citar a diminuição da força muscular, instabilidade e rigidez articular (GOSSMAN et al., 1986) e diminuição da síntese das proteínas musculares (GIBSON et al., 1988).

A estimulação elétrica neuromuscular (EENM) é uma modalidade terapêutica utilizada há mais de 40 anos na prevenção da atrofia muscular por desuso (EDGERTON et al., 1975; BOOTH, 1982; JOHNSON et al., 1997; OGINO et al., 2002; SALTER et al., 2003) para promover aumento da taxa de movimentação e força muscular, reeducação muscular, correção de anormalidades estruturais, melhora no tônus muscular, aumento da função, controle da dor, aceleração do processo de cicatrização, redução de edema e espasmo muscular, e administração transdérmica de fármacos (JOHNSON & LEVINE, 2004). O mecanismo de ação ocorre por estímulos elétricos terapêuticos aplicados sobre o tecido muscular, através do sistema nervoso periférico íntegro (BRASILEIRO et al., 2002).

As freqüências de pulsos utilizadas em Medicina Veterinária para EENM variam entre a baixa e a média. As de baixa freqüência, como a FES (Estimulação Elétrica Funcional) têm promovido, em algumas pesquisas em cães (SOUZA, 2006; PELIZZARI et al, 2008; SOUZA, 2010), um aumento significativo no ganho de massa em músculos atrofiados experimentalmente. Acredita-se que as correntes de média freqüência, como a de Kotz, por apresentar uma freqüência maior, permite uma menor resistência à passagem de corrente (reatância capacitiva), proporcionando um estímulo mais confortável e de altas densidades de correntes, ocasionando um recrutamento maior de fibras musculares durante a EENM.

Considerando que a fonoforese é um recurso físico que estimula a absorção de fármacos por via transdérmica e que a corrente de média freqüência pode ocasionar um maior recrutamento de fibras musculares durante a EENM, este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos:

Verificar a concentração plasmática de diclofenaco sódico aplicado por via tópica e oral em cães;

Avaliar o efeito da fonoforese sobre a concentração plasmática de diclofenaco sódico aplicado por via tópica em cães;

Avaliar o tempo de absorção do diclofenaco sódico aplicado topicamente em cães, submetidos a fonoforese;

Avaliar o ganho de massa muscular em cães com atrofia muscular induzida, mediante a aplicação de EENM de média freqüência em diferentes tempos.

Esses objetivos foram determinados para testar as seguintes hipóteses:

Há diferença na concentração plasmática de diclofenaco sódico, quando aplicado por via tópica ou oral em cães;

Há diferença no tempo de absorção do diclofenaco sódico aplicado por via tópica em cães, mediante a utilização da fonoforese;

Há diferença no tempo de absorção do diclofenaco sódico aplicado topicamente em cães, submetidos à fonoforese;

Há diferença no ganho de massa muscular em cães com atrofia muscular induzida de acordo com o tempo de aplicação da EENM de média frequência.

16. ARTIGO 1

CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, RS

CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE DICLOFENACO SÓDICO EM CÃES,
SUBMETIDOS A FONOFORESE

PLASMA CONCENTRATION OF DICLOFENAC SODIUM IN DOGS SUBMITTED
TO DICLOFENAC PHONOPHORESIS

Charles Pelizzari^I, Alceu Gaspar Raiser^I, Alexandre Mazzanti^I, Soraia Figueiredo de Souza^{II}, Vera Maria Villamil Martins^{III}, Rosângela Gonçalves Picinini^{IV}, Michel Leandro de Campos^{IV}

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a concentração plasmática de diclofenaco sódico emulgel em cães com ou sem o uso de fonoforese e se a fonoforese induz maior absorção deste fármaco foram utilizados cinco cães em oito grupos distintos, denominados: Grupo1: aplicação de ultrassom (US) por 6 minutos, remoção do gel e após aplicação de dois gramas de diclofenaco sódico (DS) emulgel permanecendo por 6 minutos; Grupo2: aplicação de dois gramas de DS emulgel tópico permanecendo por 6 minutos; Grupo3 aplicação de dois gramas de DS emulgel, posteriormente recobrimo-o com gel comum para acoplamento e realizado US pelo tempo de 6 minutos; Grupo4: repetiu-se o protocolo do Grupo 1 com o ultrassom

^I Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil. Autor para correspondência. E-mail: charlespelizzari@yahoo.com.br

^{II} Professora adjunta do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza (CCBN), Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, AC, Brasil.

^{III} Professora adjunta do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil.

^{IV} Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brasil.

desligado; Grupo5: repetiu-se o protocolo do Grupo3 com o ultrassom desligado; Grupo6: aplicação de dois gramas de DS emulgel tópico e realizado diretamente sobre este o US pelo tempo de 6 minutos; Grupo7: repetiu-se o protocolo do Grupo6 com o ultrassom desligado; Grupo8: administração oral de um comprimido de DS (40mg) por animal. A área de aplicação possuía 20cm². A frequência do ultrassom foi de 1MHz, modo contínuo, com intensidade de 0,4W cm⁻². Realizou-se a coleta de amostra sanguínea antes de executar os protocolos (Tempo zero), após uma hora (Tempo 1) e após 4 horas da aplicação (Tempo 2) em todos os grupos e posterior análise das mesmas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Houve diferença (P<0,05) apenas no Tempo 1 do Grupo8 em relação as amostras. Não foi possível verificar concentração plasmática de diclofenaco sódico com aplicação tópica, em cães submetidos ou não à fonoforese, apenas quantificou-se o diclofenaco sódico pela administração via oral. A facilitação da penetração transdérmica pelo ultrassom não foi verificada sob o protocolo especificado nesta pesquisa.

Palavras-chave: fonoforese, cão, diclofenaco sódico, clae

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the plasma concentration of diclofenac sodium (DS) in dogs submitted to diclofenac phonophoresis and to evaluate if phonophoresis induces greater absorption of this drug in dogs. Five dogs were used in eight different groups at different times: Group 1, application of ultrasound for six minutes, removal of the ultrasound gel and topical application of two grams of DS gel for six minutes; Group 2, topical application of two grams of DS gel for six minutes; Group 3 topical application of two grams of DS gel and then covering it with common gel to apply ultrasound for six minutes; Group 4, similar to Group 1, but the

ultrasound device was switched off; Group 5, similar to Group 3, but the ultrasound device was switched off, Group 6, the application of ultrasound was performed using only two grams of DS; Group 7, similar to Group 6, but the ultrasound device was switched off and Group 8, oral administration of 40mg of DS. The application area was 20cm². It was used a frequency of 1MHz, continuous ultrasound and intensity of 0,4W cm⁻². Blood collections were performed before treatment (T0), 1h (T1) and 4h (T2) after ultrasound application for all groups. DS concentrations in plasma were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). There was significant increase of DS plasma concentration only at T1 in the group 8. It was not possible to detect any concentration of DS in the plasma of dogs after topical application of DS, even after DS phonophoresis. The facilitation of transdermal penetration by ultrasound has not been verified under the protocol specified in this research.

Key words: phonophoresis, dog, diclofenac sodium, HPLC.

INTRODUÇÃO

Ultrassom significa “além do som”. Trata-se de vibrações mecânicas, produzidas eletricamente (LOW & REED, 2001), inaudíveis, de alta frequência que podem produzir efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos (PRENTICE, 2003). Na prática médica essa modalidade terapêutica é uma das mais utilizadas, principalmente com a intenção de estimular a cicatrização e aliviar a dor (DRAPPER & PRENTICE, 2004). Quando um feixe de onda ultrassônica atinge uma interface acústica parte da energia é refletida ou refratada. Quando o ultrassom entra em contato com o ar produz uma refração quase total da energia. Assim, é necessário meio de acoplamento na interface transdutor e local da aplicação (pele), para permitir que as ondas passem do transdutor para os tecidos (STARKEY, 2001). A

movimentação do transdutor durante a aplicação do ultrassom pode reduzir os efeitos danosos das ondas estacionárias. Esta movimentação do transdutor deve ser a uma velocidade aproximada de 4cm s^{-1} (DRAPPER & PRENTICE, 2004). As ondas emitidas podem ser do modo contínuo, onde a energia do ultrassom estará sendo produzida em tempo integral, ou modo pulsado em que a energia é interrompida em intervalos chamados *off time* (DRAPPER & PRENTICE, 2004).

A administração tópica de medicamentos objetiva a penetração do princípio ativo nos tecidos, tais como músculo e articulações, abaixo do sítio de aplicação. Um problema associado à eficácia do uso tópico dos AINES é o acesso ao tecido alvo, se o princípio ativo penetra nos tecidos mais profundos por difusão simples, a partir do local de aplicação, ou se o fármaco é absorvido pela circulação sanguínea local e subsequentemente distribuído pela circulação sistêmica (SOLIGNAC, 2004; PETERSEN & ROVATI, 2009).

