

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**JULIANA CAMPODONICO MADEIRA**

**REDUÇÃO DA DOR MUSCULAR INFLAMATÓRIA ATRAVÉS DO TRATAMENTO  
COM FONOFRESE USANDO GEL ENRIQUECIDO COM EXTRATO AQUOSO DE  
*ILEX PARAGUARIENSIS* EM RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Uruguiana**

**2018**

**JULIANA CAMPODONICO MADEIRA**

**REDUÇÃO DA DOR MUSCULAR INFLAMATÓRIA ATRAVÉS DO TRATAMENTO  
COM FONOFORESE USANDO GEL ENRIQUECIDO COM EXTRATO AQUOSO DE  
*ILEX PARAGUARIENSIS* EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Morgana Duarte da Silva.

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mauren Assis Souza.

**Uruguaiiana**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

M181r Madeira, Juliana Campodonico  
REDUÇÃO DA DOR MUSCULAR INFLAMATÓRIA ATRAVÉS DO  
TRATAMENTO COM FONOFORESE USANDO GEL ENRIQUECIDO COM  
EXTRATO AQUOSO DE ILEX PARAGUARIENSIS EM RATOS /  
Juliana Campodonico Madeira.  
50 p.  
  
Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do  
Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2018.  
"Orientação: Morgana Duarte da Silva".  
  
1. Bioquímica. 2. Fonoforese. 3. Inflamação. 4.  
Dor. 5. Ilex paraguariensis. I. Título.

**JULIANA CAMPODONICO MADEIRA**

**REDUÇÃO DA DOR MUSCULAR INFLAMATÓRIA ATRAVÉS DO TRATAMENTO  
COM FONOFRESE USANDO GEL ENRIQUECIDO COM EXTRATO AQUOSO DE  
*ILEX PARAGUARIENSIS* EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Farmacêutica e Toxicológica.

Dissertação defendida e aprovada em: 31 de janeiro de 2018.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Morgana Duarte da Silva Orientadora (UNIPAMPA)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanusa Manfredini (UNIPAMPA)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréia Caroline Fernandes Salgueiro (UNIPAMPA)

## AGRADECIMENTOS

Existem muitas formas de expressar a gratidão por aqueles que amamos e que mesmo ausentes, jamais nos abandonam. Esse, é apenas um carinho, pois acredito que devemos ser gratos diariamente.

No entanto, gostaria muito que ficasse aqui gravado o quanto sou grata à Deus pela oportunidade de crescimento pessoal, profissional e acadêmico. À minha família que sempre me apoiou e jamais deixou de ser meu alento, meu tesouro e minha segurança.

A Prof. Morgana que acreditou em mim e que hoje é meu exemplo de profissional que ama o que faz. Dedicada, amorosa, paciente (muito) e compreensiva. Meu muito obrigada por ter confiado em sua primeira orientanda.

Ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFIS), a Prof. Pâmela, Mauren, Rithiele, Priscila, Liane, Jeff, Will e demais colegas por me mostrarem o quanto é bom trabalhar em um grupo que coopera junto e que podemos encarar dias de laboratório de forma harmônica, amiga e divertida. “Make science”.

À Prof. Franciane Bobinski e sua equipe que me receberam de braços abertos no seu laboratório, me permitindo crescer e adquirir ainda mais experiências. Ao Prof. Eduardo Cargin-Ferreira pelo tempo e ajuda disponibilizados.

Aos amigos, e quantos amigos descobri nesse pequeno espaço de tempo. Toda a ajuda que recebi, todo carinho e palavras de apoio. Esse trabalho feito com muito amor, dedico aos companheiros de sempre: Jana, Dani, Lili, Pat, Diogo, Barrera, Sue, Lyana, Alyne e Matheus. E tantos outros que me auxiliaram nesse período.

Ao novo Grupo de Pesquisa de Dor e Inflamação (GPMorgs para os íntimos), pela parceria de trabalho que conseguimos criar e espero de todo coração que prosperemos muito!

Enfim, ao final desse trabalho, só vejo gratidão e amor. Muito obrigada!

