

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO

**EFEITO DO ULTRA-SOM SOBRE A NOCICEPÇÃO E O PROCESSO
INFLAMATÓRIO EM MODELOS ANIMAIS E SOBRE A ESTRUTURA
QUÍMICA DE FÁRMACOS**

Dênis Barnes

UNIVATES

Lajeado, Abril de 2008

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO

**EFEITO DO ULTRA-SOM SOBRE A NOCICEPÇÃO E O PROCESSO
INFLAMATÓRIO EM MODELOS ANIMAIS E SOBRE A ESTRUTURA
QUÍMICA DE FÁRMACOS**

Dênis Barnes

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título de
Mestre em Ambiente e Desenvolvimento.
Orientadora: Profa. Dra. Ionara Rodrigues
Siqueira
Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Stülp

Lajeado, Abril de 2008

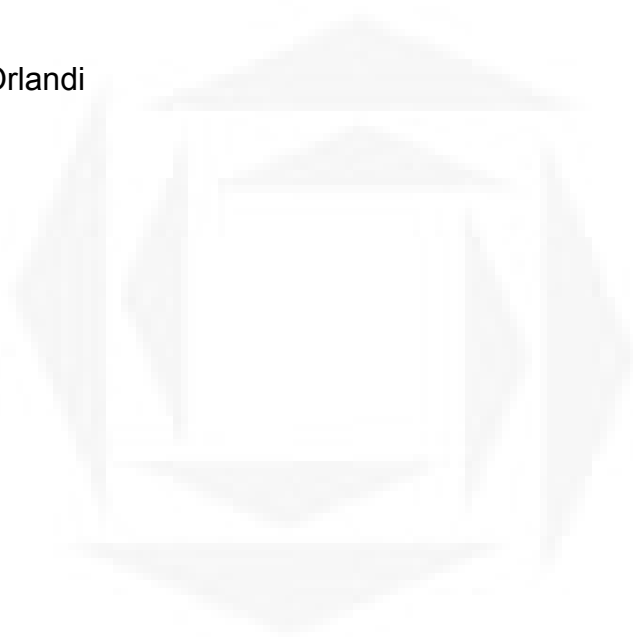
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

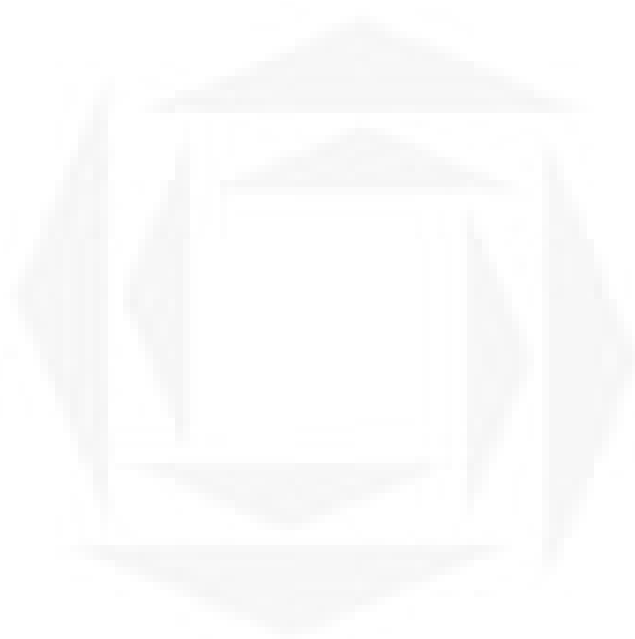
Profa. Dra. Simone Stülp

Profa. Dra. Iraci Torres

Prof. Dra. Lenir Orlandi



UNIVATES



UNIVATES

Sempre sustente na sua mente a idéia de que sua própria resolução de vencer é mais importante que qualquer outra coisa. (Dale Carnegie)

DEDICATÓRIA

A meus pais

Deixar entusiasmo para os seus filhos é uma herança de incontável valor.

A minha avó

Que iluminou meu caminho até chegar aqui.

UNIVATES

AGRADECIMENTOS

A minha Orientadora Dra. Ionara Siqueira e Co-orientadora Dra. Simone Stülp pelos ensinamentos e dedicação.

A Bolsista Paula Bianchetti pela amizade, atenção e presteza, durante o desenrolar da pesquisa.

À Empresa FISIO 2000 e assistência Técnica LTDA, na pessoa de Fábio Rigo de Souza, Melissa Martins, pelo apoio e incentivo à pesquisa.

UNIVATES

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Dor.....	12
.....	
1.2. Inflamação.....	13
....	
1.3. Ultra-.....	16
Som.....	
1.4. Fonoforese.....	16
....	
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. CAPÍTULOS.....	21
3.1 Capítulo I.....	21
3.2 Capítulo II.....	38
3.3 Capítulo III.....	54
DISCUSSÃO GERAL.....	56
CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

RESUMO

Os efeitos do ultra-som têm sido amplamente estudados, o ultra-som constituindo-se uma técnica fisioterapêutica bastante comum. Há dois tipos de pulso, comumente utilizados na prática clínica do ultra-som terapêutico, o contínuo e o pulsado. O ultra-som *per se* é usado para reduzir a dor e o edema, contudo tem sido usada para aumentar a absorção transdérmica de moléculas de fármacos através da pele, a fonoforese. Há um limitado número de publicações na área e os dados obtidos são bastante conflitantes sobre a possibilidade de ocorrer alterações nas moléculas dos fármacos pela exposição às ondas sônicas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do ultra-som sobre a estrutura química de fármacos utilizados na Fisioterapia dermatofuncional, traumatológica e reumatológica, como o diclofenaco de sódio, a dexametasona e a rutina usados na fonoforese, utilizando ensaio espectrofotométrico. Além de que, foi avaliada a ação antinociceptiva (analgésica) do ultra-som (contínuo e pulsado) *per se* e o efeito do ultra-som sobre a inflamação crônica.

Na análise do espectro de absorção dos fármacos foi investigada a degradação do diclofenaco de sódio (0,2%), dexametasona (0,2%) e rutina (0,002%). As soluções aquosas foram expostas ao ultra-som, ondas contínuas e pulsadas em condições terapêuticas, especialmente na fonoforese. A análise dos espectros de UV/visível sugere a ausência de degradação das moléculas testadas, diclofenaco sódico, dexametasona e rutina pelo ultra-som. Os efeitos da exposição de ultra-som em moléculas estruturais são importantes, considerando que a atividade biológica é diretamente dependente da ausência de degradação nas condições usadas além da absorção percutânea.

A fim de estudar a ação antinociceptiva (analgésica) do ultra-som (contínuo e pulsado) foi utilizado o teste da formalina, que consiste na administração de formalina (2,5%) na região plantar da pata direita traseira, a pata tratada com o ultra-som, de camundongos albinos e adultos. O tempo gasto em lambidas e mordidas da pata injetada com formalina nos primeiros 5 min (primeira fase) foi tomado como indicativo de dor neurogênica, e a segunda fase (entre 15-30 minutos), acompanhada de resposta inflamatória relacionada a mediadores da inflamação, foi considerada dor inflamatória. Ultra-som contínuo, ultra-som pulsado e ultra-som desligado foram aplicados imediatamente, ou 60 minutos antes da administração da formalina. O ultra-som não demonstrou ação antinociceptiva em nenhuma fase do teste.

O efeito do ultra-som pulsado sobre a sobre a inflamação crônica foi avaliado através da formação do tecido granulomatoso. Os animais foram anestesiados e dois pellets de algodão autoclavados, foram implantadas subcutaneamente nas costas previamente depiladas. Vinte e quatro horas depois da implantação os camundongos foram tratados com o ultra-som pulsado e ultra-som desligado. O ultra-som não alterou a formação do tecido granulomatoso no teste do granuloma, indicando ausência de efeito anti-proliferativo.

O ultra-som não apresentou as atividades antinociceptivas e antiinflamatórias nos modelos testados. Na análise dos espectros de UV/visível demonstra a ausência de degradação das moléculas testadas, diclofenaco sódico, dexametasona e rutina pelo ultra-som. Os efeitos da exposição de ultra-som em moléculas estruturais são importantes, considerando que a atividade biológica é diretamente dependente da ausência de degradação nas condições usadas além da absorção percutânea.



LISTA DE ABREVIATURAS

PGs	prostaglandinas
AINES	antiinflamatórios não-esteróides
Mhz	mega hertz
W	watts
W/cm ²	watts por centímetro quadrado
ERA	área efetiva de radiação
US	ultra-som
cm ²	centímetro quadrado

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1- Condução elétrica sem aplicação do ultra-som.....	33
Figura 2- Condução elétrica no tempo 0 e após 20 minutos de aplicação do ultra-som.....	34
Figura 3- Temperatura no tempo 0 e após 20 minutos de aplicação do ultra-som.....	34
Figura 4A- Grafico de espectro de UV/visível do diclofenaco de sodio exposto ao ultra-som pulsado.....	35
Figura 4B- Grafico de espectro de UV/visível do diclofenaco de sodio exposto ao ultra-som contínuo.....	35
Figura 5A- Grafico de espectro de UV/visível do dexametasona exposto ao ultra-som pulsado.....	36
Figura 5B- Grafico de espectro de UV/visível do dexametasona exposto ao ultra-som contínuo.....	36
Figura 6A- Grafico de espectro de UV/visível do rutina exposto ao ultra-som pulsado.....	37
Figura 6B- Grafico de espectro de UV/visível do rutina exposto ao ultra-som contínuo.....	37

Capítulo 2

Figura 1- Tempo de lambida imediatamente depois, 60 minutos depois, controle positivo e controle negativo na primeira fase.....52

Figura 2- Tempo de lambida imediatamente depois, 60 minutos depois, controle positivo e controle negativo na segunda fase.....52

Figura 3- Tempo de lambida com e sem massagem.....53

Figura 4- Efeito do ultra-som sobre a inflamação crônica.....53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A dor tem sido encarada como uma sensação provocada pela lesão de órgãos ou tecidos inervados. O uso de medicamentos altera mecanismos nervosos periféricos ou centrais de percepção da informação dolorosa. O Comitê “International Association for the Study of Pain” conceituou dor como “experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão real ou potencial dos tecidos” (TJOLSEN e HOLE, 1997; MERSKEY e BONICA, 1979; CAILLIET, 1999). O conjunto de percepções de estímulos nocivos, denominada de nocicepção, não denota exatamente a sensação de dor, já que esta possui componentes afetivos, culturais e psicológicos. Desde que os animais são incapazes de demonstrar os componentes subjetivos da dor, a nocicepção é avaliada em modelos animais. A nocicepção desencadeia comportamentos típicos nos animais, chamados comportamentos nociceptivos, como lamber, morder a área lesada, bem como a vocalização ou reflexo de retirada da parte do corpo em contato com estímulo nocivo. Os fármacos que suprimem os comportamentos nociceptivos são denominados antinociceptivos, enquanto que as substâncias que os induzem são chamadas de algogênicas (MARK *et al*, 2002; DOUGLAS, 1999).

A transmissão dolorosa é bastante complexa e envolve a interação de estruturas periféricas e centrais. A sensação dolorosa inicia com a transdução de estímulos térmicos, mecânicos e químicos em potenciais de ação. Os nociceptores

receptores de dor são terminações nervosas livres presentes nas fibras amielínicas C e mielínicas A- δ (JULIUS e BASBAUM, 2001). Os nociceptores são ativados por substâncias algogênicas liberadas no ambiente tecidual, originadas de células lesadas, células do sistema imunológico e do sistema vascular, causando nocicepção e vasodilatação, instalando-se o processo inflamatório.

Alguns dos agentes algogênicos, entre outros, íons potássio, adenosina trifosfato, glutamato substância P e radicais livres, participam do processo nociceptivo ou por algogênicos exógenos, como o ácido acético e a formalina, induzem a despolarização dos nociceptores. Os mediadores da inflamação parecem ser algogênicos por uma ação facilitatória, por exemplo, prostaglandinas (PGs) e leucotrienos sensibilizam os nociceptores primários à ação da bradicinina (COHEN e PERL, 1990). Há outras substâncias que agem na sensibilização local, que são produzidas antidromicamente (no sentido inverso da transmissão dos nervos sensitivos), como a substância P.

1.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta que se caracteriza por extravasamento do exsudato para o compartimento intersticial, resultante da vasodilatação e retração das células endoteliais, e na infiltração de células fagocíticas, polimorfonucleares e monocíticas, no tecido injuriado (FANTONE e WARD, 2002). Outra fase da resposta inflamatória, o acúmulo e subsequente ativação de leucócitos é um dos eventos centrais na patogênese de todas as formas de inflamação. Os leucócitos migram para o sítio de inflamação em resposta aos estímulos quimiotáticos (FANTONE e WARD, 2002). Estes leucócitos ativados secretam seus conteúdos granulares e radicais livres durante a quimiotaxia e a fagocitose, o que causa dano no tecido adjacente.

Várias substâncias usadas no alívio da dor foram obtidas a partir de plantas, a citar importantes medicamentos ainda utilizados na clínica como a morfina obtida da papoula, *Papaver somniferum*, e o ácido salicílico, isolado de espécies do gênero *Salix* (CALIXTO et al., 2000). CALIXTO et al (2000) revisaram a contribuição de várias espécies vegetais na modulação da dor. Os derivados opióides (dentre eles a

morfina e a codeína) foram isolados do látex obtido pela incisão de sementes após as flores da papoula, *Papaver somniferum*, perderem as pétalas. A morfina modula a percepção da dor, aumentando o limiar a resposta a estímulos aversivos. A antinocicepção induzida pela morfina é mediada por receptores opióides e é inibida pelo antagonista opióide, naloxona (DHAWAN *et al.*, 1996). O protótipo dos chamados antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) é o ácido acetilsalicílico isolado de espécies do gênero *Salix* (“chorão”, Salicaceae). Os AINES inibem a síntese de PGs através da inibição da atividade da enzima cicloxigenase (CASHMAN, 1996). Mecanismos inovadores têm sido procurados para o tratamento de doenças inflamatórias (TORRANCE *et al.*, 2004).