Na tentativa de mostrar a eficácia da disponibilidade aumentada do fármaco, perfis de tempo-concentração no tecido muscular e razões tecido-plasma foram obtidos após a administração tópica e intravenosa *in vivo* do piroxicam em ratos. As diferenças marcantes entre os resultados obtidos, para os sítios dosados e não-dosados, dão suporte à hipótese na qual a administração tópica pode levar ao aumento na concentração local do fármaco nos tecidos subjacentes, tal como o músculo, sem antes entrar na circulação geral (McNEILL, 1992). É importante ressaltar que em caninos e felinos a vascularização da região epidérmica da pele é menos desenvolvida do que ocorre em seres humanos, antropoides e suínos (PAVLETIC, 1998).

A utilização local de AINES como forma terapêutica no alívio de afecções inflamatórias e dolorosas tem despertado o interesse de muitos profissionais da

saúde e pesquisadores, pois apresenta inúmeras vantagens em relação ao uso sistêmico, principalmente evitando as reações gastrintestinais (ROSIM, 2003; FUSARO, 2006; BARNES, 2008).

Existem várias formas de administração medicamentosa. Uma delas é a fonoforese. Fonoforese ou sonoforese é o movimento de fármacos, para dentro dos tecidos cutâneos, sob a influência da energia ultrassônica (LOW & REED, 2001; STARKEY, 2001). Para DRAPPER & PRENTICE (2004), é uma técnica que melhora o fornecimento de medicação específica aos tecidos, tem como maior vantagem fornecer medicamento de maneira segura, indolor e não invasiva. Tem o benefício de permitir a penetração nos tecidos, de forma não invasiva, diminui o efeito de passagem (STARKEY, 2001) ou biotransformação que seria a transformação química de substâncias, pois, muitos agentes biotransformados podem ser responsáveis por efeitos tóxicos ao organismo (FLORIO, 1999). Ainda, a ausência de degradação pelo trato digestivo, evita efeitos colaterais associados ao metabolismo gastrintestinal, normalmente associados a administração por via oral (WU et al., 1998). Segundo FUSARO (2006), a via transdérmica associada ao ultrassom terapêutico representa otimização no método, onde demonstrou que a fonoforese induziu maior absorção de diclofenaco dietilamônio.

A aplicação do ultrassom necessita agentes de acoplamento, que podem ser géis (STARKEY, 2001). Em fonoforese é muito importante a eficácia dos meios de acoplamento, pois alguns deles impedem a passagem do som, podendo-se aplicar separadamente o gel e a medicação, sendo esse método conhecido por “método invisível” (STARKEY, 2001). A eficácia da fonoforese não foi totalmente comprovada e ainda existem controvérsias, muitas delas relacionadas ao tipo de agente acoplador utilizado e a concentração do medicamento (STARKEY, 2001). BARNES

(2008), em estudo sobre a exposição do diclofenaco sódico ao ultrassom sugere a ausência da degradação do fármaco, elegendo assim, este, para o uso em fonoforese.

O diclofenaco sódico é um potente anti-inflamatório não esteroidal e analgésico que tem ação sobre a inibição da ciclooxigenase e da lipoxigenase. Sua utilização em cães é contra-indicada devido aos efeitos colaterais, principalmente sangramento gástrico (TASAKA, 1999). É rapidamente absorvido, depois da administração oral, e sua concentração plasmática é atingida dentro de duas a três horas. Estudos em analgesia pós-cesariana, em humanos, indicam que tanto a necessidade de opióides quanto os escores de dor podem ser diminuídos quando o diclofenaco for administrado em diferentes doses e por diferentes vias.

As propriedades analgésicas do diclofenaco tem sido atribuídas aos seus efeitos sobre a síntese periférica de prostaglandinas. Como consequência, a dose e a via de administração ideais ainda precisam ser determinadas e estudos que comparem a eficácia analgésica de vias de administração alternativas do mesmo fármaco são necessários para o estabelecimento do regime terapêutico ideal. O diclofenaco pode ser administrado por via oral, retal ou parenteral em humanos. A via menos invasiva deve ser sempre a escolhida (CARDOSO, 2002).

Em humanos sadios PORTA (1992), administrou diclofenaco sódico peroral, ROSIM (2003), que utilizou Voltaren Emulgel[®] por fonoforese em área de 225 cm², tempo de 5 minutos de irradiação, intensidade de 0,5 watt.cm⁻², frequência de 1mhz, modo contínuo, constatando facilitação transcutânea e por FUSARO (2006), que administrou diclofenaco dietilamônio, em área de 150 cm², o restante do protocolo igual ao de ROSIM (2003), onde observou maior absorção do fármaco por fonoforese, mas 75% das amostras ficaram abaixo do limite de quantificação que foi

de $50\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Todos estes autores avaliaram a concentração plasmática de diclofenaco por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), mostrando que a CLAE é um método eficiente de quantificação deste fármaco em plasma sanguíneo.

Assim o objetivo foi avaliar a concentração plasmática de diclofenaco sódico em cães após sua aplicação na forma de emulgel por fonoforese sob diferentes protocolos de tratamentos e se a fonoforese interfere com a absorção deste fármaco.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados cinco cães, sem raça definida, fêmeas, com massa corporal entre 09 e 16kg, obtidos no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Lages, Santa Catarina. Antes da experimentação, os animais foram submetidos previamente ao procedimento de ovariosalpingoisterectomia, alojados em canis individuais por 15 dias para adaptação ao local, recebendo alimentação duas vezes ao dia e água à vontade. Foi também, administrado anti-helmíntico (pamoato de pirantel/praziquantel) na dose de $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal e realizada avaliação sérica de alanina-aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) obtendo-se resultados dentro dos valores fisiológicos para a espécie.

Foram compostos oito grupos sendo que, todos os cães participaram de todos eles: **grupo 1**: aplicação de ultrassom (US) acoplado a gel comum para ultrassonografia por 6min, remoção do gel com papel toalha e após aplicação de 2g de diclofenaco sódico (DS) emulgel que permaneceu por 6min sendo retirado em seguida; **grupo 2**: aplicação de 2g de DS emulgel tópico que permaneceu por 6min sendo retirado a seguir; **grupo 3**: aplicação de 2g de DS emulgel, posteriormente recobrimo-o com gel comum para acoplamento e realizado US pelo tempo de 6min, retirando-se depois o gel comum e o DS; **grupo 4**: repetiu-se o protocolo do grupo 1

com o ultrassom desligado. **grupo 5** : Repetiu-se o protocolo do Grupo 3 com o ultrassom desligado; **grupo 6**: aplicação de 2g de DS emulgel tópico e realizado diretamente sobre este o US pelo tempo de 6min, posteriormente retirando o emulgel excedente; **grupo 7**: repetiu-se o protocolo do grupo 6 com o ultrassom desligado; **grupo 8**: administração oral única de 40mg de DS comprimido por animal.

Em cada cão, efetuou-se a aplicação do diclofenaco sódico emulgel no membro pélvico direito, na região lateral da coxa, com movimentos circulares na velocidade de $4\text{cm}^2\text{ s}^{-1}$, segundo DRAPPER & PRENTICE (2004). A área possuía 20cm^2 ($5\times 4\text{cm}$) demarcada por pincel de tinta, precedida de tricotomia com máquina específica e lâmina número 40 e de limpeza local com solução fisiológica e álcool. A frequência do ultrassom foi de 1MHz, a área de radiação efetiva do ultrassom era de $3,5\text{ cm}^2$, modo contínuo, com intensidade de $0,4\text{W cm}^{-2}$ pelo tempo de 6min, sendo o meio de acoplamento do cabeçote gel comum ou diretamente diclofenaco sódico, conforme protocolo dos grupos. A concentração do gel de diclofenaco sódico foi de 1% em cada aplicação. A aplicação do US foi realizada todas as vezes pelo mesmo indivíduo. Cada protocolo foi empregado uma vez em cada animal, e estes foram submetidos a novo protocolo após o período de sete dias.

Para a avaliação plasmática da concentração de diclofenaco sódico realizou-se a coleta de amostra sanguínea antes de executar os protocolos (Tempo zero), após uma hora (Tempo 1) e após 4h da aplicação (Tempo 2) em todos os cães de cada grupo, sendo que, os animais permaneciam com restrição alimentar até a última coleta e com o uso de colar Elisabetano para proteção da área de aplicação. Cada amostra foi identificada, colocada em tubos contendo EDTA e, após centrifugação a 3500rpm x g por 10 minutos, o plasma foi extraído com pipeta,

acondicionando em tubos Eppendorf, identificado e armazenado em freezer até a data da realização da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A quantificação do diclofenaco nas amostras de plasma foi realizada utilizando equipamento cromatográfico HPLC (CLAE) Waters Alliance[®] equipado com detector Waters 2487 UV-vis operando no comprimento de onda de 276nm. A separação foi feita em uma coluna Symmetry[®] C18 5µm de 250x4,6mm protegida por pré-coluna Symmetry[®] C18 5µm de 3,9x20mm, em fase reversa composta por isopropanol, água, acetonitrila e tampão acetato pH 4,0 na proporção de 48, 22, 10 e 20% respectivamente, com fluxo de 0,45mL min⁻¹. O processamento foi executado com base no método publicado por RIGATO et al. (2009), em que 200µL de plasma foram tratados com 200µL de padrão interno (naproxeno) em acetonitrila para uma concentração final de 5µg mL⁻¹. A mistura foi agitada em vórtex e em seguida centrifugada a 15000 x g por 10min a temperatura de 4°C. Transferido-se o sobrenadante para *insert* e 100µL foram injetados no sistema cromatográfico. Para análise estatística aplicou-se análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de teste Tukey (P<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Somente na administração oral (grupo 8), pode-se observar concentrações plasmáticas de diclofenaco sódico, após uma e quatro horas. No tempo anterior à administração (zero), nenhuma amostra apresentou o produto. Nos outros grupos (1 a 7) não se observou valor plasmático de diclofenaco sódico, ou este estava abaixo do limite de quantificação pelo método bioanalítico desenvolvido que foi de 25ng mL⁻¹. Para esses níveis abaixo do limite de quantificação atribuiu-se valor zero para cálculo estatístico. Houve diferença (P<0,05) apenas no Tempo 1 (uma hora) do Grupo 8 (oral) em relação aos demais tempos e grupos.