## RESUMO

As lesões musculares são comuns em atividades cotidianas e esportivas. Na fisioterapia, utiliza-se o ultrassom terapêutico (US) associado a drogas tópicas ou substâncias derivadas de plantas (fonoforese) que podem atuar em condições inflamatórias. A *Ilex paraguariensis* (Ilex) é uma planta usada em uma bebida popular no sul da América, conhecida como "chimarrão". Ela possui atividades antioxidantes, antiinflamatórias e antimutagênicas que poderiam ser associadas aos efeitos do US. Neste trabalho procurou-se verificar o efeito da fonoforese com gel enriquecido com extrato de *Ilex paraguariensis* na inflamação muscular em ratos. Para isso, a inflamação muscular foi induzida por injeção de carragenina no músculo gastrocnêmio da pata direita de ratos Wistar. Grupos de ratos foram divididos em: salina intramuscular (i.m.); carragenina i.m.; carragenina i.m. + US; carragenina i.m. + fonoforese - três grupos com três doses diferentes do extrato; carragenina + Ilex tópica. Os animais foram tratados por 10 dias consecutivos, iniciando o primeiro tratamento 24 hrs após a injeção de carragenina. Nesse período foram realizados testes comportamentais (hiperalgesia mecânica e térmica) e avaliação do edema muscular. A dose de Ilex com melhores resultados nesta etapa foi utilizada posteriormente para análise de substâncias oxidativas musculares (substância reativa do ácido tiobarbitúrico – TBARS) e parâmetros antioxidantes (potencial antioxidante de redução férrica - FRAP); citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa-TNF- $\alpha$  e interleucina-6-IL-6) e citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no músculo e na medula espinhal; bem como a histologia muscular. Nesta etapa, observou-se a resposta comportamental dos ratos 24 horas após a carragenina e duas horas após o tratamento de US ou fonoforese. Obteve-se como resultado que o US reduziu a hiperalgesia mecânica a partir do terceiro dia de tratamento. Também verificou-se uma diminuição da hiperalgesia mecânica dos ratos no grupo fonoforese com Ilex, durante os 10 dias de tratamento. Ambos os tratamentos, reduziram significativamente o edema muscular. Na segunda etapa, verificou-se que as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) foram reduzidas tanto na fonoforese quanto no grupo com US em comparação com o grupo carragenina. Houve uma redução da peroxidação lipídica em ambos os grupos tratados, mas o grupo de fonoforese apresentou aumento da capacidade antioxidante. Os efeitos antiinflamatórios do US e da fonoforese foram confirmados por análise histológica. Os resultados demonstraram que o US reduziu a hiperalgesia mecânica e diminuiu o edema. No entanto, a fonoforese com Ilex mostrou maior efeito anti-hiperalgésico e antidematogênico, melhor do que apenas o tratamento com US. Além disso, os dados demonstraram que os efeitos do US e o US associado a *Ilex paraguariensis* podem ser, pelo menos em parte, devido ao fato de que ambos os tratamentos diminuem as citocinas inflamatórias, além de reduzir a peroxidação lipídica. Além disso, a fonoforese apresentou um efeito antioxidante que também pode ser responsável pela resposta de redução inflamatória.