1.3 Ultra-Som

Além da terapêutica medicamentosa, muitos autores aconselham o uso do ultra-som para diminuir os sinais inflamatórios como a dor. O edema, especialmente em medicina esportiva (GUIRRO e GUIRRO, 2002; LOW e REED, 2001; KITCHEN, 2003), mas estes trabalhos apresentam deficiências metodológicas (MCDIARMID e BURNS, 1987). Foi no final da década de 40 e início da década de 50 que se conseguiu com sucesso a primeira aplicação do ultra-som em medicina, sendo que a partir de então sua evolução progrediu rapidamente (GUIRRO e GUIRRO, 2002; MARTÍN, 2000). Os efeitos biológicos da terapia ultra-sônica são resultantes de resposta fisiológica às ações mecânicas e térmicas. Entre os efeitos considerados estão micromassagem, aumento do fluxo sanguíneo, relaxamento muscular, aumento da permeabilidade das membranas, aumento da capacidade regenerativa dos tecidos, efeito sobre os nervos periféricos, redução da dor, entre outros (HOOGLAND, 1986).

O método de funcionamento do ultra-som está baseado na contração do cristal, são utilizados cristais cerâmicos sintéticos que tem propriedades piezoelétricas. Ao se colocar um material piezoelétrico num campo elétrico, as cargas interagem com o mesmo e produzem tensões mecânicas. Quando a corrente for desligada, o cristal retorna à sua forma original, esta ação mecânica provoca a emissão de ondas ultra-sônicas com frequência igual à corrente recebida ou

corrente que incide sobre o cristal dentro do transdutor (WILLIAMS, 1987; GUIRRO e GUIRRO, 2002; MACHADO, 2003). O cristal precisa ser cortado com dimensões apropriadas, sendo a espessura o mais importante, de modo que ressoe na frequência escolhida e assim alcance a máxima vibração (LOW e REED, 2001).

A profundidade de penetração da energia ultra-sônica nos tecidos biológicos varia de modo inverso à sua frequência, sendo que os feixes ultra-sônicos que estão situados na faixa terapêutica penetram de 3 a 5 centímetros nos tecidos moles. O ultra-som com frequência de 6 mega hertz (MHz) não ultrapassa a pele (GUIRRO e GUIRRO, 2002). O feixe ultra-sônico transporta uma determinada quantidade de energia produzida pelo transdutor, sendo que esta energia é conduzida num determinado espaço de tempo, que chamamos de potência (Watt). Quando esta potência é dividida pela superfície do feixe (cm^2), a intensidade deste feixe é dada em W/cm^2 (AGNE, 2004).

A intensidade deve ser determinada pelo tipo de tecido, a profundidade desejada e a frequência da onda. A intensidade deve ser mantida num mínimo que possibilite um tratamento efetivo (GUIRRO *et al.*, 1996b). Quando a intensidade for muito baixa não haverá efeito terapêutico e se for muito alta provocará efeitos indesejáveis, sendo necessária sua utilização apropriada para que seja eficaz (ARTHO *et al.*, 2002).

Segundo HOOGLAND (1986) o tempo de aplicação do ultra-som pode ser calculado de posse das medidas da área a ser tratada, o qual é dividido pela ERA (área efetiva de radiação do cristal) do ultra-som. Exemplo: em uma região de 40 centímetros quadrados, empregando-se um transdutor de cinco centímetros quadrados de ERA (40, área a ser tratada, dividido por 5, a ERA), resultando em oito minutos de aplicação.

BLINDER *et al.* (1985) demonstraram um efeito benéfico a 65% dos pacientes tratados com o ultra-som, contudo tem se sugerido que o ultra-som tem um apreciável efeito placebo (BLINDER *et al.*, 1985, HASHISH *et al.*, 1988, LUNDEBERG *et al.*, 1988). Contudo, HOLDSWORTH (1993) relatou a melhora de pacientes com o tratamento do ultra-som.

Há dois tipos de pulso, comumente utilizados na prática clínica do ultra-som terapêutico, o contínuo e o pulsado (GUIRRO e GUIRRO, 2002). O modo contínuo, que se caracteriza por ondas sônicas contínuas, induz efeitos térmicos, alteração da pressão e micromassagem. O modo da onda pulsada não é único, ele varia de acordo com a taxa de repetição dos pulsos – 5%, 10%, 20%, ou ainda quando se altera a sua amplitude no tempo, provoca alteração da pressão e mínimos efeitos térmicos (KITCHEN, 2003; LOBATO, 2002).

O aumento da temperatura tecidual, observado no ultra-som contínuo, parece ocasionar um aumento do fluxo sanguíneo local, na permeabilidade da membrana e na distensibilidade das fibras colágenas, o que aumenta a capacidade de regeneração de tecidos lesados e da elasticidade tecidual (GUIRRO *et al.*, 1996b).

Na forma pulsada predominam os efeitos não térmicos ou mecânicos – cavitação estável, micro-fluxo acústico e força de radiação. As vibrações ultra-sônicas causam compressões e expansões nos tecidos em uma mesma frequência que é emitida pelo aparelho. O efeito mecânico, portanto, também é chamado de micromassagem, e esta consiste na reação mecânica dos tecidos devido à pressão da onda ultra-sônica (GUIRRO *et al.*, 1996b; COAKLEY, 1978).

1.4 Fonoforese

Alguns autores têm demonstrado que o ultra-som pode aumentar a penetração de alguns fármacos aplicados topicamente. Este conceito de ultra-som terapêutico associado a fármacos tem promovido investigações nos diversos campos da medicina (KUNTZ *et al.*, 2006).

A transmissão transdérmica de drogas proporciona uma alternativa para as vias de oral e injetável. Entretanto, esta aplicação tem sido limitada a poucas drogas porque a pele é pouco permeável. A propriedade de barreira da pele é atribuída à camada córnea que é formada por corneócitos, cuja bicamada lipídica aumenta a resistência a transporte de íons (BYL, 1995; MITRAGOTRI *et al.*, 1996). Devido à

dificuldade na penetração de drogas pela pele, agentes químicos e físicos vêm sendo estudados para que as barreiras da pele sejam diminuídas e, assim, se acentue a penetração cutânea (KOST *et al.*, 1989).

Uma variedade de pesquisas tem indicado que, para aumentar o sistema de transporte de fármacos pela pele, pode-se utilizar, entre outros recursos, as correntes elétricas e a aplicação de ultra-som (MITRAGOTRI *et al.*, 1995), por que a ação de uma força física externa melhora a permeabilidade da pele (UEDA *et al.*, 1996).

A fonoforese é considerada uma técnica em que o ultra-som é usado para conduzir a aplicação tópica de um determinado medicamento para dentro dos tecidos (PRENDICE, 2002; GUIRRO, 2002). Sugere-se que fonoforese potencializa o aumento de permeabilidade da membrana celular (BORGES, 2006). MITRAGOTRI *et al.* (1996) consideram que a cavitação é o principal mecanismo para a fonoforese, pois induz uma desordem na bicamada lipídica da camada córnea, aumentando o transporte através da mesma. JOHSON *et al.* (1996) indicam que a bicamada lipídica do estrato córneo transforma-se numa fase fluida, facilitando assim a absorção de fármacos. Outro aspecto ponderado por MITRAGOTRI *et al.* (1996) é que a bicamada lipídica produza uma alta resistência a transportes iônicos, e o ultra-som desorganizando o estrato córneo pode reduzir em 30% esta resistência.

Existem várias vantagens na utilização dessa modalidade de tratamento, entre elas a ação localizada da fármaco, com consequência ausência dos efeitos colaterais decorrente de ações sistêmicas, caso o fármaco não tenha este tipo de ação (CHIEN, 1984). Outra vantagem desta forma de tratamento é a somatória dos efeitos inerentes ao ultra-som associados aos efeitos do fármaco (BYL, 1995).

O primeiro relato na literatura sobre fonoforese foi descrito por FELLINGNER e SCHMID (1954), sendo o agente de acoplamento a hidrocortisona, em tratamento de poliartrites da mão. Os medicamentos utilizados na fonoforese são os anestésicos, os antiinflamatórios esteróides e antiinflamatórios não-esteróides (UMPHRED, 1994), além de compostos usados na Fisioterapia Dermato-funcional.

O mecanismo de ação do ultra-som, aumentando a absorção transdérmica do fármaco, ainda não foi totalmente esclarecido, alguns estudos em animais foram realizados, contudo utilizando desenhos mal delineados. GRIFFIN *et al.* (1968), em estudos experimentais com a utilização da hidrocortisona na pele de porcos, relataram um aumento dos níveis de cortisol em músculo e nervo. Eles concluíram que o aumento da potência do ultra-som, tempo de aplicação e concentração do fármaco, aumenta a penetração da hidrocortisona. Esses autores melhoraram a penetração da hidrocortisona, mas de forma incoerente queimaram os animais, este estudo foi conduzido com parâmetros não terapêuticos, portanto estes resultados não podem ter aplicação clínica.

Estudos em humanos, utilizando doses terapêuticas, são controversos. BARE (1996) administrou 10% de hidrocortisona em humanos através da técnica fonoforética, usando parâmetros terapêuticos de ultra-som (1 W/cm², 1Mhz, modo contínuo). Os resultados foram analisados através dos níveis de cortisol no plasma sanguíneo, onde não foram encontrados níveis significantes de cortisol em comparação com o grupo de controle. Contudo, farmacologicamente, não há interesse em aumentar os níveis plasmáticos deste hormônio.

Não se sabe exatamente a influência da frequência do ultra-som no aumento da absorção do fármaco, porém segundo SMITH (1995), se usadas altas frequências (10 e 16 Mhz) com doses relativamente baixas (0,2 W/cm²) será obtida uma maior absorção do fármaco. Outros autores utilizam cerca de 1-3 Mhz e doses mais elevadas, o que dificulta comparações entre os dados obtidos em diferentes trabalhos. Contudo, GRIFFIN *et al.* (1967) trataram 102 pacientes com diagnóstico de epicondilite de cotovelo, tendinite de bíceps, osteoartrite de ombro, bursite de ombro, e osteoartrite de joelho com ultra-som com doses terapêuticas de ultra-som (3Mhz, 1,5 W/cm², modo contínuo) combinado a hidrocortisona e placebo. Dos pacientes que receberam hidrocortisona com ultra-som, 68% mostraram uma marcante diminuição na dor, e um aumento significativo na amplitude de movimento, enquanto que somente 28% dos que receberam ultra-som com placebo mostraram melhora.

Poucos produtos apresentam a característica apropriada para a fonoforese, sendo os géis os tipos mais apropriado de formulação para esta terapia (BENSON, 1991). Os achados desses estudos indicam que existe grande variação nos coeficientes de transmissão nas diferentes preparações farmacológicas tópicas. Embora cientificamente não comprovado, parece coerente que somente alguns produtos com boas características de transmissão ultra-sônica possuem condições físicas necessárias para a fonoforese, sendo que as preparações tópicas com baixo índice de transmissão podem diminuir a efetividade da terapia ultra-sônica.

Em seu artigo de revisão sobre fonoforese BYL (1995) descreve que 75% dos resultados obtidos nas pesquisas confirmam a efetividade do método. Alguns estudos cujos resultados são considerados desfavoráveis devem ser analisados com muito critério, pois apresentam ausência de controle, falta de calibração do equipamento, falta de observação sobre a transmissibilidade da droga etc. Poucos estudos descrevem o efeito do ultra-som sobre a estrutura química dos medicamentos usados na fonoforese. Embora haja a sugestão de que raramente o ultra-som influencia em mudanças químicas na molécula das drogas (TYLE, 1989). Não há um consenso de protocolo padrão em relação à aplicação do ultra-som. Há um limitado número de publicações na área e os dados obtidos são bastante conflitantes.

Nossa hipótese de trabalho foi que o ultra-som *per se* aumentaria o limiar de dor em modelo animal de dor e inflamação. Além de que, a exposição às ondas sônicas poderia alterar a estrutura química dos fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral foi avaliar os efeitos do ultra-som sobre a estrutura química e eficácia de medicamentos aplicados topicamente, a fonoforese, sobre a nocicepção e a inflamação.

2.2. Objetivos específicos

Analisar o efeito do ultra-som, a onda sônica pulsada e contínua, sobre a estrutura química de fármacos utilizados na Fisioterapia Dermatofuncional, Traumatológica e Reumatológica.

Os métodos, resultados obtidos e discussão constam no Capítulo I.

Avaliar o efeito antinociceptivo (analgésico) do ultra-som contínuo e do ultra-som pulsado, utilizando modelos animais.

Os métodos, resultados obtidos e discussão constam no Capítulo II.

Avaliar o efeito da fonoforese com ultra-som contínuo e fonoforese com som pulsado, utilizando antiinflamatório padrão e extratos vegetais.

3 CAPÍTULOS

3.1. Capítulo I

Efeito do Ultra-som Pulsado e Contínuo sobre a Estrutura Química de Fármacos utilizados na Fisioterapia Dermatofuncional, Traumatológica e Reumatológica

SUBMISSION CONFIRMATION

Thank you for submitting your manuscript to Physical Therapy.