Na figura 1 estão representadas as variações das concentrações plasmáticas do diclofenaco nos tempos 1 (uma hora) e 2 (quatro horas) em cada cão nas amostras obtidas a partir do protocolo 8 e a mediana. No tempo zero as amostras não apresentaram valores de diclofenaco quantificáveis (abaixo de 25ng ml⁻¹). Este resultado mostra que o método bioanalítico desenvolvido foi adequado para a detecção e quantificação do diclofenaco em amostras de plasma e que a aplicação do diclofenaco emulgel.

A utilização do diclofenaco sódico (DS) foi devido a sua ação anti-inflamatória e analgésica descrita por Cardoso, (2002), mesmo este fármaco sendo contra-indicado para cães (TASAKA, 1999) optou-se por utilizá-lo devido ao seu baixo custo, facilidade de obtenção do produto e por acreditar que a via tópica não causaria efeitos colaterais em cães. Não foi encontrada descrição na literatura de dose terapêutica de DS oral indicada essa espécie. A dose administrada foi adaptada de HOSNY et al. (1996), que utilizaram 50mg de diclofenaco sódico por cão na raça Beagle com dispositivo retal. Pela via de administração ser diferente neste trabalho, foi utilizado 40mg de diclofenaco sódico por animal. A quantidade de diclofenaco emulgel e o protocolo de aplicação do ultrassom foram adaptados de ROSIM (2003) e, conforme afirma BARNES (2008), é importante citar que não há um consenso de protocolo padrão em relação à aplicação do ultrassom. A escolha do protocolo, em cães, é basicamente empírica, provavelmente, devido ao limitado número de publicações na área e dados obtidos serem conflitantes ou adaptados de literatura humana.

A área no membro pélvico foi escolhida devido à facilidade de aplicação e a alta incidência de lesões traumáticas nesta região. A baixa intensidade e modo pulsado, utilizados nesta pesquisa, são as características do equipamento

desenvolvido e que tem sido empregado num grande número de investigações experimentais e clínicas por DUARTE & XAVIER (1983) e RUBIN et al. (2001). A quantidade de 2g de diclofenaco sódico aplicada, nos grupos sem o gel comum para ultrassonografia, foi suficiente para a realização da sessão, evitando que o cabeçote do ultrassom ficasse sem o meio de acoplamento, segundo recomenda STARKEY (2001). Os tempos das coletas foram baseados no DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS INTERATIVO (2005/06), onde consta que a meia-vida terminal do diclofenaco no plasma é de 1-3 horas.

Não houve diferença ($P < 0,05$) entre os cães dos grupos submetidos ao ultrassom (fonoforese) com aqueles sem o uso do ultrassom, não se evidenciando valor plasmático de diclofenaco sódico, ou este estava abaixo do limite de quantificação do método bioanalítico desenvolvido. Em estudo com diclofenaco dietilamônio em humanos sadios, FUSARO (2006), relatou que em 75% dos voluntários submetidos à fonoforese ou à aplicação tópica sem ultrassom, as concentrações plasmáticas de diclofenaco ficaram abaixo do limite de detecção, que foi de 50ng ml^{-1} . ROSIM (2003) mostrou que o ultrassom com diclofenaco sódico facilitou a penetração transcutânea em humanos. Para McNEILL (1992) e FUSARO (2006), a quantificação de diclofenaco plasmático pode não ocorrer, mas existiram indícios que possa haver concentração local, abaixo da pele na área de fonoforese e CARNIO (2005), em avaliação da fonoforese com diclofenaco sódico em gelatina, imitando pele humana, verificou que a penetração do medicamento foi de 3mm para a irradiação com $1,0\text{W cm}^{-2}$ e 5mm para a irradiação com $1,5\text{W cm}^{-2}$ de forma contínua e estacionária por 5 minutos confirmando a concentração local. Para testar essa hipótese no cão, seria necessária a avaliação da região da área de aplicação, mas pode-se sugerir que havia presença do DS.

Uma das causas da não quantificação pode estar relacionada com a área e o tempo de exposição do fármaco (McNEILL, 1992). A área e o tempo de exposição utilizado por ROSIM (2003) foram maiores. Ainda, pode-se levar em consideração as propriedades físicas e anatômicas da pele, pois a vascularização da pele do cão é diferente da humana (PAVLETIC, 1998), entendendo que por este motivo haja menor absorção do fármaco em canino. A não quantificação sérica e o entendimento da presença do fármaco na região de aplicação são desejáveis, pois a espécie canina é muito susceptível aos efeitos colaterais do diclofenaco em concentrações plasmáticas elevadas, sendo o ideal que se mantivesse apenas a concentração inibitória mínima local. Portanto, há necessidade de estudos subsequentes em pacientes enfermos para verificar se essa técnica é eficiente no controle anti-inflamatório ou analgésico local.

CONCLUSÃO

Nas condições em que a pesquisa foi conduzida, a aplicação tópica de diclofenaco sódico, em cães submetidos ou não à fonoforese, com intensidade de $0,4W\text{ cm}^{-2}$, modo contínuo, frequência de 1MHz em tempo de irradiação de 6 minutos não detectou concentração plasmática do fármaco que foi quantificado apenas pela administração oral. O protocolo utilizado demonstrou que não há facilitação da penetração transdérmica pelo ultrassom, pela avaliação do plasma por cromatografia líquida de alta eficiência.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

A pesquisa seguiu as normas de Experimentação segundo o Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria e foi aprovado constando no Processo Administrativo número 23081.018091/2008-48.

AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa vinculada ao processo 300885/2008-3.

REFERÊNCIAS

BARNES, D. **Efeito do ultrassom sobre a nocicepção e o processo inflamatório em modelos animais e sobre a estrutura química de fármacos.** 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) – Centro Universitário Univates, RS

CARDOSO, M.M.S.C. et al. Diclofenaco por via muscular ou retal associado com baixas doses de morfina subaracnóidea para analgesia pós-operatória em cesarianas. **Rev Bras Anesthesiol**, v.52, p.666-672, 2002.

CARNIO, P.B. **Variação dos parâmetros físicos do campo ultrassônico em fonoforese com diclofenaco gel.** 2005. 77f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, SP

DICIONÁRIO de **Especialidades Farmacêuticas Interativo.** Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2005/06. p 1944.

DRAPPER, D.O.; PRENTICE, W.E. Ultrassom terapêutico. In: PRENTICE, W.E. **Modalidades terapêuticas para fisioterapeutas.** Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap.10, p.245-274.

DUARTE, L.R.; XAVIER,C.A.M. Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. **Rev Bras de Ortop**, v.18, p.73-80, 1983.

FLORIO, J.C. Absorção, distribuição, biotransformação e eliminação. In: SPINOSA, H.S. et al. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan, 1999. Cap.04, p.34.

FUSARO, C. **Estudo da fonoforese de diclofenaco dietilamônio em voluntários sadios**. 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Estadual de Campinas, SP.

HOSNY E.A., et al. Effect of polycarbophil concentration on diclofenac sodium bioavailability from suppositories in beagle dogs. **IJ Pharm**, v.136, p.37-41, 1996.

LOW, J.; REED, A. Ultrassom terapêutico. In: _____. **Eletroterapia explicada princípios e prática**. São Paulo: Manole, 2001. Cap.06, p.187-228.

McNEILL S.C. et al. Local enhanced topical delivery (LETD) of drugs: does it truly exist? **Pharm Res**, v.9, n.11, p.1422-1427, 1992.

MITCHELL J.A.; WARNER T.D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **Br J Pharmacol**, v.128, n.6, p.1121-1132, 1999.

PAVLETIC M.M. Pele e órgãos anexos. In: SLATER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998. Cap.24, p.328-329.

PETERSEN B.; ROVATI S. Diclofenac epolamine (Flector) patch: evidence for topical activity. **Clin Drug Investig**, v.29, n.1, p.1-9, 2009.

PORTA, V. **Estudo de interação entre a ranitidina e o diclofenaco em voluntários sadios após administração peroral de voltaren 50**. 1992. 209f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, SP.