**Palavras-chave:** Fonoforese; *Ilex paraguariensis*; Inflamação; Citocinas; Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Muscle injuries are common in daily activities and sports. In physical therapy, the therapeutic ultrasound (US) is used associated with topical drugs or plant derived of substances (phonophoresis) that could act in inflammatory conditions. *Ilex paraguariensis* (Ilex) is a plant used in a popular drink in Southern America known as "chimarrão". It has antioxidant, anti-inflammatory and antimutagenic activities that could be associated with the effects of the US. The aim of this study was to verify the effect of phonophoresis with enriched gel with *Ilex paraguariensis* extract on muscle inflammation in rats. For this, muscle inflammation was induced by injection of carrageenan into the gastrocnemius muscle of the right paw of Wistar rats. Groups of rats were divided into: intramuscular saline (i.m.); carrageenan i.m. ; carrageenan i.m. + US; carrageenan i.m. + phonophoresis - three groups with three different doses of Ilex; carrageenan + topical Ilex. The animals were treated for 10 consecutive days, initiating the first treatment 24 h after the injection of carrageenan. During this period, behavioral tests (mechanical and thermal hyperalgesia) and evaluation of muscular edema were performed. The dose of Ilex with better results at this stage was later used for analysis of muscle oxidative substances (thiobarbituric acid reactive substance - TBARS and reactive oxygen species - ROS) and antioxidant parameters (ferric reduction oxidant potential - FRAP); proinflammatory amount (tumor necrosis factor alpha-TNF- $\alpha$  and interleukin-6-IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) in muscle and spinal cord; as well as muscle histology. At this stage, the behavioral response of the rats was observed 24 hours after carrageenan and two hours after the US treatment or phonophoresis. It was obtained as a result that the US reduced mechanical hyperalgesia from the third day of treatment. There was also a decrease in mechanical hyperalgesia of the rats in the Ilex phonophoresis group during the 10 days of treatment. Both treatments significantly reduced muscle edema. In the second step, the proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) were found to be reduced both in phonophoresis and in the US group compared to the carrageenan group. There was a reduction of lipid peroxidation (TBARS) in both treated groups, but the phonophoresis group presented increased antioxidant capacity (FRAP). The anti-inflammatory effects of US and phonophoresis were confirmed by histological analysis. Our results demonstrated that US reduced mechanical hyperalgesia and decreased edema. However, phonophoresis with Ilex showed a greater anti-hyperalgesic and antidematogenic effect, better than only US treatment. In addition, our data demonstrated that the effects of the US and US associated with *Ilex paraguariensis* may be, at least in part, due to the fact that both treatments decrease inflammatory cytokines, in addition to reducing TBARS. In addition, phonophoresis presented an antioxidant effect that may also be responsible for the inflammatory reduction response.

**Keywords:** Phonophoresis; *Ilex paraguariensis*; Inflammation; Cytokine; Oxidative damage.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo inflamatório após uma lesão tecidual. Neutrófilos migram para o tecido e devido a liberação das quimiocinas e produtos residuais do agente agressor. Os macrófagos e os neutrófilos liberam citocinas pró-inflamatórias (TNF-  $\alpha$  e IL-6) que participam da geração e manutenção da resposta inflamatória. Adaptado de Parish, 2005. .... **15**
- Figura 2.** Aplicação e desempenho da fonoforese. As ondas do ultrassom, criadas através de um cristal piezoelétrico, são emitidas através do transdutor do equipamento. As moléculas das substâncias usadas na fonoforese (formulação aplicada) se movem para a pele por uma combinação de pressão da onda física e **aumento** da permeabilização das camadas intercelulares. Fonte: Adaptado de Rao e Nanda, 2009..... **20**
- Figura 3.** Efeitos anti-inflamatórios da *Ilex paraguariensis* de acordo com vários estudos. ADN - ácido desoxirribonucleico; COX-2 - cicloxigenase-2; iNOS – oxido nítrico sintase induzida. Fonte: Adaptado de Brascesco et al., 2011..... **22**



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN**- Ácido Desoxirribonucléico
- COX-2** – Cicloxigenase-2
- eNOS** - Nitrogênio Endotelial Desacoplado
- EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio
- FRAP** – Potencial Antioxidante Redutor Férrico
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de Hidrogênio
- HOCl** - Ácido Hipocloroso
- IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1 beta
- IL-4** – Interleucina 4
- IL-6** – Interleucina 6
- IL-10** – Interleucina 10
- iNOS** - Óxido Nítrico Sintase Induzida
- NADPH** - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
- NFG** – Fator de Crescimento do Nervo
- NOS** – Óxido Nítrico Sintase
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Superóxido
- OH** - Radicais Hidroxilo
- OH<sup>-</sup>** - Ânion Hidroxilo
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- ONOO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito Altamente Reativo
- RO** – Radicais Alcoxilo
- ROO** - Peroxidradiais
- TBARS** – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
- TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral alfa
- US** – Ultrassom

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
2.1 Reação inflamatória .....	11
2.1.1 Citocinas e dano oxidativo .....	13
2.1.2 Principais EROs formadas pelo processo inflamatório e proteção antioxidante autógena.....	13
2.2 Tratamentos que reduzem a inflamação .....	15
2.2.1 Tratamento com Ultrassom e Fonoforese.....	16
2.3 Plantas Medicinais .....	18
2.3.1 <i>Ilex paraguariensis</i> .....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 Objetivo geral .....	21
3.2 Objetivo específico .....	21
<b>4. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As lesões musculares são comuns no cotidiano dos indivíduos, seja em atividades de lazer, esportivas, ou nas simples atividades diárias [1]. No processo de regeneração tecidual, a inflamação é um importante processo, mas invariavelmente causa edema, hematoma nas fibras lesadas e infiltrado de células, o que pode induzir uma lesão secundária por hipóxia e, conseqüentemente até morte celular [1, 2]. A imobilização muscular prolongada e a inatividade podem causar danos morfofuncionais no tecido muscular, por isso, a regeneração do tecido deve ser o mais breve possível [1].