Manuscript ID: PTJ-2008-0122

Title: Characterization of dexamethasone, sodium diclofenac and rutin
behaviour exposed to pulsed and continuous ultrasound

Authors: Barnes, Dênis
Bianchetti, Paula
Sbaraini, Sabrina
Stülp, Simone
Siqueira, Ionara
Date Submitted: 22-Apr-2008

PHYSICAL THERAPY

Characterization of dexamethasone, sodium diclofenac and rutin behaviour exposed to pulsed and continuous ultrasound

Dênis Barnes¹, Paula Bianchetti², Sabrina Sbaraini², Simone Stülp^{1,3}, Ionara Rodrigues Siqueira^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Centro Universitário UNIVATES, Rua Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, Rio Grande do Sul

²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário UNIVATES, Rua Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, Rio Grande do Sul

³Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário UNIVATES, Rua Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, Rio Grande do Sul

⁴Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Ionara Rodrigues Siqueira, PhD, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; E-mail: ionara@ufrgs.br

Abstract

The ultrasound has been used to increase transdermal penetration of medications, so-called phonophoresis. Phonophoresis has been applied with several anti-inflammatory drugs, such as sodium diclofenac and dexamethasone, and has been associated to esthetic treatments. Our aim was to study the effect of ultrasound exposure on structural molecules of compounds used in phonophoresis treatment, dexamethasone, sodium diclofenac and rutin in aqueous solutions, measuring the absorption spectra. We used different ultrasound protocols, pulsed or continuous mode. To model the pulsed mode the duty cycle was 5% or 20%; the intensity was 0.4 and 0.8 W/cm² at 5% or 0.8 W/cm² at 20% with a frequency of 100 Hz with a 1 MHz frequency transducer. The UV/Visible spectra was obtained. The temperature, pH and electrical conductivity were also determined. Sodium diclofenac and dexamethasone significantly increased *per se* the conductivity, since they are ionic aqueous solutions, while the rutin is a solution with covalent interactions. Continuous ultrasound altered conductivity and temperature of sodium diclofenac solution. The conductivity was significantly increased on pulsed and continuous ultrasound from rutin solution. The application of continuous ultrasound resulted in a significant increase in temperature from all solutions. Pulsed or continuous ultrasound did not alter any UV/visible spectrum. Our results about UV/visible spectra suggest an absence of degradation by ultrasound of these compounds used in phonophoresis, dexamethasone, sodium diclofenac and rutin. These data are relevant, since biological activity from compounds is directly related to structure of molecules.

KEYWORDS: Phonophoresis, Sodium Diclofenac, Dexamethasone, Rutin, Ultrasound, Physical Stability, Electric Conductivity, Temperature

Ultrasound has been used in physical therapy. There is an increasing interest in the use of ultrasound, since it is a noninvasive and safe method. It has also been used to enhance transdermal penetration of medications, the so-called phonophoresis, defined as the enhancement of absorption of medication through the normal skin by ultrasound irradiation. Phonophoresis has been studied with several anti-inflammatory drugs, such as sodium diclofenac^{1,2}, dexamethasone^{3,4}, hydrocortisone⁵, ketoprofen⁶ and salicylates⁷.

Sodium diclofenac, one of the topical antiinflammatory medications most extensively used in physiotherapy and sports medicine practice⁸, was chosen for the experiment. Oral or parenteral administration with antiinflammatory drugs like diclofenac is associated with a undesirable side effects such as gastritis or gastric and duodenal ulcers⁹. Dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, is a strong anti-inflammatory drug that the parenteral and oral routes of administration have disadvantages, particularly in children. Treatment with higher glucocorticoid dosages over longer periods of time causes adverse reactions, such as unwanted effects on bone tissue (osteoporosis), metabolism (diabetes), eyes and skin¹⁰. The use of phonophoresis with diclofenac or dexamethasone could prevent their adverse effects, since it might provide the therapeutic dosage at the injured area.

There is also a great deal of interest in phonophoresis to cosmetic/esthetic treatments¹¹, for example, plant extracts such as *Ginkgo biloba* and *Camelia sinensis* (green tea), and compounds of botanical origin, such as caffeine for treatment of lipodystrophy^{12, 13}.

Extracts from *Ginkgo biloba* leaves have anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory properties and have been clinically investigated in various conditions, including cutaneous disorders^{14,15}. Rutin, epicatechin, catechin, apigenin, luteolin, and quercetin are important flavonoids in *Ginkgo biloba* L.¹⁶.

Phonophoresis with administration of various compounds has recently been applied, but there is no data in literature about parameters that indicate the influence of ultrasound waves on physical stability of the formulation or about the influence of compounds on ultrasound waves conduction.

Considering that there is a lack of scientific evidence for safe and efficient ultrasound exposure associated to topically applied substances, our purpose was to investigate the effect of ultrasound exposure on structural molecules of compounds used in phonophoresis treatment, dexamethasone, sodium diclofenac and rutin in aqueous solutions measuring the absorption spectra of molecules. The influence of time exposure also was studied. As well as, parameters such as pH, electric conductivity, and temperature changes were measured.

Methods

The ultrasound used was pulsed or continuous mode. A therapeutic ultrasound machine type HTM model sonic compact was used, adequately calibrated before the use. The transducer was immersed in compounds solutions. We used disodium phosphate dexamethasone (Decadron®, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.), sodium diclofenac (Biosintética) and rutin (Sigma). The degradation of sodium diclofenac (0.2%), disodium phosphate dexamethasone (0.2%), rutin (0.002%), which is a compound of *Ginkgo biloba*, in aqueous solutions exposed to ultrasound was investigated. Solutions were exposed to either continuous wave and pulsed therapeutic exposure conditions, specially in phonophoresis.

The ultrasound parameters used for each active intervention group consisted of the intensities of 0.4 or 0.8 W/cm² with a frequency of 100 Hz with a 1 MHz frequency transducer. We used different ultrasound protocols, pulsed or continuous mode. To model the pulsed mode the duty cycle was 5% or 20%; the intensity at each duty cycle was 0.4 and 0.8 at 5% or 0.8 at 20%. Aliquots (one ml) were removed immediately before (0) and at 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 and 20 minutes after ultrasound exposition. The UV/Visible spectra were obtained in a Perkin Elmer Lambda 25 UV/Visible Spectrophotometer scanning between 190 and 1100 nm. The procedure was repeated three times for each solution and ultrasound parameter¹⁷.

The temperature, pH and electrical conductivity were determined. pH measurements were performed potentiometrically using a pHmeter (Digimed DM-20). Electrical conductivity was measured with specific electrical conductivity (κ) < 1 μ S/cm using a conductimeter Oakton.

The results were analyzed using Student's t-test ou ANOVA followed by the Duncan. Results are expressed as mean (SD). Data were also analyzed statistically using Pearson correlation coefficients.

Results

UV/visible spectrum, electrical conductivity, temperature and pH from sodium diclofenac, dexamethasone, and rutin solutions were evaluated. ANOVA indicates that diclofenac solution and dexamethasone dissolved, without US exposure, increased conductivity of water (Figure 1, $F_{(3,40)} = 65.2047$, $p < 0.0001$) and that rutin decreased pH values (data not shown, $F_{(3,40)} = 13.2160$, $p < 0.0001$). Indeed, the effect of disodium phosphate dexamethasone solution was more effective than sodium diclofenac on conductivity.

The effect of US about electrical conductivity (Figure 2), temperature (Figure 3) and pH (data not shown) from solutions were also studied.

UV/visible spectrum of sodium diclofenac solution (0.2%) did not change by exposition to both pulsed or continuous ultrasound (Figure 4). One peak wavelength, at 276 nm, was observed and practically no absorption is observed above 320 nm. The peak in 276 nm is typical of the diclofenac molecule¹⁸. Twenty minutes of pulsed US did not alter any parameters studied, electrical conductivity (Figure 2), temperature (Figure 3) and pH (data not shown) of sodium diclofenac solution, while continuous US changed both electrical conductivity (Figure 2) and temperature (Figure 3) parameters (Student's t-test, $p = 0.036$ and 0.014 , respectively).

Pulsed and continuous US did not alter the UV/visible spectrum of dexamethasone (0.2%) (Figure 5). One peak wavelength, at 240 nm, was observed, this wavelength is typical of the dexamethasone molecule¹⁹, and practically no absorption is observed above 280 nm. Pulsed or continuous US exposition did not alter the electrical conductivity (Figure 2) and the pH values from dexamethasone solution. The continuous US increased the temperature of this solution (Figure 3; Student's t-test, $p = 0.0031$).

The UV/visible spectrum of rutin (0.002%) was unaltered by pulsed and continuous exposition (Figure 6). Rutin exhibits two characteristic absorption bands of flavonoid compounds at 255 nm and 352 nm^{20,21}. The pH of rutin solution was unchanged by pulsed and continuous US (Student's t-test, $p = 0.35$ and 0.58 , respectively). The application of continuous ultrasound resulted in a significant increase in temperature (Figure 3; Student's t-test, $p = 0.00024$) in this solution. While the electrical conductivity (Figure 2) was significantly increased on both ultrasound modes, pulsed and continuous (Student's t-test, $p = 0.038$ and 0.033 , respectively).

The conductivity was positive and significantly correlated with the temperature of sodium diclofenac solution. Pearson correlation coefficients were 0.7686 ($p = 0.043$), 0.8337 ($p = 0.020$), 0.8799 ($p = 0.009$) and 0.8588 ($p = 0.028$), respectively, from pulsed (0 min), pulsed (20 min) and continuous (0 min) US exposure.

Pearson correlation coefficients between temperature and conductivity of dexamethasone solution were 0.8498 ($p = 0.032$), 0.8179 ($p = 0.047$), 0.9693 ($p = 0.001$), 0.8588 ($p = 0.028$) from pulsed (0 min), pulsed (20 min), continuous (0 min) and continuous (20 min) US, respectively, indicating a positive and significant correlation between the temperature and conductivity parameters. Interestingly, we found a lack of correlation between temperature and conductivity of rutin solution.

Discussion

We found as expected that continuous US increase the temperature of all tested solutions. Some authors have demonstrated an increase in skin temperature *in vitro*²². However other works have reported greater increases in temperature^{23, 24}.

Thermal effects of US have been considered, and can enhance the diffusion of topically applied molecules. Heating may increase the kinetic energy of the applied molecules and in the cell membrane, dilate hair follicles and the sweat glands, and increase the skin blood flux²⁵. The rise in temperature may be one of the major factors which can explain the increase in percutaneous absorption in the frequency in continuous mode.

Interestingly, sodium diclofenac and dexamethasone increased per se the conductivity. The ultrasound radiation promotes agitation in the system²⁶, and physical effects of cavitation (including acoustic streaming)²⁷. Mass transport is greatly increased via ultrasound radiation^{28,29}, and these effects in ionic aqueous solution, as sodium diclofenac and disodium phosphate dexamethasone solutions, are observed.

In contrast, the lowest conductivity observed was rutin samples compared to sodium diclofenac and dexamethasone. The rutin solution is a molecular solution with covalent interactions, and lower conductivity values are expected. Although, both US intensities, pulsed and continuous, increased significantly the conductivity of rutin solution.

Indeed, the correlation between temperature and electrical conductivity values was confirmed in both sodium diclofenac and dexamethasone, although this pattern was not observed in rutin solutions.

It is important to study the effects of ultrasound exposure on structural molecules of compounds, considering that the biological activity is directly dependent of the absence of degradation in the conditions used besides percutaneous absorption. Our results about UV/visible spectra are in agreement with literature, since there are reports showing an absence of degradation by US of other compounds, such as fentanyl and caffeine¹².

Acknowledgments

We gratefully acknowledge financial support by UNIVATES.

References

- 1 Hsieh YL. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory pain relief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. *Phys. Ther.* 2006; 86:39-49.

2 Rosim GC, Barbieri CH, Lanças FM, Mazzer N. Diclofenac phonophoresis in human volunteers. *Ultrasound Med Biol.* 2005; 31:337-343.

3 Darrow H, Schulthies S, Draper D, Ricard M, Measom GJ. Serum Dexamethasone Levels After Decadron Phonophoresis. *J Athl Train.* 1999; 34: 338-341.

4 Saliba S, Mistry DJ, Perrin DH, Gieck J, Weltman A. Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing. *J Athl Train.* 2007; 42: 349–354.

5 Meidan VM, Docker M, Walmsley AD, Irwin WJ. Low intensity ultrasound as a probe to elucidate the relative follicular contribution to total transdermal absorption. *Pharm Res.* 1998; 15: 85-92.

6 Cagnie B, Vinck E, Rimbaut S, Vanderstraeten G. Phonophoresis versus topical application of ketoprofen: comparison between tissue and plasma levels. *Phys Ther.* 2003; 83: 707-712.

7 Ciccone CD, Leggin BG, Callamaro JJ. Effects of ultrasound and trolamine salicylate phonophoresis on delayed-onset muscle soreness. *Phys Ther.* 1991;71:666–678.

8 El-Hadidi T, El-Garf A. Double-blind study comparing the use of Voltaren Emulgel versus regular gel during ultrasonic sessions in the treatment of localized traumatic and rheumatic painful conditions. *J Int Med Res.* 1991; 19: 219-227.

9 Müller M, Mascher H, Kikuta C, Schäfer S, Brunner M, Dorner G, Eichler HG. Diclofenac concentrations in defined tissue layers after topical administration. *Clin Pharmacol Ther.* 1997; 62: 293-299.

10 Schacke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96: 23-43.

11 Morganti P, Ruocco E, Wolf R , Ruocco V. Percutaneous Absorption and Delivery Systems. *Clin Dermatol.* 2001; 19: 489–501.

12 Boucaud A, Machet L, Arbeille B, Machet MC, Sournac M, Mavon A, Patat F, Vaillant L. In vitro study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. *Int J Pharm.* 2001; 228: 69-77.

13 Monti D, Giannelli R, Chetoni P, Burgalassi S. Comparison of the effect of ultrasound on transdermal permeation of caffeine and morphine through hairless mouse skin in vitro. *Int J Pharm* 2001; 229: 131-137.