PRENTICE, W.E. Emprego das modalidades terapêuticas de reabilitação. In: PRENTICE, W.E.; VOIGHT, M.L. **Técnicas em reabilitação musculoesqueléticas**. Porto Alegre: Artmed, 2003. Cap.18, p.275-276.

RIGATO, H.M. et al. A simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma: application to a comparative bioavailability study. **Int J of Clin Pharmacol Ther**, v.47, n.2, p.132-140, 2009.

ROSIM, G.C. **Análise da influência do ultrassom terapêutico na penetração transcutânea de diclofenco sódico em humanos sadios**. 2003. 62f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, SP.

RUBIN, C. et al. The uses of lowintensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. **The JBJS**, v.83, p.259-270, 2001.

SOLIGNAC, M. Assessment of a topical NSAIDs in the treatment of pain and inflammation. The example of Flector Plaster, a local bioadhesive plaster containing diclofenac epolamine. **Presse Med**,v.33, n.14, pt.2, 3S10-13, 2004.

STARKEY, C. Ultra-som. In: _____. **Recursos terapêuticos em fisioterapia**. São Paulo: Manole, 2001. Cap.06, p.277-313.

TASAKA, A.C. Antiinflamatórios não esteroidais. In: SPINOSA, H.S. et al. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap.21, p.220.

WU J. et al. Defects generated in human stratum corneum specimens by ultrasound. **Ultrassoun Med Biol**, v.24, n.5, p.705-710, 1998.

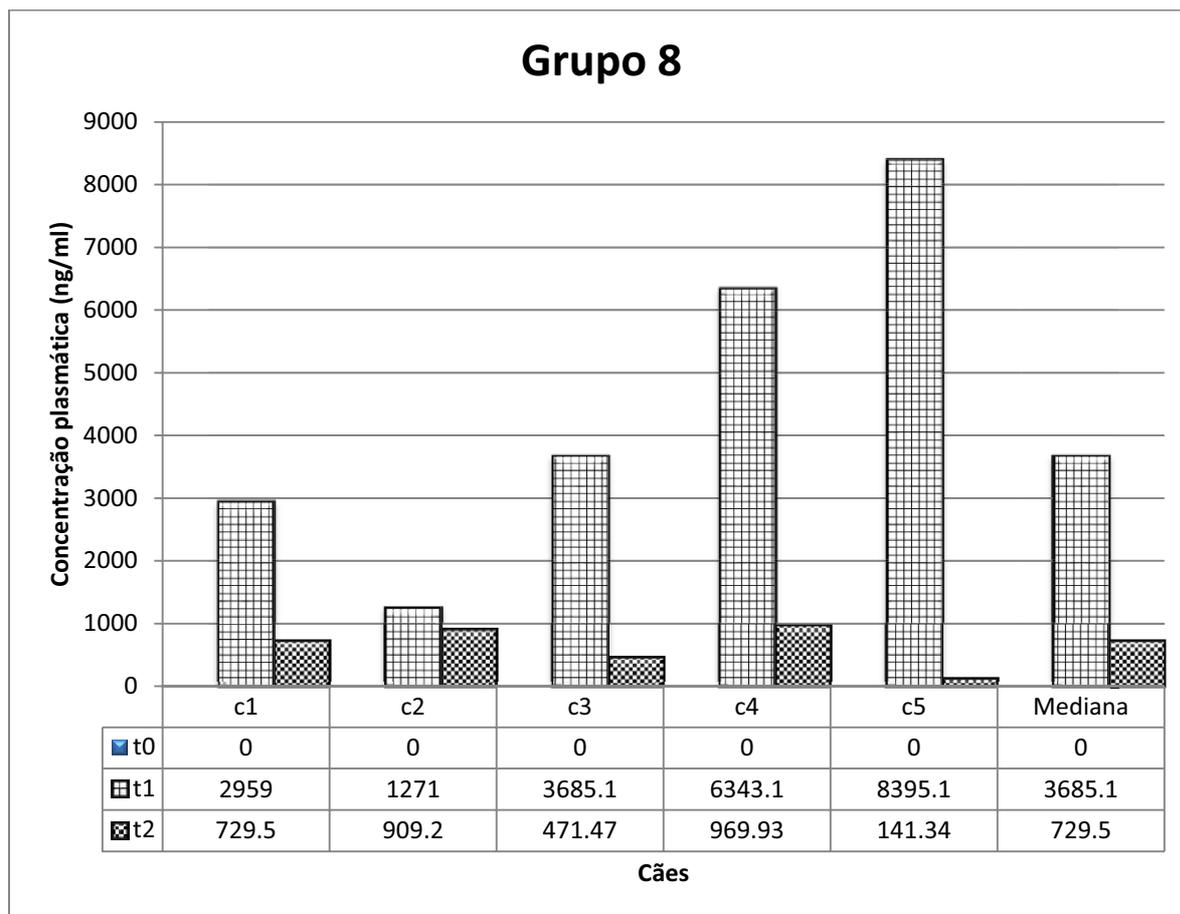


Figura 1 – Representação nas variações das concentrações plasmáticas do diclofenaco sódico nos tempos zero, 1 (uma hora) e 2 (quatro horas) em cada cão nas amostras obtidas a partir do protocolo 8 (via oral) e a mediana. No tempo zero as amostras não apresentaram valores de diclofenaco quantificáveis ($>25\text{ng ml}^{-1}$).

17. ARTIGO 2

CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, RS

DIFERENTES TEMPOS DE ELETROESTIMULAÇÃO NEUROMUSCULAR (EENM) DE MÉDIA FREQUÊNCIA (KOTZ) EM CÃES

DIFFERENT TIMES OF MEDIUM FREQUENCY NEUROMUSCULAR ELECTRICAL STIMULATION (KOTZ) IN DOGS

Charles Pelizzari^I, Alceu Gaspar Raiser^I, Alexandre Mazzanti^I, Fabiano Zaninni Salbego^I, Rafael Festugatto^I, Diego Vilibaldo Beckmann^I, Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha^I, Rosmarini Passos dos Santos^I, Gabriele Maria Callegaro Serafini^I, Jenifer de Santana Marques^{II} Raquel Baumhardt^{III}

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi empregar a estimulação elétrica neuromuscular (EENM) de média frequência no quadríceps femoral de cães com atrofia muscular induzida, avaliar o ganho de massa muscular e comparar a EENM sob diferentes tempos de tratamento. Foram utilizados oito cães, pesando entre 15 e 25kg e distribuídos aleatoriamente em dois grupos denominados de GI (30minutos) e GII (60minutos). Para a indução da atrofia muscular, a articulação fêmoro-tíbio-patelar direita foi imobilizada por 30 dias por transfixação percutânea tipo II. Foi realizada a EENM nos cães dos grupos GI e GII três vezes por semana, com intervalo mínimo de 48 horas entre cada sessão, pelo período de 60 dias. Foram mensuradas a perimetria da coxa, goniometria dos joelhos, atividade da enzima creatina-quinase

^I Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil. Autor para correspondência. E-mail: charlespelizzari@yahoo.com.br

^{II} Residente da Universidade de Santo Amaro, UNISA, SP, Brasil.

^{III} Residente da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

(CK) e morfometria das fibras musculares do vasto lateral em cortes transversais colhido mediante a biópsia muscular. Não houve diferença quanto aos valores da perimetria da coxa e atividade da enzima CK. A goniometria revelou significância ($P<0,05$) nos grupos GI e GII entre os tempos zero e 30. Os grupos GI e GII tiveram aumento significativo ($P<0,05$) da área de secção quando comparados com o dia zero e noventa. Pode-se concluir que a EENM de média frequência ocasiona hipertrofia do músculo vasto lateral em cães após atrofia muscular induzida. A EENM com duração de 60 minutos (GII) promove um maior ganho de massa muscular em relação ao GI.

Palavras-chave: cão, imobilização, biópsia, EENM.

ABSTRACT

The aim of this study was to use medium frequency Neuromuscular Electrical Stimulation (NMES) in femoral quadriceps of dogs with induced muscular atrophy, evaluate the occurrence of gain in mass in these muscles and to compare NMES in different periods of treatment. Eight dogs, weighing between 15 and 25kg, were randomly placed in two groups: GI (NMES for 30min), GII, (NMES for 60min). For the induction of the muscular atrophy, the right femoral-tibial-patellar joint was immobilized for 30 days by the percutaneous transfixation type II method. NMES was carried out in the dogs of groups, three times a week, with an interval of 48h between each session, during 60 days. The parameters measured were: thigh perimetry, knee goniometry, creatine kinase (CK) enzyme activity and morphometry of the muscular fibers in transversal cuts of the vastus lateralis muscle, collected through a muscular biopsy. There was no significant difference regarding the values of thigh perimetry and CK enzyme activity. The goniometry presented a significant increase ($P<0.05$) in the groups GI and GII at 30 days from the surgical procedure for immobilization when

compared with time zero. As for the morphometry of the fibers of the vastus lateralis, a significant increase ($P < 0.05$) was observed in the transversal area of the treated groups GI e GII at 90 days from the surgical procedure for immobilization when compared with time zero. Thus, it can be concluded that NMES of medium frequency brings about hypertrophy of the vastus lateralis muscle in dogs after induced muscular atrophy. NMES for 60min (GII) presents a greater muscular gain related to the GI.