Vários tratamentos são utilizados para amenizar o processo inflamatório. A fisioterapia dispõe de diversos recursos para este fim, como meio alternativo para aliviar a dor e reduzir o processo inflamatório, com o uso de equipamentos como o ultrassom (US), que tem propriedades anti-inflamatórias conhecidas, além de poder facilitar a passagem de substâncias através da pele.

A fonoforese é a aplicação do US associado à fármacos, princípios ativos ou outras substâncias com o intuito de reduzir a barreira formada pela pele, evitando desta forma que o fármaco passe pelo trato gastrointestinal para produzir seu efeito no local da lesão [3].

Neste contexto, a *Ilex paraguariensis*, que é planta utilizada em uma bebida muito comum nos países da América do Sul, conhecida como “chimarrão”. Ela tem sido usada como estimulante e como tratamento coadjuvante em doenças inflamatórias dolorosas como artrite e reumatismo, por seu potencial anti-inflamatório [4-6].

Alguns estudos também sugeriram que parte dos seus efeitos é devido à atividade antioxidante e anti-inflamatória desta planta, reduzindo os radicais livres e marcadores inflamatórios, como citocinas, que podem interferir em condições dolorosas e inflamatórias [6].

Estratégias farmacológicas para o controle da dor e do processo inflamatório incrementam os gastos em saúde pública e os gastos individuais com a saúde. Fármacos para o controle da dor e da inflamação são administrados diariamente, provocando efeitos adversos que, em muitos casos, são graves, gerando doenças gastrointestinais importantes, como gastrites, úlceras e constipação. Ademais,

apresentam reações adversas que limitam seu uso e ainda podem levar ao desenvolvimento de tolerância e alergias medicamentosas. Em vista disso, formas de administração de fármacos e bioativos naturais como a *Ilex Paraguariensis*, apenas no local da lesão, como ocorre na fonoforese, podem ser uma estratégia interessante para os gestores, para os profissionais da saúde e principalmente para os indivíduos que sofrem de dor inflamatória.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Reação inflamatória**

A reação inflamatória é desencadeada por vários fatores, como proteção do organismo contra qualquer agressão. Ela é a primeira defesa do organismo contra uma agressão, um processo de regulação com a finalidade de manter o equilíbrio de diversas funções e composições químicas do corpo, ou seja, a reação inflamatória é um mecanismo fisiopatológico [1]. Além disso, a inflamação tem como objetivo eliminar o agente agressor e remover tecidos degenerados e metabólitos, preparando a região afetada para o reparo [2].

O dano tecidual leva à liberação de mediadores inflamatórios por neurônios aferentes primários ou por células não-neuronais que residem no local ou infiltram-se na área lesada. No processo inflamatório agudo ocorre ativação de mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos e o acúmulo de algumas delas no espaço perivascular. Os principais mediadores liberados são o glutamato, as prostaglandinas, a histamina e a serotonina, entre outros, que originam a chamada "sopa inflamatória" [3].

Os mediadores inflamatórios encontrados em uma lesão podem ainda causar alodínia, que é uma resposta dolorosa a um estímulo não nocivo e também ao aumento da sensibilidade a um estímulo nocivo, chamado de hiperalgesia [4]. Isso porque eles podem sensibilizar os terminais nervosos e alterar a atividade de neurônios da medula espinal e/ou encéfalo [5]. Ainda, a presença de mediadores químicos no processo inflamatório faz com que a inflamação mantenha características uniformes mesmo sendo produzida por diferentes irritantes sendo que o aumento da permeabilidade vascular, e consequente formação do edema, pode ser originado de mecanismos diretos, em que o próprio agente agressor atua sobre a parede vascular ou indiretos em que há ação de mediadores químicos [1].