14 Chung KF, Dent G, McCusker M, Guinot P, Page CP, Barnes PJ. Effect of ginkgolide mixture (BN 52063) in antagonising skin and platelet responses to platelet-activating factor in man. *Lancet* 1987; 1(8527): 248-251.

15 Kim SJ, Lim MH, Won YH. Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast. *Skin Pharmacol.* 1997; 10: 200–205.

16 Cao Y, Chu Q, Fang Y, Ye J. Analysis of flavonoids in *Ginkgo biloba* L. and its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal Bioanal Chem.* 2002; 374: 294–299.

17 Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validation for Chromatographic and Electrophoretic Methods. *Quim. Nova.* 2004; 27: 771-780.

18 Abdoh A, Zughul MB, Eric J, Davies D, Badwan AA. Inclusion complexation of diclofenac with natural and modified cyclodextrins explored through phase solubility, ¹H-NMR and molecular modeling studies, *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2007; 57: 503–510.

19 Pargaonkar N, Lvov YM, Li N, Steenekamp JH, de Villiers MM. Controlled Release of Dexamethasone from Microcapsules Produced by Polyelectrolyte Layer-by-Layer Nanoassembly. *Pharm Res.* 2005; 22: 826-835.

20 Verza SG, Kreinecker MT, Reis V, Henriques AT, Ortega GG. Evaluation of Analytical Variables of the Folin-Ciocalteu Method for the Quantitation of the Total Tannins Content Using a *Psidium guajava* L. Leaves Aqueous Extract as a Model. *Quim. Nova.* 2007; 30: 815-820.

21 He JB, Jin GP, Chen QZ, Wang Y. A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid. *Anal Chim Acta*. 2007; 585: 337-343.

22 Mitragotri S, Edwards DA, Blankschtein D, Langer R. A mechanistic study of ultrasonically-enhanced transdermal drug delivery. *J Pharm Sci*. 1995; 84: 697-706.

23 Brucks R, Nanavaty M, Jung D, Siegel F. The effect of ultrasound on the in vitro penetration of ibuprofen through human epidermis. *Pharm Res*. 1989; 6: 697-701.

24 Miyazaki S, Mizuoka H, Kohata Y, Takada M. External control of drug release and penetration. VI. Enhancing effect of ultrasound on the transdermal absorption of indomethacin from an ointment in rats. *Chem Pharm Bull* 1992; 40: 2826-2830.

25 Byl NN. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. *Phys Ther*. 1995; 75: 539-553.

26 Péres VP, Saffi J, Melecchi MIS, Abad FC, Jacques RA, Martinez MM, Oliveira EC, Caramão EB. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. *J Chromatogr A*. 2006; 1105: 115-118.

27 Capote FP, de Castro MDL. Ultrasound in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 387: 249-257.

28 Garbellini GS, Salazar-Banda GR, Avaca LA. Sonovoltammetric determination of 4-Nitrophenol on Diamond Electrodes. *J Braz Chem Soc*. 2007; 28: 1095-1099.

29 Garbellini GS, Salazar-Banda GR, Avaca LA. Ultrasound applications in electrochemical systems: Theoretical and Experimental Aspects. *Quim. Nova*. 2008; 31: 123-133.

Figure legends

Figure 1. Electrical conductivity before US exposure from distilled water, dexamethasone, sodium diclofenac and rutin solutions. ANOVA followed by the Duncan, $p < 0.05$.

Figure 2. Electrical conductivity from dexamethasone, sodium diclofenac and rutin solutions exposed to pulsed or continuous ultrasound. ANOVA followed by the Duncan, $p < 0.05$.

Figure 3. Temperature ($^{\circ}\text{C}$) from dexamethasone, sodium diclofenac and rutin solutions exposed to pulsed or continuous ultrasound. ANOVA followed by the Duncan, $p < 0.05$.

Figure 4. UV/visible spectrum of Sodium Diclofenac solution (0.2%) exposed to pulsed (Panel A) or continuous (Panel B) ultrasound.

Figure 5. UV/visible spectrum of Dexamethasone solution (0.2%) exposed to pulsed (Panel A) or continuous (Panel B) ultrasound.

Figure 6. UV/visible spectrum of Rutin (0.002%) exposed to pulsed (Panel A) or continuous (Panel B) ultrasound.