Key words: dog, immobilization, biopsy, NMES.

INTRODUÇÃO

A atrofia muscular pode ser o resultado do desuso prolongado de um membro em decorrência de afecções ortopédicas ou neurológicas (SALTER et al., 2003; MILLIS, 2004) e após procedimentos cirúrgicos que necessitam de imobilização articular prolongada (MORRISSEY et al., 1985; APPELL, 1986), sendo observada tanto em animais (MILLIS, 2004; MAZZANTI, 2002) como em seres humanos (GOULD et al., 1983; GIBSON et al., 1988). Entre as seqüelas encontradas pode-se citar a diminuição da força muscular, instabilidade e rigidez articular (GOSSMAN et al., 1986) e diminuição da síntese das proteínas musculares (GIBSON et al., 1988).

Entre quatro e seis dias após a imobilização de um membro ocorre a perda de proteínas musculares, porém a quantidade de mioglobina permanece inalterada (BOOTH, 1977). Após o sétimo dia, há perda de tecido conjuntivo e também de fibras musculares por área de secção do músculo, promovendo alterações como atrofia muscular e redução da atividade contrátil. Essas alterações ocorrem também durante longos períodos de inatividade muscular (WILLIAMS et al., 1988). Ocorre ainda substituição de miofibras atroficas por células de gordura (McGAVIN, 1998).

A estimulação elétrica neuromuscular (EENM) é utilizada há mais de 40 anos para prevenir a atrofia muscular por desuso, aumentar os efeitos de um programa de exercícios após traumatismo e restituir a função em pacientes com distúrbios neuromusculares (OGINO et al., 2002). É uma forma de estímulo capaz de induzir o músculo estriado esquelético a alterações como melhora da função (WILLIAMS & STREET, 1976) aumento da capacidade de gerar força muscular e hipertrofia (CURRIER et al., 1979; PELIZZARI et al., 2008), além de ser utilizada na estimulação para controle da dor (ROSEMBERG et al., 1978).

Os parâmetros de aplicação da EENM utilizados, na maioria das vezes, em animais são extrapolação de bibliografias consultadas da fisioterapia humana, sem estudos comprobatórios em animais, principalmente o cão, gerando dúvidas em relação à aplicação, número de sessões e tempo de tratamento. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a ocorrência de ganho de massa muscular utilizando a estimulação elétrica neuromuscular de média frequência (corrente de Kotz) no músculo quadríceps femoral de cães com atrofia muscular induzida e comparar a EENM sob diferentes tempos de tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados oito cães, sem raça definida, pesando entre 15 e 25kg, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram alojados em canis individuais, por um período mínimo de 15 dias para adaptação ao local, onde receberam alimentação duas vezes ao dia e água à vontade. Foi administrado anti-helmintico (pamoato de pirantel/praziquantel) na dosagem de 25mg kg^{-1} de peso corporal.

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico ($12,5\text{mg kg}^{-1}$) para estudo radiográfico simples da articulação coxofemoral e fêmoro-tibio-patelar em

incidência crânio-caudal em busca de alterações articulares. Os animais que não apresentaram alterações foram distribuídos ao acaso em dois grupos de igual número, denominados de GI com aplicação de EENM por 30 minutos e GII aplicação de EENM por 60 minutos.

Os procedimentos cirúrgicos empregados nestes animais foram biópsia do músculo vasto lateral, para avaliação das fibras musculares e imobilização rígida temporária da articulação fêmoro-tíbio-patelar. As biopsias foram realizadas em três tempos: antes da imobilização, no momento de sua retirada e 90 dias após a primeira.

Para a imobilização articular, cada animal foi submetido à tricotomia da coxa direita e pré-medicado com sulfato de morfina (1mg kg^{-1}) associado ao maleato de acepromazina ($0,05\text{mg kg}^{-1}$). A anestesia foi induzida com propofol ($4,0\text{mg kg}^{-1}$) e mantida com halotano vaporizado em oxigênio a 100%. Após a antisepsia do campo operatório realizada com álcool-iodo-álcool, foi administrada ampicilina sódica (30mg kg^{-1}), 30 minutos antes do início da cirurgia, sendo efetuada a fixação externa percutânea biplanar ou tipo II, conforme descrito por ARON (1996). A articulação foi mantida em angulação de 90° com o auxílio de um goniômetro. Como barra de conexão entre os pinos foi utilizada resina acrílica autopolimerizável. Os animais receberam como terapia anti-inflamatória e analgésica cetoprofeno 10% (2mg kg^{-1}), por via subcutânea, durante três dias e cloridrato de tramadol (2mg kg^{-1}), por via intra-muscular, a cada seis horas durante 24h. As áreas de inserções dos pinos, na pele, foram higienizadas com solução salina isotônica, protegidas por gaze embebida em solução de nitrofurazona e o aparelho de imobilização diariamente recoberto com atadura até a sua remoção.

No mesmo instante foi realizada a primeira biópsia, mediante abordagem do músculo vasto lateral do membro pélvico direito, por meio de incisão da pele e da fáscia muscular, introdução um trépano dermatológico e, mediante movimentos de rotação e alavanca, foi retirado um fragmento de aproximadamente 7x3mm, fixado em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 48h. A ferida da pele, em consequência da biópsia muscular, foi higienizada com solução salina isotônica e protegida por esparadrapo hipoalergênico.

Os animais permaneceram com o aparelho de fixação esquelética por 30 dias, quando foi realizado novo procedimento cirúrgico que constou da segunda biópsia e retirada do aparelho. Após 48 horas iniciou-se a Estimulação Elétrica Neuromuscular (EENM), para isso foi feita a tricotomia da coxa direita e remoção da oleosidade com álcool para a redução da resistência da passagem de corrente elétrica. Dois eletrodos de canais diferentes foram colocados sobre os pontos motores (THOMSON & BOWEN, 1971) dos músculos vasto medial e vasto lateral e os restantes situados sobre os mesmos músculos o mais distante possível entre eles para fechamento de corrente numa disposição diagonal. Foi aplicado gel condutor apropriado de aproximadamente três milímetros de espessura sob os eletrodos, posicionados conforme a técnica quadripolar (KITCHEN, 2003) e fixados com fita elástica.

Os parâmetros da corrente emitida pelo aparelho de EENM foram frequência de 2500Hz, largura do pulso de 50%, modo sincronizado, com ciclos de estimulação de 12 segundos seguidos por 25 segundos de descanso (relação *on:off* de 1:2). A rampa de subida (*rise*) foi de três segundos e descida (*decay*) do pulso de três segundos. A intensidade de corrente foi controlada de acordo com o desconforto do animal ao estímulo (vocalização, inquietude, retirada do membro estimulado). Os

músculos estimulados foram os que compõem o quadríceps femoral, ou seja, vasto lateral, vasto medial, vasto intermédio e reto femoral.

Os cães do GI receberam aplicação de EENM de Média Freqüência (corrente de Kotz ou Russa), três vezes na semana, com intervalo de 48h entre as sessões com duração de 30 minutos, até o 60^o dia após a remoção do aparelho de fixação externa. Os cães do GII receberam o mesmo tratamento por 60 minutos.

A terceira biópsia muscular foi realizada aos 90 dias após a primeira. Os fragmentos da biópsia muscular do vasto lateral foram corados por Hematoxilina e Eosina, efetuando-se estudos morfométricos em corte transversal. Cada lâmina histológica foi fotografada com câmera digital acoplada ao microscópio com objetiva de 20X. A imagem obtida foi dividida em vinte partes iguais e mensurou-se a área de secção da fibra muscular, que se localizava no centro de cada divisão através do programa *Alfa Easer FC*[®].

Outras avaliações complementares constaram de medida da perimetria da coxa, goniometria da articulação fêmoro-tibio-patelar e atividade da enzima creatinaquinase (CK). Para a medida da perimetria realizou-se a tricotomia da coxa em ambos os membros, e com uma fita maleável (em cm), foram marcados três pontos eqüidistantes entre o trocânter maior e o côndilo lateral do fêmur e nesses pontos foi aferida a perimetria. Logo após utilizou-se goniômetro universal para mensurar a goniometria das angulações em flexão e extensão total do joelho, obtendo-se o arco de movimento. Esses procedimentos foram realizados nos dias 0 (pré), 30 e 90 dias após a primeira medida e os valores anotados em protocolos específicos. Para a avaliação da atividade da enzima CK foram coletados 5ml de sangue nos dias zero, 30, 45, 60 e 90 após a primeira coleta. Com exceção do dia zero, as coletas foram distribuídas em três tempos: antes (T0), duas (T1) e seis (T2) horas após EENM.