No aumento de permeabilidade vascular percebe-se um aumento de proteínas plasmáticas no local e influxo de granulócitos (leucócitos, principalmente neutrófilos), seguido rapidamente por monócitos que se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas no local da lesão. As proteínas plasmáticas e os leucócitos são normalmente restritos aos vasos sanguíneos, mas neste caso elas atravessam as vênulas pós capilares

para os tecidos extravasculares no local da lesão. A vasodilatação é um fenômeno associado à inflamação, que facilita a disponibilidade de mediadores e células inflamatórias [6, 7].

O processo de recuperação muscular é dividido em três fases: a fase inflamatória, de regeneração e de remodelação. Na primeira fase, os neutrófilos, os macrófagos ativados e os linfócitos T infiltram no sistema sanguíneo através dos vasos rompidos. Os macrófagos estão envolvidos na fagocitose e na remoção de detritos celulares e produzem as citocinas [8], como demonstrado na Fig.1.

A expressão da Cicloxigenase-2 (COX-2) é aumentada por estímulos inflamatórios. As vias da COX-2 estão envolvidas na regulação da dor, fluxo sanguíneo, ativação plaquetária, adesão de leucócitos e filtração de tecido. A COX-2 induz prostaglandinas e está envolvida na proliferação de mioblastos, na sua diferenciação e fusão [8].

A inflamação no tecido muscular parece bem característica, sabe-se que após uma lesão muscular as miofibras passam por necrose e células satélites, células-tronco musculares, são ativadas após lesão e participam da miogênese (formação de tecido muscular). Ao mesmo tempo, células imunes, incluindo macrófagos e neutrófilos, invadem a área lesada. Na fase inflamatória (primeira fase) de regeneração muscular há expansão de progenitores juntamente com células fibroblásticas, aumento do número de células imunes e a fagocitose das miofibras necróticas. Poucos dias mais tarde, os neutrófilos vão desaparecendo enquanto os macrófagos são mais numerosos.

A segunda fase de reparação da lesão inflamatória muscular inicia com pequenas novas miofibras, que são o resultado da diferenciação e fusão dos progenitores miogênicos. O número de células fibroblásticas cai, acontece angiogênese, e finalmente, as novas miofibras crescem em tamanho, e o tecido muscular retorna à sua homeostase anterior [9].

O uso de agentes químicos para induzir um processo inflamatório é largamente utilizado para avaliar a nocicepção - termo fisiológico usado para descrever os processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo, bem como parâmetros inflamatórios em modelos animais de pesquisa [4, 10].

Dentre os agentes inflamatórios utilizados na pesquisa, a carragenina é um dos mais estudados. Essa substância faz parte de uma família de polissacarídeos lineares sulfatados, obtidos a partir de extratos de algas marinhas vermelhas. A injeção de

carragenina pode induzir edema, com migração de células inflamatórias como neutrófilos [11] e nociceção quando injetada em locais como o músculo [3].

As alterações que ocorrem após o insultos locais usando carragenina são provavelmente responsáveis pela sensibilização dos nociceptores periféricos (região sensorial no terminal da fibra aferente nociceptiva) e das próprias fibras aferentes primárias, que contribuem para o desenvolvimento de hiperalgesia secundária, em conjunto com alterações centrais [3].