Figure 1

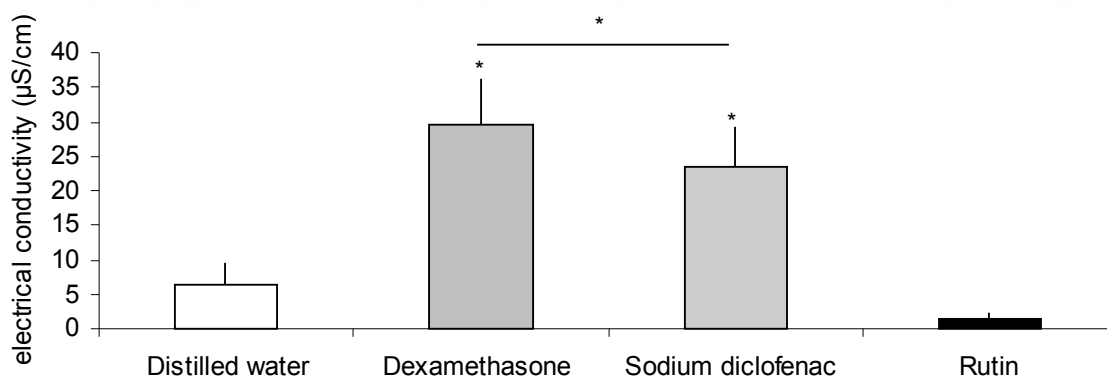


Figure 2

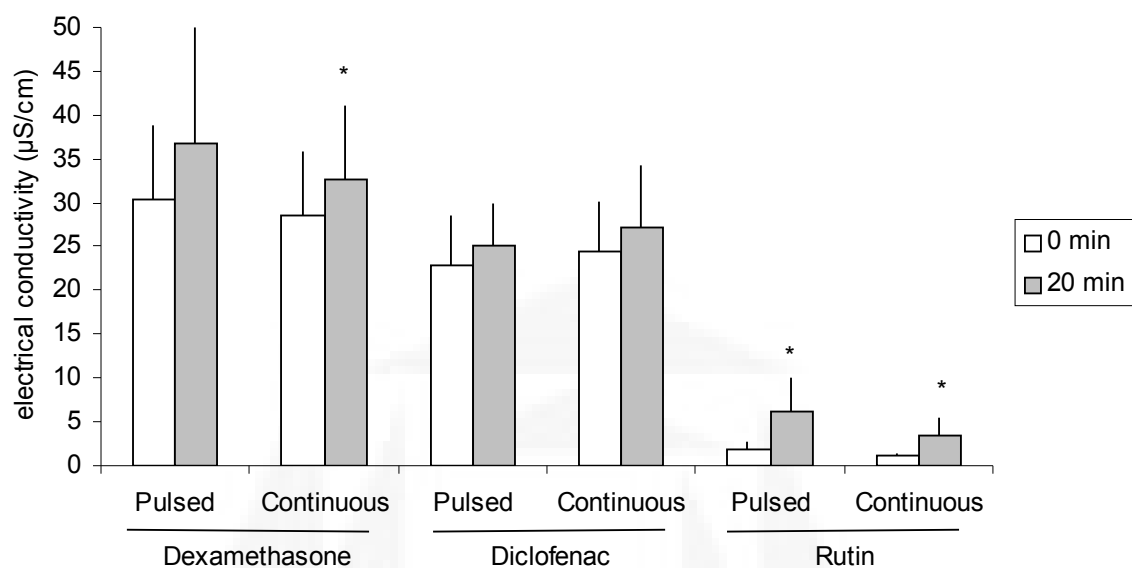


Figure 3

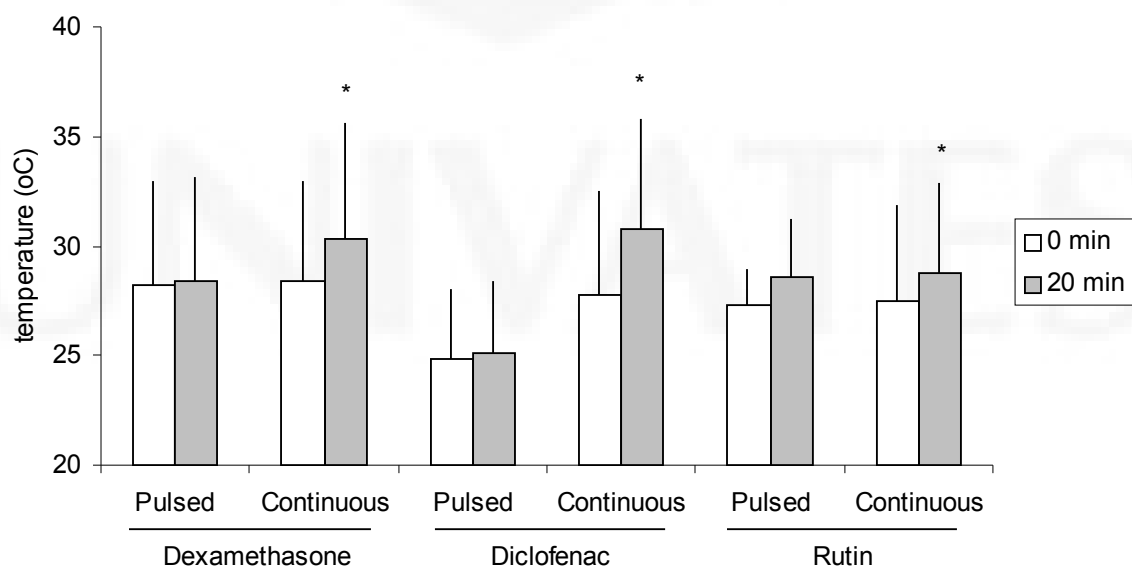


Figure 4A

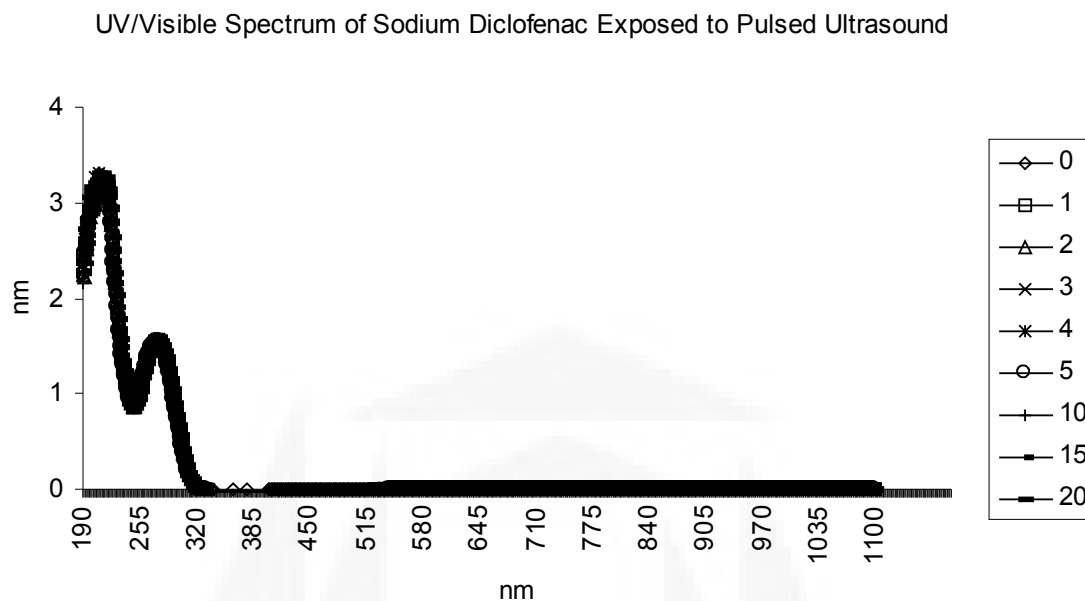


Figure 4B

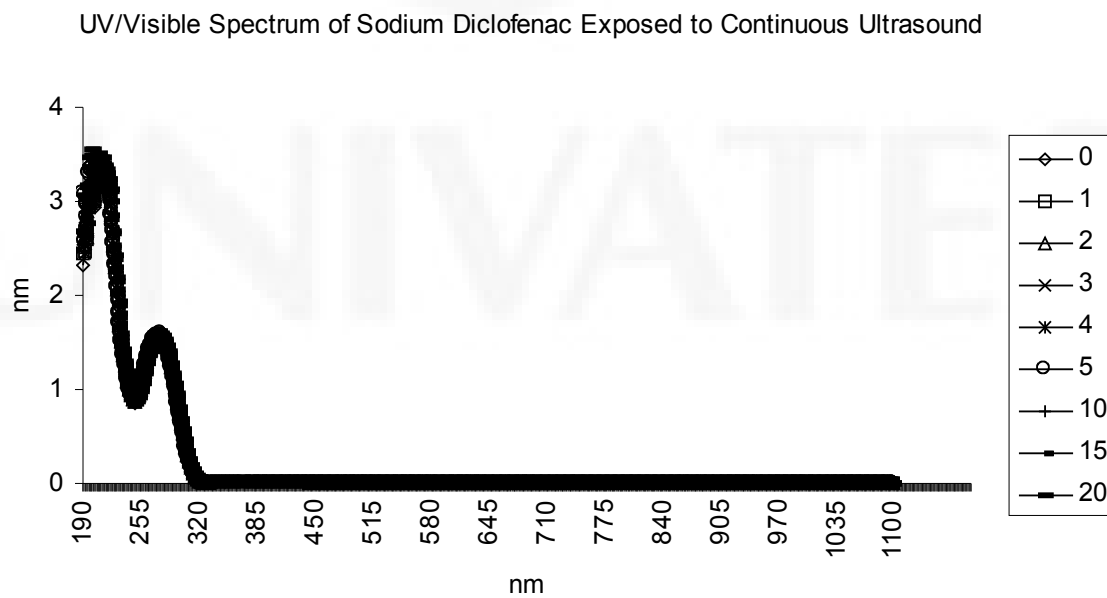


Figure 5A

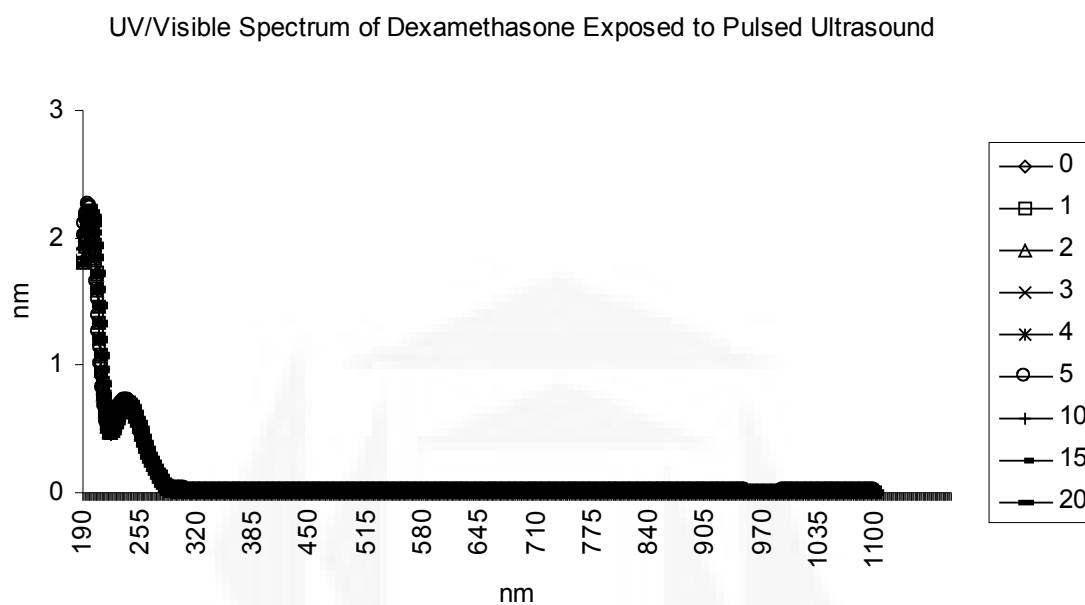


Figure 5B

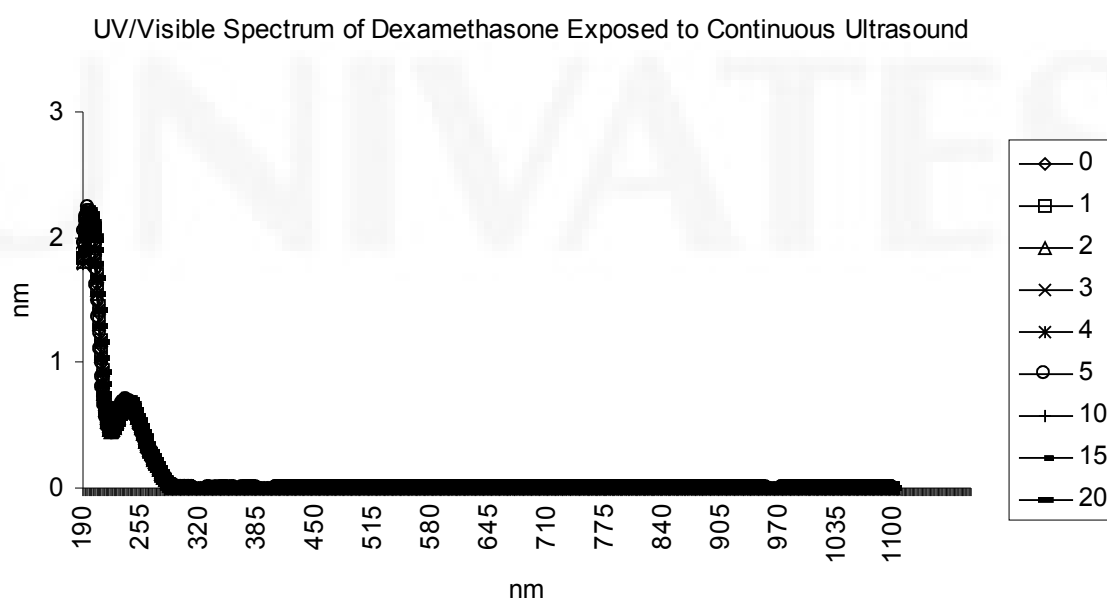


Figure 6A

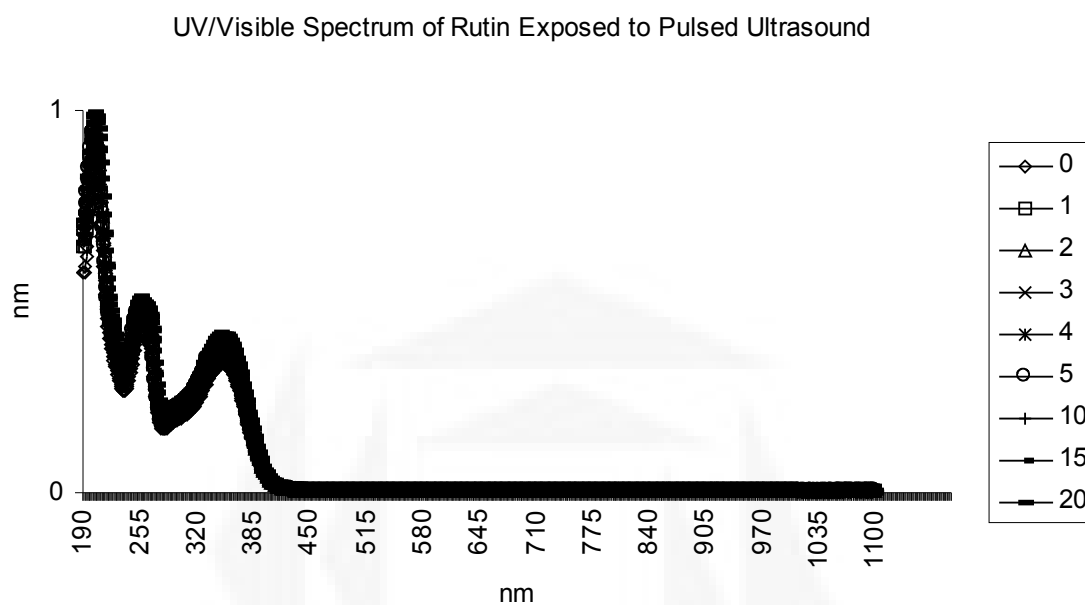
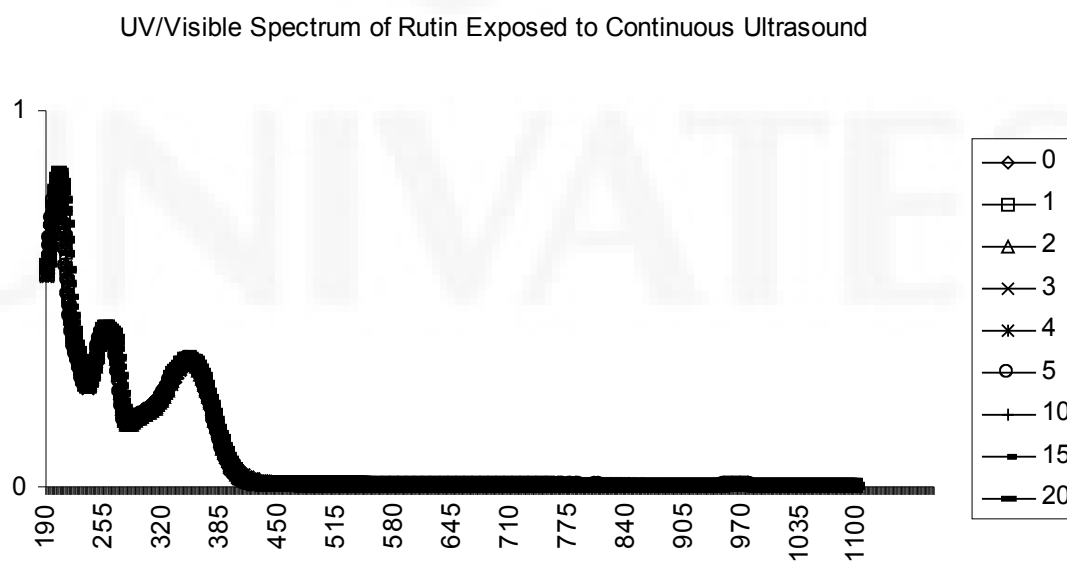
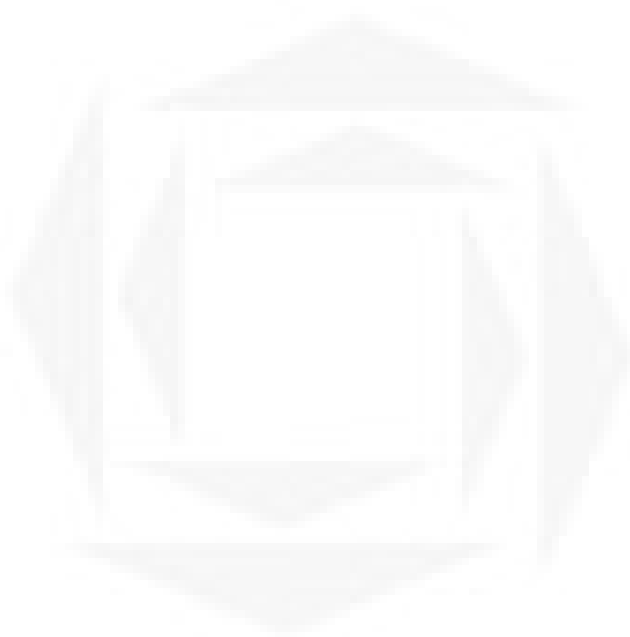


Figure 6B



3.2 Capítulo II

Avaliação das atividades antinociceptivas (analgésica) do ultra-som contínuo e do ultra-som pulsado e antiinflamatória do modo pulsado utilizando modelos animais



UNIVATES

Data: 14 Apr 2008 03:09:39 +0100 [13-04-2008 23:09:39 BRT]

De: Life Sciences <lifesci@elsevier.com>

Para: ionara@ufrgs.br

Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr. Siqueira,

Your submission entitled "Antinociceptive and anti-inflammatory properties of continuous and pulsed ultrasound in animal models" has been received by Life Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences

LIFE SCIENCES

Antinociceptive and anti-inflammatory properties of continuous and pulsed ultrasound in animal models

Paula Bianchetti¹, Dênis Barnes³, Sabrina Sbaraini¹, Simone Stülp^{2,3}, Ionara Rodrigues Siqueira^{3,4}

1 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário UNIVATES, Rua Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, Rio Grande do Sul

2 Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário UNIVATES, Rua Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, Rio Grande do Sul

3 Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Centro Universitário UNIVATES, Rua Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, Rio Grande do Sul

4 Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Profa. Ionara Rodrigues Siqueira, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; E-mail: ionara@ufrgs.br.

Abstract

Ultrasound has been used in physical therapy. It has been suggested that there is a lack of scientific evidences on the clinical efficacy of ultrasound. Our aim was to investigate the effect of therapeutic ultrasound in animal models, specifically on cottonpellet granuloma test, a chronic inflammatory model, and on formalin test, a

nociceptive model, using mice. The ultrasound used was pulsed or continuous mode. The ultrasound treatment was applied acutely to paw in formalin test or chronically in cotton-pellet granuloma test. The animals were randomized the following groups: without micromassage, micromassage, pulsed and continuous ultrasound. The ultrasound parameters used was the intensities of 0.4 or 0.8 W/cm² with a frequency of 100 Hz with a 1 MHz frequency transducer. To model the pulsed mode the duty cycle was 5% or 20%; the intensity at each duty cycle was 0.4 and 0.8 at 5% or 0.8 at 20%. The subcutaneous injection of diluted formalin in the mice paw induces a biphasic response. Continuous and pulsed ultrasound were ineffective in reducing the licking time on the first, that result of direct chemical activation of nociceptive primary afferent fibers, and the second phase, involved to inflammatory conditions, of the formalin test. The effect of ultrasound on chronic inflammation was evaluated using cotton-pellet granuloma test. Chronic ultrasound was ineffective in inhibiting the growth of granuloma tissue. Our data suggest that the used therapeutic ultrasound protocols did not cause any antinociceptive activity and antiinflammatory effect on chronic inflammatory model.

Keywords: therapeutic ultrasound; pulsed ultrasound; continuous ultrasound; chronic inflammatory process; nociception; pain; formalin test; cotton-pellet granuloma test; mice.

Introduction

Ultrasound has been used in physical therapy. There is an increasing interest in the use of ultrasound (US), since it is a noninvasive and safe method (Robertson and Spurrirt 1998). It has been demonstrated that some patients have a significant benefit (Holdsworth and Anderson, 1993). However, it has been suggested that there is a lack of scientific evidences on the clinical efficacy of ultrasound (Leung et al., 2004). The effects of therapeutic ultrasound can be classified as thermal effects and non thermal, such cavitation (Kramer, 1984). Indeed, Hsieh (2006) suggest that ultrasound therapy may have central effect, modulating the pain at spinal cord level.