Para o cálculo estatístico utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de teste de comparações múltiplas de Duncan. Todos os resultados foram indicados pela média \pm do Erro Padrão da Média (EPM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da perimetria da coxa sofreram variações, no entanto, não apresentaram diferença entre os grupos nos diferentes tempos de avaliação, corroborando com SOUZA et al. (2007), demonstrando que este tipo de mensuração é relativa, já que a EENM foi realizada em apenas quatro músculos e não em todos os que compõem a coxa. JOHNSON et al. (1997) testaram a estimulação elétrica em cães após artroplastia do joelho e encontraram diferença significativa na claudicação e na mensuração da circunferência da coxa entre os cães tratados e não tratados.

Na medida da goniometria houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos no membro imobilizado (direito) no 30^o dia de pós-operatório que se deve aos diferentes graus de rigidez articular encontrado nos animais dos grupos, pois essa medida foi realizada logo após a retirada da imobilização.

Quanto à análise da atividade da enzima creatina quinase (CK) não houve diferença estatisticamente entre os animais dos grupos I e II em relação ao tempo de coleta. A escolha da enzima e o tempo de coleta foram baseados nos trabalhos realizados por BURR et al. (1997) os quais descreveram que a enzima CK é de maior confiança para avaliar injúria muscular. CARDINET III (1997) mostrou que o pico de CK em injúria muscular se dá entre duas a seis horas após a lesão. BIGARD (2001) citou que a atividade da CK está elevada quando há fadiga muscular e POSO et al. (1983) revelaram aumento da atividade da CK após exercícios acentuados, enquanto que em exercícios mais leves, não houve aumentos significativos, sugerindo que a intensidade da corrente pode ser um fator importante (SHELLE et

al., 1985). BIGARD (2001) relatou que o exercício pode conduzir à microlesões das fibras musculares, onde a gravidade da lesão varia de acordo com o tipo de exercício e a severidade. Geralmente quando ocorrem lesões musculares por intensidade de exercícios físicos, outros sinais clínicos são observados como dor a palpação (miosite) e às vezes claudicação. Nesta pesquisa, não foi encontrada nenhuma manifestação clínica de algias musculares durante o tratamento, coincidindo com os valores da CK sem significância estatística. Para chegar ao consenso de dano muscular deve-se associar o aumento da CK com atividade física acentuada. A relação *on time/off time* de 1:2 empregada neste experimento pode justificar estes achados, coincidindo com SOUZA (2006) que empregou a EENM no músculo quadríceps de cães com atrofia muscular induzida e não encontrou aumento significativo de CK.

Nos animais do grupo I não houve diferença significativa entre os dias zero e 30, sendo notada uma discreta diminuição da massa muscular causado pelo desuso do membro. Entre os dias zero e 90, houve aumento significativo ($P < 0,05$) no ganho de massa muscular ultrapassando o valor médio da área das fibras musculares no tempo zero, sugerindo a influência da EENM sobre o músculo vasto lateral (Figura 1A). No grupo II houve diferença ($P < 0,05$) entre os dias zero, 30 e 90 dias, em relação ao ganho de massa muscular. A diferença encontrada nos dias zero e 30, pode ser atribuída à atrofia muscular causada pelo membro pélvico em desuso e aquela observada entre os dias zero e 90 dias, pela influência da EENM, ocasionando um ganho significativo ($P < 0,05$) de massa muscular (Figura 1B), o que também foi observado por PELIZZARI et al. (2006) ao empregarem a estimulação elétrica funcional de baixa frequência.

Neste estudo, ficou evidente a influência da EENM de média frequência sobre o ganho de massa muscular, analisando a média das áreas das fibras musculares dos animais do grupo I e do grupo II entre o tempo zero e 90 dias de PO, pois tiveram valores significativos ($P < 0,05$) o que caracteriza ganho de massa muscular. Quando avaliados aos 90 dias, foi observado diferença ($P < 0,05$) do grupo II em relação ao grupo I (Figura 2). O tempo de duração de cada sessão de EENM (60 minutos) nos animais do grupo II, provavelmente tenha promovido a estimulação elétrica das fibras musculares por mais tempo, ocasionando um maior ganho de massa muscular em relação ao outro grupo.

Contudo, deve-se salientar que mesmo o animal tendo atrofia muscular ele não fica impedido de realizar suas atividades diárias como caminhar e correr, desde que não haja uma atrofia muscular muito grave. A função da EENM então é restituir a qualidade fisiológica do músculo precocemente para que este músculo afetado recupere a sua forma física ou aproximada àquela prévia à atrofia muscular.

CONCLUSÃO

A estimulação elétrica neuromuscular (EENM) de média frequência ocasiona ganho de massa muscular em cães com atrofia muscular induzida.

A duração de 60 minutos de EENM promove maior ganho de massa muscular em relação ao tempo de 30 minutos.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este trabalho seguiu as normas de experimentação segundo o Comitê de Ética Experimental para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Maria e foi aprovado constando no Processo Administrativo número 23081.009802/2006-21.

AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa vinculada ao processo 300885/2008-3.

REFERÊNCIAS

- APPELL, H.J. Skeletal muscle atrophy during immobilization. **Internal Journal Sports Medicine**, v.7, n.1, p.6-12, 1986.
- ARON, D.N. Tendões. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Roca, 1996. Cap.40, p.516-527.
- BIGARD, A.X. Lesions musculaires induites par l'exercice et surentraînement. **Science & Sports**, v.16, p. 204-215, 2001.
- BOOTH, F.W. Time course of molecular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. **Journal of Applied Physiology**, v.43, n.5, p.656-661, 1977.
- BURR, J.R. et al. FERUM biochemical values in sled dog before and after competing in long-distance races. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.211, n.2, p.175-179, 1997.
- CARDINET III, G.H. Skeletal muscle function. In: KANECO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. California: Academic, 1997. Cap.16, p.407-440, 1997.
- CURRIER, D.P. et al. Electrical stimulation in exercise of the quadriceps femoris muscle. **Physical Therapy**, v.59, n.12, p.1508-1512, 1979.
- GIBSON, J.N.A. et al. Prevention of diffuse muscle atrophy by means of electrical stimulation: maintenance of protein synthesis. **Lancet**, v.2, n.8614, p.767-770, 1988.
- GOSSMAN, M.R. et al. Length and circumference measurements in one joint and multi-joint muscle in rabbits after immobilization. **Physical Therapy**, v.66, n.4, p.516-520, 1986.

GOULD, N. et al. Transcutaneous muscle stimulation to retard disuse atrophy after open meniscectomy. **Transcutaneous Muscle Stimulation**, v.9, n.178, p.190-197, 1983.

JOHNSON, J.M. et al. Rehabilitation of dogs with surgically treated cranial cruciate ligament-deficient stifles by use of electrical stimulation of muscles. **American Journal Veterinary Research**, v.58, n.12, p.1473-1478, 1997.

KITCHEN, S. **Eletroterapia. Prática baseada em evidência**. 11.ed. São Paulo: Manole, 2003. 348p.

MAZZANTI, A. **Homoimplante ortotópico conservado, associado à terapia “soft laser” na reparação tenopatelar em cão**. 2002. 80f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

McGAVIN, R. Músculos. In: CARLTON, W.W.; McGAVIN, R. **Patologia veterinária especial de Thompson**. 2.ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. p.426.

MILLIS, D.L. Responses of musculoskeletal tissues to disuse and remobilization. In: MILLIS, D.L. et al. **Canine rehabilitation & physical therapy**. Missouri: Elsevier, 2004. Cap.7, p.113-159.

MORRISSEY, M.C. et al. The effects of electrical stimulation on the quadriceps during postoperative knee immobilization. **American Journal of Sports and Medicine**, v.13, n.1, p.40-45, 1985.

OGINO, M. et al. MRI quantification of muscle activity after volitional exercise and neuromuscular electrical stimulation. **American Journal of Physical and Medicine Rehabilitation**, v.81, n.6, p.446-451, 2002.

PELIZZARI C. et al. Estimulação elétrica neuromuscular de baixa frequência em cães com atrofia muscular induzida. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.60, n.1, p.76-82, 2008.

POSO, A.R. et al. The effect of exercise on blood parameters in standardbred and Finnish-bred horses. **Acta Veterinary Scandinavica**, v.24, n.2, p.170-184, 1983.

ROSEMBERG, M. et al. Trans-cutaneous electrical nerve stimulation for relief of postoperative pain. **Pain**, Amsterdam, v.5p.129-133,1978.

SALTER, A.C. et al. Prevention of muscle atrophy by low-frequency electrical stimulation in rats. **Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering**, v.11, n.3, p.218-226, 2003.

SHELLE, J. E. et al. Blood parameters as a result of conditioning horses through short strenuous exercise bouts. In: EQUINE NUTRITIONAL PHYSIOLOGY SIMPOSIUM, 9., 1985,. **Proceedings...** East Lansing: The Equine Nutrition and Physiology and Michigan State University, 1985. p.206.

SOUZA, S.F. **Estimulação elétrica neuromuscular em cães submetidos a imobilização rígida temporária da articulação femoro-tibio-patelar**. 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, RS.

SOUZA, S.F. et al. Estimulação elétrica neuromuscular em cães submetidos á imobilização rígida temporária da articulação femoro-tibio-patelar. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.165-170, 2007.

THOMSON, F.K.; BOWEN, J.M. Eletrodiagnostic testing: mapping and clinical use of motor points in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.159, n.12, p.1763-1771, 1971.