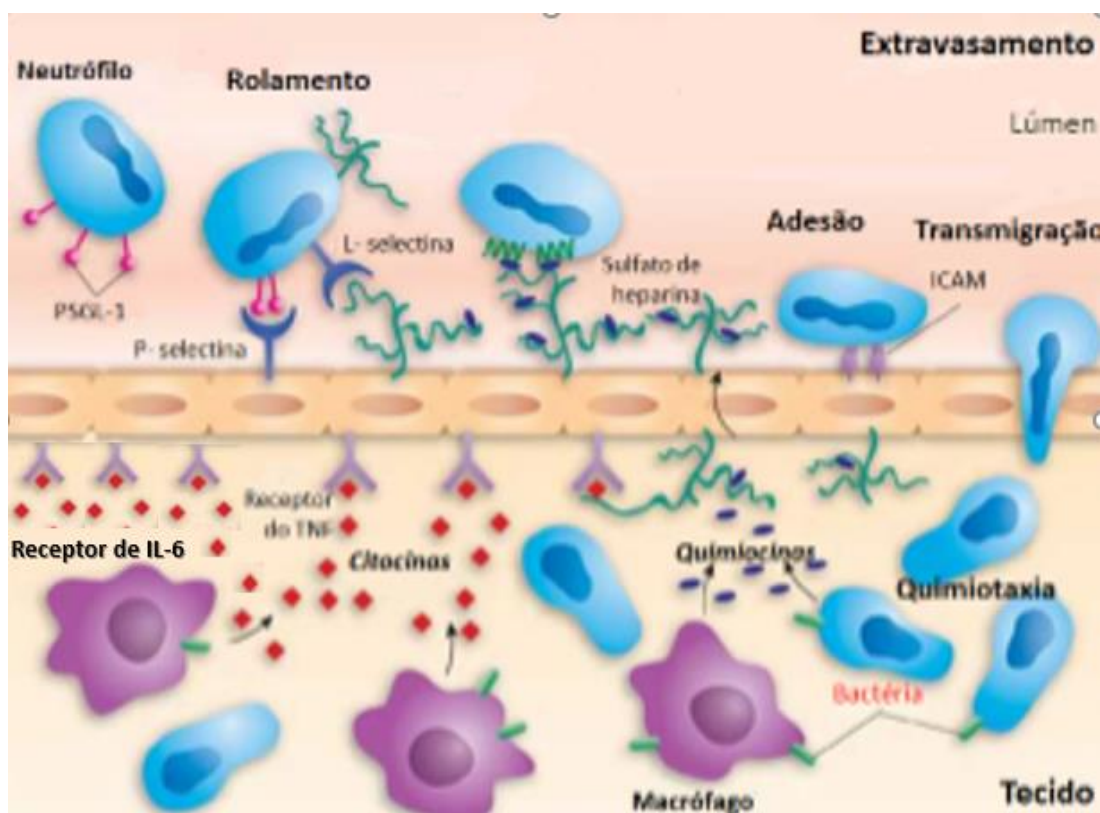


Figura 1. Processo inflamatório após uma lesão tecidual. Neutrófilos migram para o tecido e devido a liberação das quimiocinas e produtos residuais do agente agressor. Os macrófagos e os neutrófilos liberam citocinas pró-inflamatórias (TNF-  $\alpha$  e IL-6) que participam da geração e manutenção da resposta inflamatória. Adaptado de Parish, 2005.

### 2.1.1. Citocinas e dano oxidativo

A lesão tecidual promove a liberação de numerosas citocinas inflamatórias (proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune). As citocinas pró-inflamatórias mais estudadas são: interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que podem desempenhar um papel importante na geração e manutenção da dor evocada pela inflamação, pelo menos em parte, através dos

efeitos diretos sobre seus receptores localizados em fibras aferentes primárias. Além disso, elas potencializam a resposta inflamatória e o aumento da produção de agentes pro-algésicos (como as prostaglandinas, o fator de crescimento do nervo (NGF), a bradicinina e prótons extracelulares) [12-14]

Essas citocinas inflamatórias são produzidas por vários tipos de células, especialmente por neutrófilos, macrófagos e mastócitos. Elas têm vários papéis importantes na resposta inflamatória, incluindo a ativação do endotélio e de leucócitos e indução da resposta inflamatória durante a fase aguda. O endotélio dos vasos ativados permite o extravasamento seletivo de neutrófilos, evitando a saída de eritrócitos [6].

Após uma lesão muscular, os neutrófilos invadem rapidamente o local da lesão e podem aumentar ainda mais a liberação de citocinas, aumentando a resposta inflamatória, promovendo a degeneração ou postergando a regeneração do músculo [15]. As interleucinas e o TNF- $\alpha$  são capazes de iniciar uma cascata de sinalização de outras citocinas e fatores tróficos. Essas citocinas podem autorregular a expressão do NGF, da COX-2 e do óxido nítrico sintase (NOS) que vão estimular ainda mais a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o processo inflamatório [8, 16].