Studies have shown that US therapy can effectively reduce the number of painful and swollen joints in patients with rheumatoid arthritis (Casimiro et al. 2002), epicondylalgia (Aldes, 1956), painful shoulder (Munting, 1978), and musculoskeletal inflammatory pain (Gam and Johannsen, 1995). Frequently the failures to randomise treatment and the lack of adequate controls have cast doubt on their conclusions (Binder et al., 1985). There are reports describing that pain was unchanged by ultrasound therapy (Downing and Weinstein 1986; van der Heijden et al., 1999; Nykänen, 1995). It is interesting to cite that several authors have suggested a placebo effect of ultrasound (Binder et al., 1985, Hashish et al., 1988, Ludeberg et al., 1985). The rationale for the ultrasound use in inflammatory conditions of soft tissue, for example, ligaments and tendons, seems be based on reduction of inflammatory process and acceleration of tissue repair, resulting in an increase in the pain threshold (van der Heijden et al., 1999). Indeed, ultrasound did not demonstrated an antiinflammatory action in a rat model (Goddard et al., 1993) and seems increase the inflammatory process in a rat ligament model (Leung et al., 2004). Considering that there is a lack of scientific evidence for the efficacy of therapeutic ultrasound as an analgesic and antiinflammatory strategies, our purpose was to investigate the effect of therapeutic ultrasound in animal models, specifically on cotton4 pellet granuloma test and on formalin test using mice. To exclude placebo effect, we used animal models since presumably the animais are insensitive to placebo effect. The antinociceptive activity of pulsed and continuous ultrasound was evaluated in formalin test. While, pulsed ultrasound was evaluated in cotton-pellet granuloma test, this test is related to the chronic inflammatory process.

Material and Methods

Animals

CF1 albino male mice (20-30g) were used. The animals were provided by Fundação Estadual de Pesquisa e Produção da Saúde do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, S,Brazil). Animals were maintained under standard conditions (12 h light /12 h dark, temperature 22o C) with food and water ad libitum. This study was conducted with the approval of the Ethics Committee from Centro Universitário UNIVATES.

Ultrasound Protocol

The ultrasound used was pulsed or continuous mode. A therapeutic ultrasound machine type HTM model sonic compact was adequately calibrated before the use. The ultrasound treatment was applied acutely to paw in formalin test or chronically in cotton-pellet granuloma test. The transducer had a radiating area of 3.5 cm² and the treatment area was calculated as 0.35 cm². The transducer was moved slowly and continually during the application period. The ultrasound parameters used for each active intervention group consisted of the intensities of 0.4 or 0.8 W/cm² with a frequency of 100 Hz with a 1 MHz frequency transducer. We used different ultrasound protocols, pulsed or continuous mode. To model the pulsed mode the duty cycle was 5% or 20%; the intensity at each duty cycle was 0.4 and 0.8 W/cm² at 5% or 0.8 at 20%. The animals were randomized the following groups: Without micromassage, where no ultrasound was applied nor was there any contact of the transducer head upon the 5 animals; Micromassage, the technique of US application was performed, but the machine was not switched on, therefore, no ultrasonic waves were emitted into the body; Pulsed, the active ultrasound was applied with 5 or 20% duty cycle; and Continuous, that active ultrasonic irradiation was applied in a continuous mode.

Formalin Test

The used method was previously described by Shibata and colleagues (1989). Mice were allowed to acclimatize for 30 min before any manipulation. Continuous ultrasound, pulsed ultrasound and micromassage ipsilateral were applied, immediately, or 60 minutes before the formalin administration. The ultrasound parameters used was intensity of 0.8 W/cm² and pulsed mode at 20%. The reference drug, morphine (10 mg/kg) was administered (i.p.) to another group 30 min before formalin injection. Twenty ml of 2.5% formalin was injected subcutaneously into the right hind paw of mice; the equal volume of saline was administered in the same region of left hindpaw. The time, in seconds, spent in licking and biting

responses of the injected paw was taken as an indicator of pain response. Responses were measured for 5 min after formalin injection (first phase), induced by local stimulation of the nociceptors, and 15– 30 min after formalin injection, induced by inflammatory processes (second phase).

Cotton-pellet granuloma test

The effect of ultrasound on chronic inflammation was evaluated using cotton-pellet granuloma test in mice (Niemegeers et al., 1975). On day 1, animals were anesthetized under light ether and two autoclaved white cotton pellets (Jonhson & Jonhson®), weighting approximately 10 mg each, were aseptically implanted subcutaneously under previously depilated back. Twenty four hours after implantation of cotton pellets, the mice were treated pulsed ultrasound or micromassage (exposure to ultrasound off) on incision area. The pulsed mode was used to minimize heating (Asano et al., 1997) that would increase the inflammatory process, since thermal effect is usually associated with continuous mode of application and may be a contraindication for inflammation treatment. Dexametazone (i.p., 0.5mg/kg) was used as reference drug. The treatments, saline, dexametazone, placebo ultrasound, ultrasound, were applied once daily for next 6 days. On day 8, animals were killed and cotton pellets were dissected and dried in the overnight at 60oC. The weight of the granulomatous tissue was calculated by the difference between the initial and the final dry weight of the cotton pellets (Njamen ET al., 2003).

Statistical Analysis

Data were analyzed using ANOVA followed by the Tukey–Kramer Multiple Comparisons Test. Results are expressed as mean (SD).

Results

The subcutaneous injection of diluted formalin in the mice paw induces a biphasic response. The ultrasound was unable to induce any effect in this acute pain model (Figure 1). Continuous and pulsed ultrasound were ineffective in reducing the licking time on the first (Figure 1A) and the second phase (Figure 1B) of the formalin test. ANOVA indicates a significant difference between animals that were treated subcutaneously with morphine in the early phase (Figure 1A, $F(7,53)= 10,333$, $p < 0.0001$) and late phase with other groups (Figure 1B, $F(7,53)= 5,667$, $p < 0.0001$). Indeed, no difference between the micromassage and without micromassage groups was found (Figure 1C). The treatment with dexametazone reduced significantly the granulomatous tissue formation (Figure 2, $F(7,63)= 3.376$, $p < 0.01$), while the micromassage or pulsed ultrasound (5 or 20% duty cycle) did not inhibit the growth of granuloma tissue in the cotton pellet granuloma test.

Discussion

Various authors have postulated that ultrasound could be effective in wound healing, inflammation and pain relief (Dyson 1987; Hasson et al. 1990). Our study can contribute to the understanding of the influence of ultrasound on inflammation process, especially because literature has reported that ultrasound has anti-inflammatory properties (Binder et al., 1985) and it has been also reported that ultrasound increase the inflammatory process (Leung et al., 2004). We tested the effect of therapeutic ultrasound on cotton-pellet granuloma test and on formalin test. A number of good animal models representing human pain and inflammation have been described; the used models have been extensively used in our laboratory. The formalin test is an integrated spontaneous pain behavior characteristic of the well-validated inflammatory pain model (Dubuisson and Dennis, 1977). We used an ultrasound protocol which should have employed clinically. It is important to note that formalin nociception is associated with injured tissue; it is believed that it more closely resembles clinical pain in comparison to other tests that employ mechanical or thermal stimuli (Tjolsen et al., 1992). The behavioural response of rodents to the

intraplantar injection of formalin takes place in two phases which seem to depend on different mechanisms since the phases are altered by different drugs. The first phase, characterized as non-inflammatory pain, is the result of direct chemical activation of nociceptive primary afferent fibers (Tjolsen et al., 1992; Abbadie et al., 1997). Drugs with central action inhibit both phases (Shibata et al., 1989, Hunnskaar and Hole, 1987). The ultrasound was unable to affect the formalin induced nociception response on first phase, what may exclude centrally mediated action. Contrary to our

result, Hsieh (2006) affirm that ultrasound therapy may have central effect at spinal cord level. The data also indicate that the ultrasound did not possess antinociceptive action mediated via peripheral mechanism, since ultrasound was unable to decrease the pain behavior in animals submitted to formalin test, in second phase, involved to inflammatory conditions. The second phase is inhibited by anti-inflammatory drugs like indomethacin and naproxen or by 48/80, a histamine and serotonin depletor (Chapman and Dickenson, 1992; Hunnskaar and Hole 1987; Shibata et al. 1989), peripherally acting drugs. Leung and colleagues (2004) affirm that there are conflicting findings on the efficacy of ultrasound on inflammation in animal models or clinical studies. The differences may be due of the different application methods (pulsed or continuous) or intensities, indeed, clinical studies have been realized with different pathologies. Some researchers have suggested that a considerable placebo effect by ultrasound may occur (Binder et al., 1985, Hashish et al., 1988, Ludeberg et al., 1985). It is interesting to comment that a double-blind experimental design indicated that placebo and pulsed ultrasound (20% at 3MHz) significantly reduce the molar removal procedure-induced inflammatory responses. However, no significant difference between the placebo and the real ultrasound groups was found, what may suggest a placebo effect of ultrasound (Hashish et al., 1988). Besides, Binder et al. (1985) demonstrated that the pulsed ultrasound (20% at 1MHz; 1–2W/cm²) and the placebo ultrasound reduce the inflammation and pain of patients with lateral epicondylitis. Goddard and colleagues (1993) described an absence of any anti-inflammatory activity of ultrasound using a rat model. Interestingly, pulsed ultrasound may stimulate inflammation in a rat ligament model (Leung et al., 2004). Leung et al. (2004) demonstrated that pulsed ultrasound at 20% may stimulate inflammation of acute ligament injury, since there were an upregulation of important inflammation mediators, namely prostaglandin E₂ - PGE₂ - and leukotriene B₄ - LTB₄. This result

may suggest that ultrasound would stimulate the formation of macrophage, fibroblast, and endothelium, which are the sources of PGE₂. High PGE₂ levels induce hyperalgesia by sensitizing afferent nociceptors and increase blood flow in rabbit skin and vascular permeability, which contribute to inflammatory response. Although Leung and colleagues (2004) affirm that their findings are in agreement with Goddard and colleagues (1993), these authors demonstrated that ultrasound did not alter any inflammatory parameters in a rat model. They found that the groups receiving ultrasound treatments showed significantly more inflammation than the flurbiprofen group, as indicated by an increased protein exudates in the extracellular matrix, but did not differ comparing to placebo ultrasound. Our results are in agreement with Hsieh (2005; 2006), that demonstrated that the treatment with pulsed ultrasound was ineffective in reducing edema induced by rat intra-articular injection of complete Freund adjuvant. The chronic ultrasound was ineffective in inhibiting the growth of granuloma tissue in the cotton pellet granuloma test, indicating the lack of anti-proliferative effect. To our knowledge, this is the first report evaluating ultrasound effects on granulomatous tissue formation, what is related to the chronic inflammatory process. Chronic inflammation includes a proliferation of fibroblasts and infiltration of neutrophils with exudation of fluid. It occurs by means of development of proliferative cells which can either spread or form granuloma (Cotran et al., 1999). The ability of the treatments to inhibit granulomatous inflammation indicates that it may reduce macrophage and lymphocyte accumulation. Generally these activated cells migrate to inflammatory sites in response to chemotactic stimulus (Cotran et al., 1999; Wagner and Roth, 2000). It is interesting to cite that various reports suggest that ultrasound is able on chronic wound, where an inflammatory response might be initiated, activating and promoting the healing process, although this effect would induce an increase in inflammation signals. The results about effect of ultrasound improving the healing rate of chronic wounds is conflicting, there are data demonstrating the improving of healing rates by ultrasound (Flemming and Cullum, 2000) and no helpful effects (Eriksson et al. 1991; Johannsen et al. 1998). In conclusion, our results suggest that the used therapeutic ultrasound protocols did not cause a significant antinociceptive activity, evaluated in formalin test, and antiinflammatory effect on chronic inflammatory model, the cotton-pellet granuloma test.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge financial support by UNIVATES.

References

- Abbadie, C., Taylor, B.K., Peterson, M.A., Basbaum, A., 1997. Differential contribution of the two phases of the formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanyl and lidocaine. *Pain* 69, 101-110.
- Aldes, J.H., 1956. Ultrasonic radiation in the treatment of epicondylitis. *Gen. Practitioner* 13, 89-96.
- Asano, J., Suisha, F., Takada, M., Kawasaki, N., Miyazaki, S., 1997. Effect of pulsed output ultrasound on the transdermal absorption of indomethacin from an ointment in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 20, 288-291.
- Binder, A., Hodge, G., Greenwood, A.M., Hazleman, B.L., Page Thomas D.P., 1985. Is therapeutic ultrasound effective in treating soft tissue lesions? *British Medical Journal* 290(6467), 512-514.
- Casimiro, L., Brosseau, L., Robinson, V, Milne, S., Judd, M., Wells, G., Tugwell, P., Shea, B., 2002. Therapeutic US for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systemic Reviews* 3, 3787.
- Chapman, V., Dickenson, A.H., 1992. The effects of sandostatin and somatostatin on nociceptive transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuropeptides* 23, 147-152.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T., 1999. *Robbin's Pathological Basis of Disease*, sixth ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 54–92. 11

Downing, D.S., Weinstein, A., 1986. Ultrasound therapy of subacromial bursitis. A double blind trial. *Physical Therapy* 66, 194-149.

Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-174.

Dyson, M., 1987. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 73, 116–120.

Eriksson, S.V., Lundeberg, T., Malm, M., 1991. A placebo controlled trial of ultrasound therapy in chronic leg ulceration. *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine* 23, 211-213.

Flemming, K., Cullum, N., 2000. Therapeutic ultrasound for pressure sores. *Cochrane Database of Systemic Reviews* 4, CD001275.

Gam, A.N., Johannsen, F., 1995. Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: a meta-analysis. *Pain* 63, 85-91.