WILLIAMS, F.A. et al. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. **Journal of Anatomy**, v.158, p.109-114, 1988.

WILLIAMS, J.P.C.; STREET, M. Sequential faradism in quadriceps rehabilitation.

Physiotherapy, v.116, n.1, p.45-55, 1976.

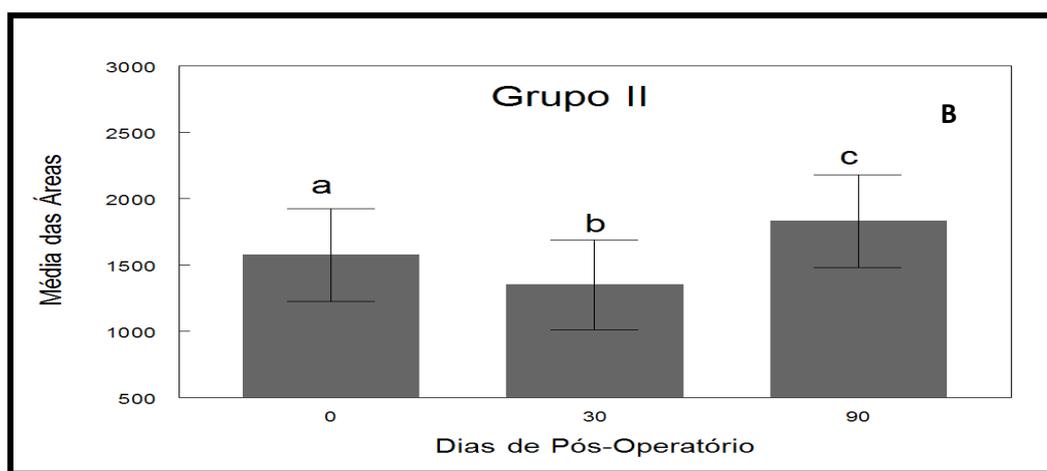
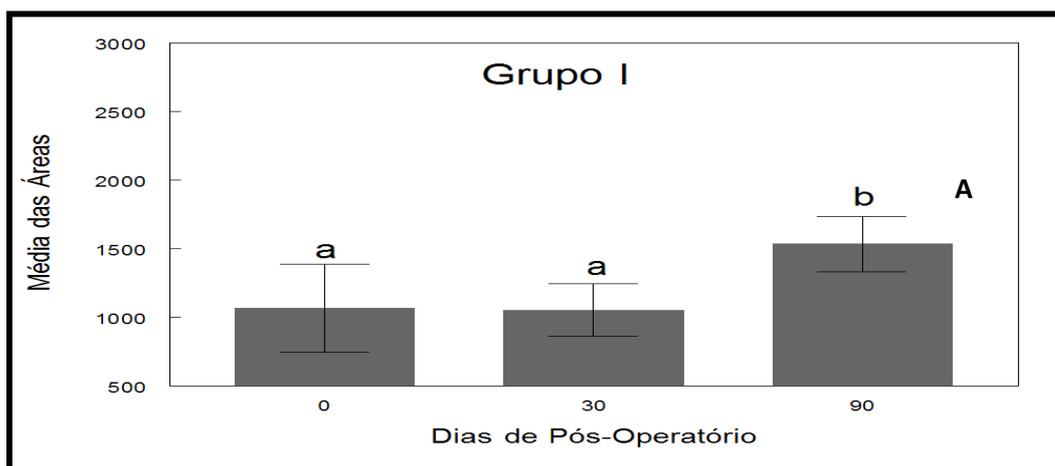


Figura 1 - Morfometria das fibras musculares em corte transversal (área) de cães submetidos à EENM de média frequência com atrofia muscular induzida nos tempos zero, 30 e 90 dias após a imobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar, GI (30min) e GII (60min). Em 'A' comparação dos tempos zero, 30 e 90 no grupo GI e em 'B' comparação no Grupo II. A área das fibras foi mensurada pelo programa Alfa Ease FC[®] e seus valores são referidos em *pixels*. Letras diferentes revelam significância estatística ($P < 0,05$).

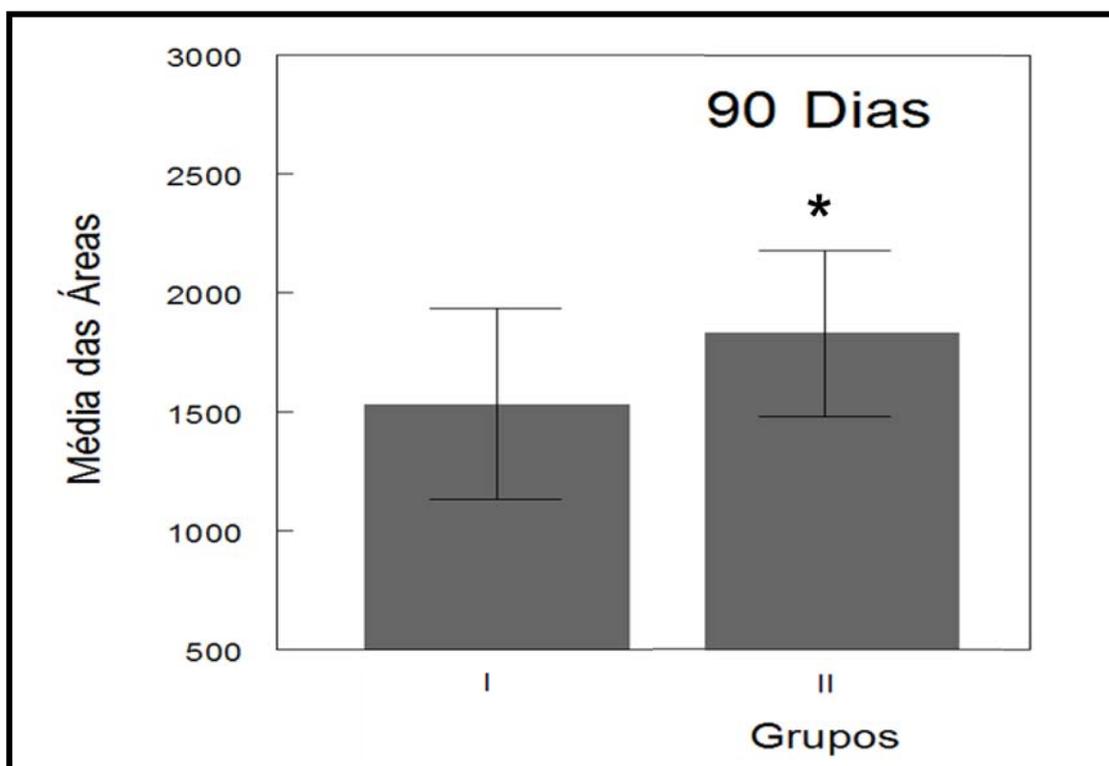


Figura 2 - Morfometria das fibras musculares em corte transversal (área) de cães submetidos à EENM de média frequência com atrofia muscular induzida. Comparação dos Grupos I e II aos 90 dias de pós-operatório. A área das fibras foi mensurada pelo programa Alfa Ease FC[®] e seus valores são referidos em “pixels”. Notar significância estatística (*) ($P < 0,05$).

18. Discussão

As modalidades de reabilitação terapêutica são indicadas para promover a recuperação de animais (CANNAP, 2007; SOUZA, 2010). Dentre essas modalidades estão incluídas a eletroterapia (SOUZA, 2006; PELIZZARI et al. 2008) e a fonoforese (LEVINE et al. 2008). Essas duas modalidades estão indicadas em afecções músculo esqueléticas e no período de pós-operatório. Elas podem ser utilizadas separadamente ou associadas, sendo que a reabilitação pode ser mais eficaz utilizando várias modalidades terapêuticas.

Na realização da fonoforese com diferentes grupos não houve diferença ($P < 0,05$) com o uso do ultrassom (fonoforese) e sem o uso do ultrassom, não se evidenciando valor plasmático de diclofenaco sódico, ou este estava abaixo do limite de quantificação do método bioanalítico desenvolvido que foi de 25 ng ml^{-1} . Em estudo com diclofenaco dietilamônio em humanos saudáveis, Fusaro (2006), relatou que em 75% dos voluntários submetidos a fonoforese ou à aplicação tópica sem ultrassom, as concentrações plasmáticas de diclofenaco ficaram abaixo do limite de detecção, que foi de 50 ng ml^{-1} . Outros estudos mostraram que o ultrassom com diclofenaco sódico facilitou a penetração transcutânea (ROSIM, 2003). Para McNeill (1992), e Fusaro (2006), a quantificação de diclofenaco plasmático pode não ocorrer, mas existiram indícios que possa haver concentração local, abaixo da pele na área de fonoforese.