Embora essas citocinas aumentem a inflamação, alguns autores relatam seu papel regulador nesse processo, por exemplo a IL-6 é uma citocina com potencial anti e pró-inflamatório, sugerindo que ela pode mediar o reparo muscular, tendo papel em manter um sistema imunológico saudável. No entanto, a IL-6 parece ser uma substância clássica e de trans-sinalização de crucial importância para integrar as funções de diferentes células no local da inflamação e este é um processo altamente regulamentado. Por isso, sob certas condições, o equilíbrio de células imunes pró e anti-inflamatório podem ser desreguladas e a IL-6 apresenta características mais inflamatórias do que o contrário [17, 18].

As células presentes no local da inflamação, como os neutrófilos, tentam liquidar os agentes invasores, fagocitando e liberando conteúdo tóxico dos seus grânulos, que incluem citocinas, EROs e espécies reativas de nitrogênio. Alguns estudos sugerem que a infiltração máxima de neutrófilos no músculo danificado ocorre dentro de 24 h pós-lesão e está associado tanto a lesão máxima da fibra muscular quanto liberação de substâncias inflamatórias e à produção máxima de oxidantes [19, 20]. Estudos atuais nos elucidam sobre a relação entre as EROs e o estresse oxidativo ou dano oxidativo e o dano muscular induzido por trauma ou exercício físico intenso. Ambos estão diretamente relacionados, já que a lesão no tecido muscular estimula a geração de ROS em vários locais celulares, devido ao mecanismo primário de defesa que é a inflamação [21]



Nesse processo, a formação de EROs é consequência do próprio metabolismo, em uma tentativa de reparação tecidual e manter seu equilíbrio [22]. A velocidade e extensão da resposta inflamatória pode determinar a eficiência do reparo muscular, assim como o nível de estresse oxidativo. Portanto, é possível que intervenções prévias e/ou conjuntas ao processo de inflamação, tanto crônica como aguda, possam atenuar os efeitos deletérios induzidos por lesão muscular [21]

Fisiologicamente, as EROs tem uma função de marcadores biológicos, atuando como mensageiro, já que a produção de EROs devido a lesão muscular, desempenha papel importante na iniciação e na progressão desta lesão [22, 23]. Entretanto, quando há uma descompensação do organismo ou mesmo um aumento na concentração fisiológica de EROs, que devido a sua reatividade, pode fazer com que surjam seus efeitos nocivos como, por exemplo, a deficiência de proteína, lípidos e de oxidação do ácido desoxirribonucleico (ADN) e a homeostase celular [22, 24].

A geração de EROs durante a lesão muscular tem sido atribuída a xantina e produção de NADPH-oxidase, reperfusão isquêmica, explosões respiratórias fagocíticas e a acumulação excessiva de cálcio. Estes ROS principalmente ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio são responsáveis por danificar a estrutura das células e provocar uma fuga de enzimas essenciais, tais como a creatina quinase e lactato desidrogenase para o meio extracelular. Na lesão muscular aguda, as EROs são encontrados em grandes quantidade, induzindo, assim, um grande aumento das concentrações séricas destas enzimas no citoplasma, indicando uma ruptura na membrana da célula [23].

### **2.1.2. Principais EROs formadas pelo processo inflamatório e proteção antioxidante autógena.**

As EROs são formadas através do metabolismo celular na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, como também no citocromo P450. As oxidases Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e adenina (NADPH), presentes em inúmeras células, como nos fagócitos profissionais e células endoteliais, são essenciais para a resposta inflamatória [25].

Os principais EROs decorrentes do metabolismo frente a inflamação são: superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion hidroxilo ( $OH^-$ ), radicais hidroxilo (OH) e ácido hipocloroso (HOCl). O superóxido é formado através da redução

do oxigênio molecular, nitrogênio endotelial desacoplado (eNOS) derivada de NADPH oxidase ou da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais [25].

O superóxido é rapidamente dismutado a  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela superóxido dismutase. No entanto, na presença de NO, o  $\text{O}_2^-$  reage rapidamente, formando peroxinitrito altamente reativo ( $\text{ONOO}^-$ ), sendo mais rápido do que a dismutação de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este último pode mudar para HOCl altamente reativo nos locais inflamatórios pela enzima mieloperoxidase, que expressa em neutrófilos.  $\text{H}_2\text{O}_2$  também pode mudar para o OH fortemente tóxico na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  pela reação de Fenton. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é eliminado para  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  por catalase ou até mesmo através da glutathione peroxidase [25].