Hashish, I., Hai, H.K., Harvey, W., Feinmann, C., Harris, M., 1988. Reduction of postoperative pain and swelling by ultrasound treatment: a placebo effect. *Pain* 33, 303-311.

Hasson, S., Mundorf, R., Barnes, W., Williams, J., Fujii, M., 1990. Effect of pulsed ultrasound versus placebo on muscle soreness perception and muscular performance. *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine* 22, 199-205.

Holdsworth, L.K., Anderson, D.M., 1993. Effectiveness of ultrasound used with a hydrocortisone coupling medium or epicondylitis clasp to treat lateral epicondylitis: pilot study. *Physiotherapy* 79, 19-25.

Hsieh, Y.L., 2005. Reduction in induced pain by ultrasound may be caused by altered expression of spinal neuronal nitric oxide synthase-producing neurons. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 86, 1311-1317. 12

Hsieh, Y.L., 2006. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory pain relief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. *Physical Therapy* 86, 39-49.

Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103-114.

Johannsen, F., Gam, A.N., Karlsmark, T., 1998. Ultrasound therapy in chronic leg ulceration: a meta-analysis. *Wound Repair and Regeneration* 6(2), 121-126.

Leung, M.C., Ng, G.Y., Yip, K.K., 2004. Effect of ultrasound on acute inflammation of transected medial collateral ligaments. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 85, 963-966.

Kramer, J.F., 1984. Ultrasound: evaluation of its mechanical and thermal effects. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 65(5), 223-227.

Lundeberg, T., Ekblom, A., Hansson, P., 1985. Relief of sinus pain by vibratory stimulation. *Ear Nose & Throat Journal* 64, 163-167.

Munting, E., 1978. Ultrasonic therapy for painful shoulders. *Physiotherapy* 64, 180-181.

Niemegeers, C.J., Van Bruggen, W., Awouters, F., Janssen, P.A., 1975. The effects of suprofen in rats with implanted cotton pellets. *Arzneimittelforschung* 25, 1524-1526.

Njamen, D., Talla, E., Mbafor, J.T., Fomum, Z.T., Kamanyi, A., Mbanya, J.C., Cerdá-Nicolás, M., Giner, R.M., Recio, M.C., Ríos, J.L., 2003. Anti-inflammatory activity of

erycristagallin, a pterocarpene from *Erythrina mildbraedii*. European Journal of Pharmacology 468, 67-74.

Nykänen, M., 1995. Pulsed ultrasound treatment of the painful shoulder a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine 27, 105-108.

Robertson, V.J., Spurrirt, D., 1998. Electrophysical agents: implications of their availability and use in undergraduate clinical placements. Australian Journal of Physiotherapy 84, 335-344. 13

Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. Pain 38, 347-352.

Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. Pain 51(1), 5-17.

Van Der Heijden, G.J., Leffers, P., Wolters, P.J., Verheijden, J.J., van Mameren, H., Houben, J.P., Bouter, L.M., Knipschild, P.G., 1999. No effect of bipolar interferential electrotherapy and pulsed ultrasound for soft tissue shoulder disorders: a randomised controlled trial. Annals of Rheumatic Disease 58(9), 530-540.

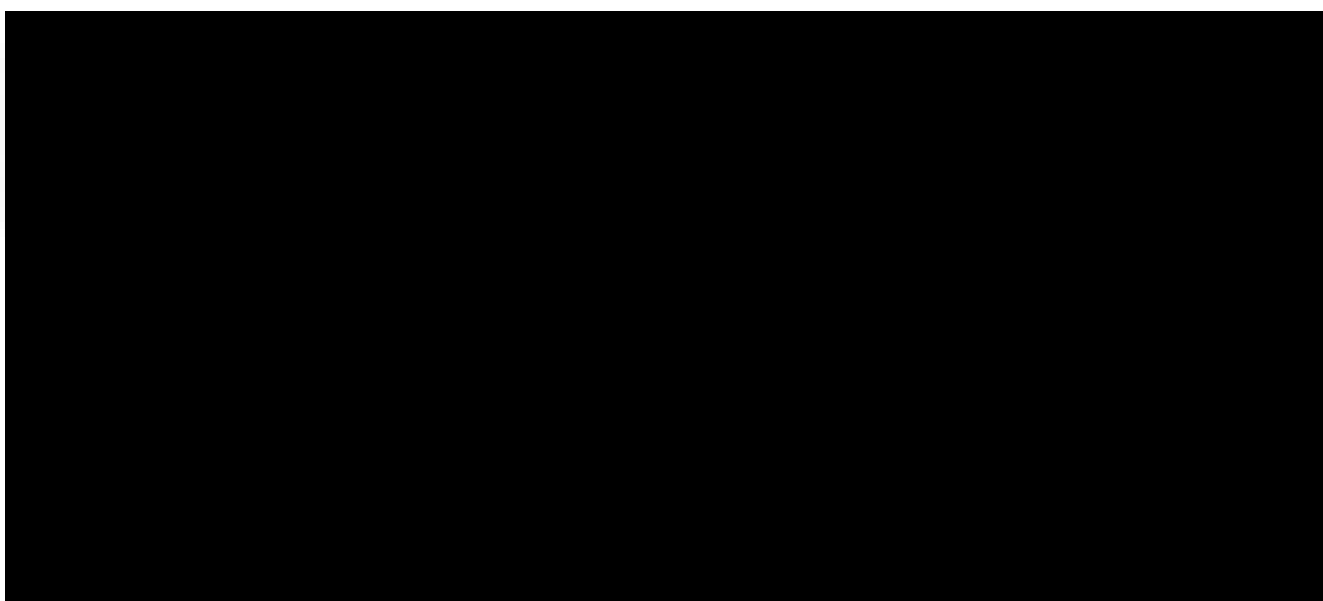
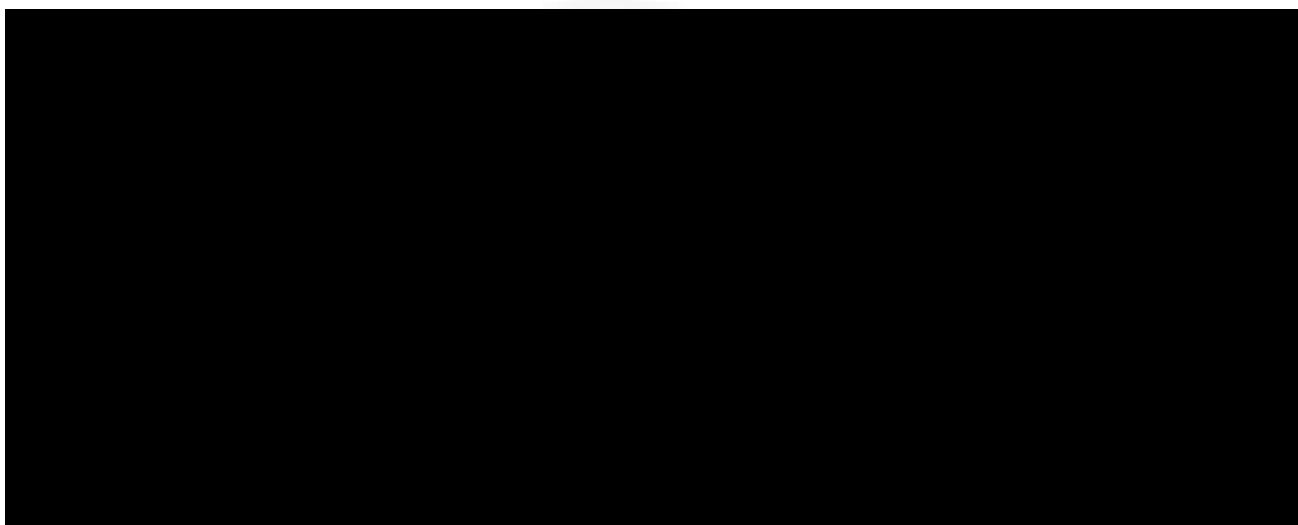
Wagner, J.G., Roth, R.A., 2000. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. Pharmacological Reviews 52, 349-374.

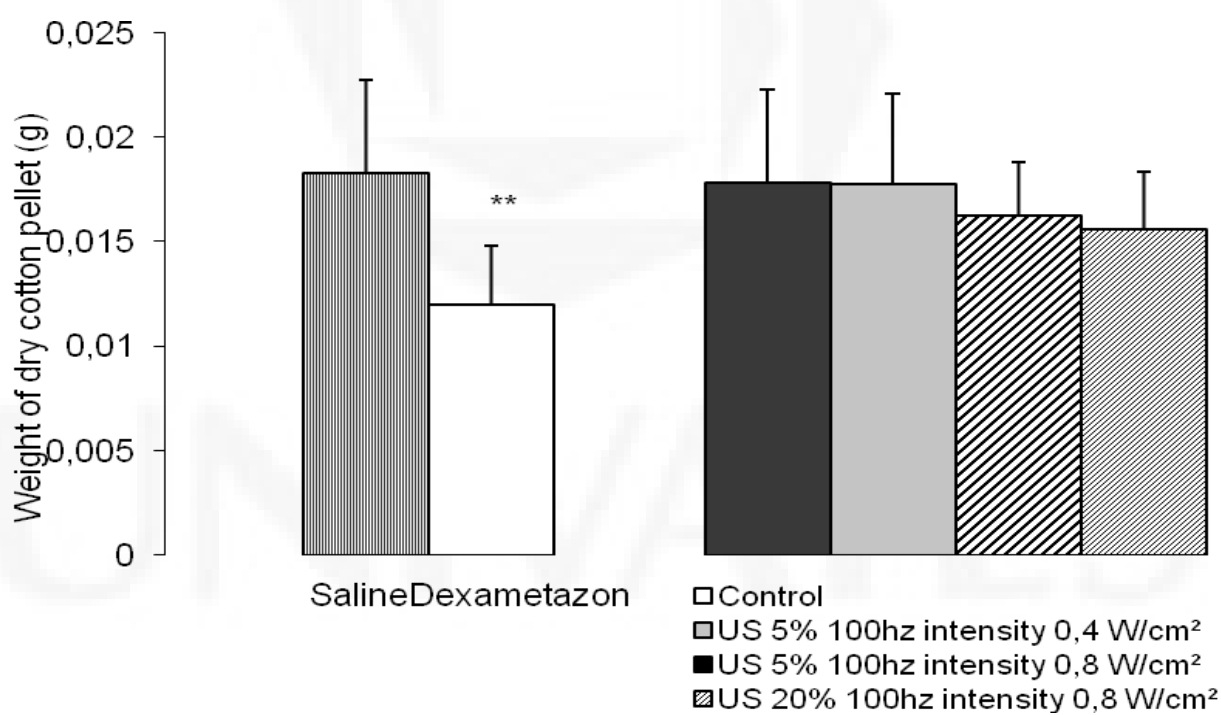
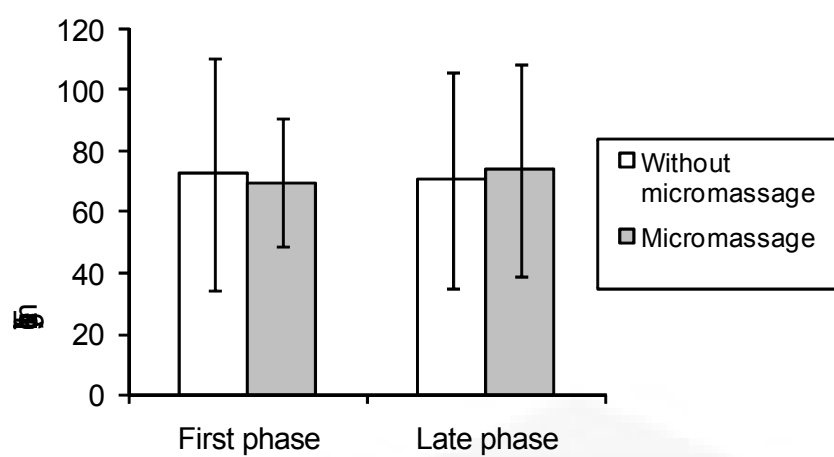
Legends

Figure 1. Effect of acute administration of continuous and pulsed ultrasound on formalin test. Ultrasound was applied immediately or 60 minutes before formalin administration. First phase of licking response (Panel A). Late phase of licking response (Panel B). Effect of micromassage in both phases (Panel C). Values are

expressed as mean (SD). ANOVA followed by Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 2. Effect of chronic administration of pulsed ultrasound on granulomatous tissue formation. Values are expressed as mean (SD). ANOVA followed by Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test, ** $p < 0.01$





Antinociceptive and anti-inflammatory properties of continuous and pulsed ultrasound in animal models

Authors: Paula Bianchetti, Dênis Barnes, Sabrina Sbaraini, Simone Stülp, Ionara Rodrigues Siqueira

We suggest the following scientists to review the manuscript:

Yueh-Ling Hsieh, PhD, Departament of Physical Therapy, Hung-Kuang University, Taichung 34, Chung-Chie Road, Sha Lu, Taichung 433, Taiwan, Republic of China
e-mail: sherrie@ms1.tcol.com.tw

D. H. Goddard, Department of Rheumatology, Westminster Hospital, London SWL.

Mason C. P. Leung, Department of Rehabilitation Sciences, The Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, Kowloon, Hong Kong, Special Administrative Region, China e-mail: rsmcpleung@polyu.edu.hk

Capítulo 3.3

O efeito da Fonoforese com o ultra-som contínuo e da fonoforese com o ultra-som pulsado, utilizando antiinflamatório padrão e extrato vegetais.