Em avaliação de penetração por fonoforese de diclofenaco sódico em gelatina, imitando pele humana, Carnio (2005), verificou que a penetração do medicamento foi de 3mm para a irradiação com $1,0 \text{ W cm}^{-2}$ e 5mm para a irradiação com $1,5 \text{ W cm}^{-2}$ de forma contínua e estacionária. Para esta hipótese ser testada, em cão, seria necessária a avaliação da área de aplicação local e que segundo Mitchell & Warner (1999) o IC50 (concentração inibitória de 50%) para a inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) pelo diclofenaco é 50 ng ml^{-1} nos tecidos imediatamente abaixo da aplicação. Essa avaliação na espécie em questão é necessária, pois, corroborando com Carnio (2006), alguns postulados teóricos largamente difundidos

na fisioterapia sofrem mudança quando observados do ponto de vista físico e prático.

Na eletroterapia, ficou evidente a influência da EENM de média frequência sobre o ganho de massa muscular, analisando a média das áreas das fibras musculares dos animais do grupo I e do grupo II entre o tempo zero e 90 dias de PO, pois tiveram valores significativos ($P < 0,05$) o que caracteriza ganho de massa muscular. Quando avaliados aos 90 dias, foi observado um valor maior da área transversal das fibras musculares do grupo II em relação ao grupo I. O tempo de duração de cada sessão de EENM que foi nos animais do grupo II por 60 minutos, provavelmente tenha promovido a estimulação elétrica das fibras musculares por mais tempo, ocasionando um maior ganho de massa muscular em relação ao outro grupo.

Pode-se associar as modalidades aqui pesquisadas, apesar de neste trabalho não terem sido estudadas dessa forma. O pós-operatório de procedimentos cirúrgicos necessita de analgesia e tratamento anti-inflamatório, assim sendo, ressalta-se a necessidade de mais pesquisas, como associar a fonoforese com posterior eletroterapia como forma de restituir a massa muscular que foi atrofiada, em casos cirúrgicos ortopédicos por exemplo.

Souza (2010) relata que animais mostraram-se impacientes nas sessões de fisioterapia e a contenção física em decúbito lateral, quando necessária, foi realizada por um auxiliar, sem observar, em nenhum dos cães manifestação de dor às sessões. Isso demonstrou a adaptação dos mesmos se manipulados de forma adequada e evidenciou hipertrofia muscular com o uso da eletroterapia. Neste trabalho também verificou-se hipertrofia muscular com a eletroterapia pelo tempo de 60 minutos, mas concorda-se com Souza (2010), que alguns animais podem ser impacientes. O tempo de eletroestimulação de 60 min pode ser considerado longo e alguns animais não são candidatos a eletroterapia. Ainda assim pode-se aplicar a eletroterapia nesses pacientes, mas tem-se que estar consciente da adaptação destes ao tempo de estimulação estipulado. Na tentativa de diminuir o tempo de eletroestimulação e alcançar o mesmo efeito de hipertrofia mais pesquisas são necessárias.

19. Conclusão

Devido as diferentes modalidades de fisioterapia e à gama de protocolos, novas pesquisas devem ser realizadas para se poder avaliar qual o melhor protocolo e/ou modalidade para os animais. Esses protocolos devem ser eficientes, não causar desconforto ou efeitos colaterais. Alguns estudos estão sendo realizados associando as modalidades de fisioterapia e mostrando bons resultados, isto indica que não se pode abrir mão da associação dessas modalidades para otimizar a recuperação da afecção. Mas, salienta-se que cada espécie pode apresentar resultados diferentes, portanto, essas pesquisas devem ser baseadas nas respostas das espécies em que se deseja obter o conhecimento.

20. Bibliografia

APPELL, H.J. Skeletal muscle atrophy during immobilization. **Internal Journal Sports Medicine**, v.7, n.1, p.6-12, 1986.

BOOTH, F.W. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. **Journal Applied Physiology**, v.52, n.5, p.1113-1118, 1982.

BRASILEIRO, J. S.; CASTRO, C. E. S. C.; PARIZOTTO, N. A. Parâmetros manipuláveis clinicamente na estimulação elétrica neuromuscular (EENM). **Fisioterapia Brasil**, v.3, n.1, p. 16-24, 2002.

CANAPP, D. A. Select modalities. **Clinical techniques in small animal practice**, v.22, n.4, p.160-165, 2007.

CARDOSO, M.M.S.C.; CARVALHO, J.C.A.; TAHAMTANI, S.M.M. Diclofenaco por via muscular ou retal associado com baixas doses de morfina subaracnóidea para analgesia pós-operatória em cesarianas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.52, p.666-672, 2002.

DAVIDSON, J. R.; KERWIN, S. C.; MILLIS, D. L. Reabilitação ortopédica. In: LEVINE, D.; et al. **Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais**. São Paulo : Roca, 1ed. Cap.6, p.119-155, 2008.

DOYLE, A.; HORGAN, N. F. Perceptions of animal physiotherapy amongst Irish veterinary surgeons. **Irish veterinary journal**, v.59, n.2, p.85-88, 2006.

EDGERTON, V.R., et al. Properties of immobilized hind-limb muscle of the *Galago senegalensis*. **Experimental Neurology**. v.46, n.2, p.115-131, 1975.

FUSARO, C. **Estudo da fonoforese de diclofenaco dietilamônio em voluntários sadios**. 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Estadual de Campinas, 2006

GIBSON, J.N.A., et al. Prevention of diffuse muscle atrophy by means of electrical stimulation: maintenance of protein synthesis. **The Lancet**, v.2, n.8614, p.767-770, 1988.

GOSSMAN, M.R., et al. Length and circumference measurements in on joint and multi-joint muscle in rabbits after immobilization. **Physical Therapy**, v.66, n.4, p.516-520, 1986.

GOULD, N., et al. Transcutaneous muscle stimulation to retard disuse atrophy after open meniscectomy. **Transcutaneous Muscle Stimulation**, v.9, n.178, p.190-197, 1983.

JOHNSON, J.; LEVINE, D. Electrical stimulation. In: MILLIS, D. L.; LEVINE, D.; TAYLOR, R. A. **Canine rehabilitation & physical therapy**. Missouri : Elsevier. C.17, p. 289-302, 2004.

JOHNSON, J.M., et al. Rehabilitation of dogs with surgically treated cranial cruciate ligament-deficient stifles by use of electrical stimulation of muscles. **American Journal Veterinary Research**. v.58, n.12, p.1473-1478, 1997.

LEVINE, D.; MILLIS, D. L.; MARCELLIN-LITTLE, D. J. Introdução à reabilitação física em Veterinária. In: LEVINE, D.; et al. **Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais**. São Paulo : Roca, 2008. Cap.1, p.1-8.

MAZZANTI, A. **Homoimplante ortotópico conservado, associado à terapia “soft laser” na reparação tenopatelar em cão**.2002. 80f. Tese (Doutorado em Cirurgia) –da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

McNEILL S.C., POTTS R.O., FRANCOEUR M.L. Local enhanced topical delivery (LETD) of drugs: does it truly exist? **Pharmaceutical Research**, v.9, n.11, p.1422-1427, 1992.

MILLIS, D.L. Responses of musculoskeletal tissues to disuse and remobilization. In: MILLIS, D.L. et al. **Canine rehabilitation & physical therapy**. Missouri: Elsevier, 2004 Cap.7, p.113-159.

MITCHELL J.A.; WARNER T.D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **British Journal of Pharmacology**, v.128, n.6, p1121-1132, 1999.

MORRISSEY, M. C. et al. The effects of electrical stimulation on the quadriceps during postoperative knee immobilization. **American Journal of Sports and Medicine**, v.13, n.1, p.40-45, 1985.

MÜLLER; C.R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v.27, p.555-560, 2004.

MÜLLER; S.S. et al. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.12, p.197-204, 2004.

OGINO, M. et al. MRI quantification of muscle activity after volitional exercise and neuromuscular electrical stimulation. **American Journal of Physical and Medicine Rehabilitation**, v.81, n.6, p.446-451, 2002.

PELIZZARI C. et al. Estimulação elétrica neuromuscular de baixa frequência em cães com atrofia muscular induzida. **Arquivos brasileiros de medicina veterinária e zootecnia**, v.60, n.1, p.76-82, 2008.

ROSIM, G.C. **Análise da influência do ultrassom terapêutico na penetração transcutânea de diclofenaco sódico em humanos sadios**. 2003.62f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, SP.

SALBEGO, F.Z. **Substituição do ligamento cruzado cranial em cães, por segmento teno-ósseo homólogo conservado em glicerina a 98%, submetidos a diferentes protocolos de reabilitação**. 2006 119f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

SALTER, A.C., et al. Prevention of muscle atrophy by low-frequency electrical stimulation in rats. **Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering**, v.11, n.3, p.218-226, 2003.

SOUZA, S. F. **Reabilitação em cães com atrofia muscular induzida**. 2010. 88f. Tese (Tese em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” UNESP Campus Jaboticabal, SP.

SOUZA, S. F; et al. Reabilitação em cães submetidos a artroplastia do joelho. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.36, n.5, p.1456-1461, 2006.

TASAKA; A.C. Antiinflamatórios não esteroidais. In: SPINOSA; H.S. et al. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999. Cap.21, p.220.

VEENMAN, P. Animal physiotherapy. **Journal of bodywork and movement therapies**, v.10, n.4, p.317-327, 2006.