Relatório

Ao realizar os experimentos sobre o efeito da fonoforese sobre a ação do antiinflamatório-padrão, Diclofenaco emulgel, no modelo de granuloma induzido por corpo estranho, houve 100% de letalidade pela exposição ao fármaco, em todos os grupos: Diclofenaco, Diclofenaco e ultra-som pulsado, Diclofenaco e ultra-som contínuo. Não ocorrendo padronização do método, não foi possível avaliar o efeito dos extratos vegetais. Contudo este dado é de extrema relevância, uma vez que poucas precauções são tomadas e pouca informação aos usuários sobre a toxicidade desta especialidade farmacêutica indicada no tratamento local de lesão musculoesquelética. Cabe informar que a bula indica a necessidade da aplicação sobre a pele sã e intacta (ausência de feridas abertas ou escoriações) mas não informa sobre a toxicidade induzida pela aplicação sobre feridas cutâneas.

DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos corroboram os achados anteriores sobre a indução de um aumento na temperatura induzida pelo ultra-som no modo contínuo (PRENCTICE, 2002; BORGES, 2006). HIPPIUS *et al.* (1998) são da opinião que o mecanismo ligado à fonoforese é o térmico. O aquecimento produzido pelo ultra-som aumenta a energia cinética das moléculas dos medicamentos e da membrana celular, dilatando os pontos de entrada como os óstios dos folículos pilossebáceos e os orifícios adenaxiais das glândulas sudoríparas, além de aumentar a circulação local, aumentam a oportunidade das moléculas difundirem-se através do estrato córneo até a rede capilar da derme (BYL, 1995).

As soluções de diclofenaco de sódio e dexametasona sem aplicação do ultra-som apresentaram altos valores de condutividade quando comparados à água destilada e à solução de rutina. Cabe lembrar que as soluções de diclofenaco de sódio e de dexametasona são soluções aquosas iônicas, aumentando o transporte de massas e assim, a condutividade, enquanto que a solução de rutina apresenta interações moleculares, não alterando o transporte de massas e a condutividade. A dexametasona possui um número maior de interações iônicas, aumentando a condutividade devido ao maior número de cargas em solução. É interessante ressaltar que a aplicação do ultra-som aumentou a condutividade da solução de rutina por aumentar sua dispersão na solução.

Como esperado foi observada uma forte correlação positiva entre a temperatura e a condutividade nas soluções de diclofenaco sódico e de dexametasona.

A análise dos espectros de UV/visível sugere a ausência de degradação das moléculas testadas, diclofenaco sódico, dexametasona e rutina pelo ultra-som. Os efeitos da exposição de ultra-som em moléculas estruturais são importantes, considerando que a atividade biológica é diretamente dependente da ausência de degradação nas condições usadas além da absorção percutânea.

O teste da formalina é um modelo característico de comportamento doloroso, que se divide em duas fases: a primeira fase, nocicepção neurogênica, que é o resultado da ativação química direta de fibras nociceptivas aferentes primárias pela formalina. O ultra-som não apresentou ação antinociceptiva na primeira fase, o que sugere ausência de ação central. A segunda fase é característica de nocicepção inflamatória, os dados indicam que o ultra-som não possui ação antinociceptiva mediada por mecanismo periférico, já que o ultra-som não diminuiu o comportamento doloroso nesta fase.

O ultra-som não proporcionou atividade antiinflamatória no teste do granuloma, um modelo de inflamação crônica. É interessante citar que vários relatórios sugerem que o ultra-som é capaz de agir na inflamação crônica onde uma resposta inflamatória poderia ser iniciada e promover o processo curativo, embora este efeito induzisse um aumento dos sinais inflamatórios. Os resultados sobre o efeito do ultra-som na melhora da taxa curativa de feridas crônicas estão conflitando, há dados que demonstram a evolução de taxas curativas através do ultra-som (FLEMMING E CULLUM 2000) e nenhum efeito útil (CULLUM *et al.*, 2001; ERIKSSON *et al.*, 1991; JOHANNSEN *et al.*, 1998).

CONCLUSÕES

Atribui-se à fisioterapia uma gama cada vez maior de recursos terapêuticos. Os efeitos do ultra-som têm sido amplamente empregados, constituindo-se uma técnica fisioterapêutica bastante comum. A fonoforese tem sido considerada uma técnica segura e efetiva. Os medicamentos comumente aplicados através desta técnica são, principalmente, os antiinflamatórios ou os anestésicos locais. É importante citar que não há um consenso de protocolo padrão em relação à aplicação do ultra-som. A escolha do profissional fisioterapeuta é basicamente empírica, provavelmente, devido ao limitado número de publicações na área e ao fato de que os dados obtidos serem bastante conflitantes. Cabe lembrar que a exposição às ondas sônicas pode alterar a estrutura química dos fármacos, e estas alterações podem modificar as propriedades farmacológicas, estes dados são escassos na literatura.

Foi demonstrado um efeito analgésico benéfico à grande parte dos pacientes tratados com o ultra-som (HOOGLAND, 1986), contudo tem se sugerido que o ultra-som tem um apreciável efeito placebo (BLINDER et al, 1985, HASHISH et al., 1988, LUNDEBERG et al., 1988). Modelos animais podem ser úteis na avaliação destes parâmetros, inclusive pelo fato de que os animais são incapazes de demonstrar os componentes subjetivos da sugestão, o efeito placebo.

Nossos dados não confirmaram a nossa hipótese de trabalho de que o ultra-som per se reduziria o limiar de dor em modelo animal de nocicepção e inflamação.

O ultra-som não apresentou as atividades antinociceptivas e antiinflamatórias nos modelos testados. Além de que, a exposição ao ultra-som parece não alterar as estruturas químicas de diclofenaco sódico, dexametasona e rutina.

Outros estudos são necessários para um maior conhecimento sobre o efeito do ultra-som sobre os fármacos estudados, e outros fármacos amplamente utilizados deverão ser investigados. A avaliação da atividade do ultra-som sobre a nocicepção e a inflamação deverá ser ampliada, utilizando outros parâmetros de ultra-som, além de distintos modelos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNE, J. E. **Eletrotermoterapia: Teoria e Prática**. 1 ed. Santa Maria: Pallotti, 2004.

ARTHO, P.A. *et al.* **A Calibration Study of Therapeutic Ultrasound Units**. *Physical Therapy*. v.82, n.3, p.257-263, 2002.

BARE, A.C. **Phonophoretic delivery of 10% hidro cortisone through the epidermis of humans as determined by serum cortisol concentrations**. *Physical Therapy*. 1996; 76: 738-749.

BENSON, H.A. **Influence of ultrasound on the percutaneous absorption of nicotinate esters**. *Pharm. Res.*, 8:204-209, 1991.

BLINDER, A. *et al.* **Is therapeutic ultrasound effective in treating soft tissue lesions?** *British Medical Journal*. 1985; 290, 512-514.

BORGES F.S. **Modalidades Terapêuticas nas Disfunções Estéticas**. 2006. 1 Ed. São Paulo: Phorte.

BYL, N. **The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis**. *Physical Therapy*, 75(6):539-553, 1995.

CAILLIET, R. **Dor: Mecanismos e Tratamento**. Porto Alegre: Artmed, 1999

CALIXTO JB, BEIRITH A, FERREIRA J, et al. **Phytother Res**. 14, 401-418, 2000.

CASHMAN JN. *Drugs*. 52, 13-23, 1996.

CHIEN, Y. W. **Developmental concepts and practice in transdermal therapeutic systems**. In: CHIEN, Y.W. Transdermal controlled systemic medications. Marcel Dekker Inc., New York, vol. 31, PP. 25-82, 1987

COAKLEY, W.T., **Biophysical Effectes of Ultrasound at Therapeutic Intensities**. In: *journal Physioterapy*, v.64, n.6, p.166-169, 1978

COHEN RD, PERLER. J. **Neurophysiol**. 64, 457-464, 1990.

CULLUM N, NELSON E.A., FLEMMING K., SHELDON T. **Systematic reviews of wound care management: (5) beds; (6) compression; (7) laser therapy, therapeutic ultrasound, electrotherapy and electromagnetic therapy**. *Health Technol Assess*. 2001;5:1-221.

DHAWAN BN, CESSSELIN F, RAGHUBIR. **Pharmacol. Rev**. 48, 567-592, 1996.

DOUGLAS CR. **Tratado de Fisiologia Aplicado à Ciência da Saúde**. São Paulo: Robe Editorial, 1999.

ERIKSSON S.V., LUNDEBERG T., MALM M. **A placebo controlled trial of ultrasound therapy in chronic leg ulceration**. *Scand J Rehabil Med*. 1991;23:211-213.

FANTONE JC, WARD PA. **Inflamação** IN: Rubin E, Farber JL. *Patologia*, 3 ed. pp. 34-73, 2002.

FELLINGER, K.; SCHMID, J. **Klinik und Therapie does Chronischen Gelenkhuematistus**. Wien, p. 549-552, 1954.

FLEMMING K., CULLUM N. **Therapeutic ultrasound for pressure sores.** *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(4):CD001275.

GRIFFIN, E.; ECHTERNACH, J.L.; PRICE, R.E.; TOUCHSTONE, J.C. **Patients to with ultrasonic-driven hidrocordisone and with ultrasound alone.** *Physical Therapy*, v. 47, p. 594-601, 1967.

GRIFFIN, J.E.; TOUCHSTONE, J.C. **Low-intensity phonophoresis of cortisol in swine.** *Physical Therapy*, v. 48, p. 1336-1344, 1968.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-Funcional.** 3.ed. São Paulo: Manole, 2002.

GUIRRO, R. *et al.* **As variáveis físicas do ultra-som terapêutico: uma revisão.** *Revista da Ciência & Tecnologia.* p.31 - 41, 1996b.

HASHISH, I. *et al.* **Reduction of post operative pain and swelling by ultrasound treatment: A placebo effect.** *Pain* 1988; 33, 303-311

HIPPIUS, M. *et al.*; ***In vitro* investigations of drug release and penetration – enhancin effect of ultrasound on transmembrane transport of flufenamic acid.** *Exp. Toxic. Pathol.* 50: 4-6, 1998.

HOLDSWORTH L. K. **Efectiveness of ultrasound used with a hidro cortisone coupling medium or epicondilitis clasp to treat lateral epicondilitis: pilot study.** *Physiotherapy.* 1993; 79: 19-25.

HOOGLAND, R. *Terapia Ultrasónica.* **Amparo: B. V. Enraf-Nonius Delft.** 1986.

JOHANNSEN F., GAM A.N., KARLSMARK T. **Ultrasound therapy in chronic leg ulceration: a meta-analysis.** *Wound Repair Regen.* 1998;6(2):121-126.

JOHNSON, M.E. et al.; **Synergistic effects of chemical enhancers and therapeutic ultrasound on transdermal drug delivery.** J. Pharm. Sci., 85(7): 670-679, 1996.

JULIUS D, BASBAUM AL. **Nature.** 431, 203 – 209, 2001.

KITCHEN, S. **Eletroterapia: Prática baseada em evidências.** 2 ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2003

KOST,J. *et al.*; **Ultrasound as a transdermal enhacer.** In: BROUNAUGH, R.L & MAIBACH, H.I.; *Percutaneous Absorption*, 2a ed., New York, Ed. Dekker, 1989.

KUNTZ A. R.; GRIFFITHS C. M.; RANKIN J. M.; ARMSTRONG C. W.; MCLOUGHLIN T. J. **Cortisol Concentrations in Human Skeletal Muscle Tissue After Phonophoresis With 10% Hydrocortisone.**__*Journal of Athletic Training* 2006;41(3):321–324

LOBATO, R. **Efeitos do Ultra-Som na Prevenção de Aderências Tendinosas.** Tese de Mestrado, Programa de Pós-Graduação, Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2002

LOW, J.; REED, A. **Ultra-som Terapêutico.** In: *Eletroterapia Explicada Princípios e Prática.* 3.ed. São Paulo: Manole, 2001

LUNDEBERG, T. et al. **A comparative study of continuos ultrasound, placebo ultrasound and rest in epicondylalgia.** *Scadinavian Journal of Reahbilitation Medicine.* 1988; 20:99-101.

MACHADO, C. M. Ultra-Som. In: **Eletrotermoterapia Prática.** 3 ed. São Paulo: Pancast, 2003.

MARK, B.; BARRY, C.; MICHAEL, P. **Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 2002

MARTÍN, R. **Electroterapia en Fisioterapia**. Madri: Panamericana, 2000

MCDIARMID T., BURNS P.N., **Clinical Applications of Ultra-Sound Therapeutic**.

MERSKEY, H.; BONICA, J. **Pain Terms: a list with definitions and notes on usage**. Pain 6: 249-252, 1979

MITRAGOTRI, S. et al.; **A mechanistic study of ultrasonically enhanced transdermal delivery**. J. Pharm. Sci, 84:697-706, 1995.

MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R.; **Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis**. Pharmaceutical Research, 13(3): 411-420, 1996.

PRENTICE, W. E; **Técnicas de Reabilitação em Medicina Esportiva**. 3. ed. Manole, São Paulo, 2002.

SMITH E. W. **Percutaneous penetration enhancers**. 1995. Florida.

TJOLSEN A, HOLE K. **Animal Models of Analgesia**. In: Dickenson A, Besson J. **The pharmacology of pain**. Germany: Ed Springer, 1997.

TORRANCE GW, TUGWELL P, AMOROSIS, CHARTASH E, SENGUPTA, N. **Rheumatology**. 43, 712-718, 2004.

TYLE P. **Drug delivery by phonophoresis**. Pharmaceutical Research. 1989; 6: 355-361.

UEDA, H. et al.; **Difference in the enhancing effects of ultrasound on the skin permeation of polar and non-polar drugs**. Chem. Pharm. Bull., 44(10): 1973-76, 1996.

UMPHRED D.A. **Reabilitação Neurológica**. 4 Ed. Barueri: Manole, 2004.

WILLIAMS R. **Production and Transmission of Ultrasound**. Physiotherapy. 1987; 73 (3): 113-116.