## **2.2. Tratamentos que reduzem a inflamação**

A abordagem mais comum para reduzir a inflamação na clínica envolve a inibição da síntese ou do acúmulo dos componentes da sopa inflamatória [12]. Para acelerar o processo de reação do organismo, utiliza-se drogas anti-inflamatórias que promovem a inibição reversível dos processos bioquímicos de defesa celular e, além do mais, reduzem a formação de precursores de prostaglandina [26].

O uso de anti-inflamatórios por via oral provoca efeitos secundários gastrointestinais tais como dor abdominal, ulceração e irritação da mucosa gástrica [26, 27], além de ter sua metabolização no fígado que pode acarretar alterações quando em uso exacerbado ou mesmo, sem indicações médicas [27].

Anti-inflamatórios inibem a COX-2 que convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas [27], mas ao serem administrados via oral, perdem sua biodisponibilidade devido sua metabolização realizada no fígado [28].

Devido a esse fator, os tratamentos acabam se tornando mais dispendiosos e sua duração para controle do processo inflamatório se torna longo, prolongando, dessa forma, também seus efeitos adversos. Por este motivo, tratamentos que possuam efeitos comprovados e menos/ou nenhum efeito adverso aos usuários torna-se de extrema relevância.

### **2.2.1. Tratamento com Ultrassom e Fonoforese**

Como tratamentos alternativos ao uso oral de medicamentos, a fisioterapia utiliza equipamentos que geram correntes elétricas ou mecânicas, como o ultrassom terapêutico

(US). O US é um recurso amplamente utilizado para o tratamento de lesões de tecidos moles, inclusive lesões musculares, pois pode acelerar o processo de reparação tecidual [29].

O ultrassom terapêutico é uma forma de energia mecânica que é transmitido através de vibrações sonoras para os tecidos. Essas ondas mecânicas são transmitidas ao tecido com auxílio de algum agente acoplador, com propriedades similares as da água. Na clínica o método mais utilizado é o de aplicação direta do transdutor que emite as ondas de US associado a um gel acoplante, como visto na Fig. 2. Os efeitos mecânicos produzidos por estas ondas nos tecidos biológicos podem desencadear eventos bioquímicos que aceleram a reparação dos tecidos [23, 30].

Durante as primeiras horas após a lesão, o US tem ação antiinflamatória e, na fase de proliferação, ou seja, durante o reparo de lesões musculares, este equipamento estimula os fibroblastos a produzirem mais colágeno pelo aumento na permeabilidade da membrana celular, estimulando também o crescimento de novos capilares no tecido isquêmico [30]

O US possui propriedades anti-inflamatórias sobre mediadores liberados no local da inflamação, como a histamina, e conseqüentemente atua sobre o estresse oxidativo no músculo esquelético [22]. Ao nível celular, as ondas do ultrassom podem alterar as taxas de difusão e a permeabilidade da membrana celular devido a vibração acústica e cavitação estável [23]. Por este motivo, o US pode ser eficaz ao introduzir fármacos, tais como corticosteroides, anestésicos, agentes imunossupressores, hormônios e agentes anti-inflamatórios para dentro das células [26].

A técnica pela qual o ultrassom terapêutico é utilizado para introduzir agentes farmacológicos através de pele intacta nos tecidos subcutâneos e células é conhecida como fonoforese [22, 23].

A fonoforese aumenta a distribuição da droga através de vários mecanismos, incluindo a indução de hipertermia no tecido e pela capacidade de produzir cavitação, que é a formação de microbolhas nos tecidos as quais auxiliam na transferência de fármacos para o interior do tecido [31].

Dentre as muitas vantagens dessa técnica, estão: (1) ação localizada da droga, (2) ausência e/ou diminuição de efeitos adversos decorrentes de ações sistêmicas do fármaco; (3) e a prevenção do efeito de primeira passagem pelo fígado. Outra vantagem desta técnica é a somatória dos efeitos do US associada aos efeitos da droga (como corticoides e anti-inflamatórios) no tratamento das lesões.

Acredita-se que o US facilite a passagem do medicamento pelo seu efeito de aquecimento, pelo mecanismo de cavitação e também pelo aumento da permeabilidade das camadas intercelulares [29].

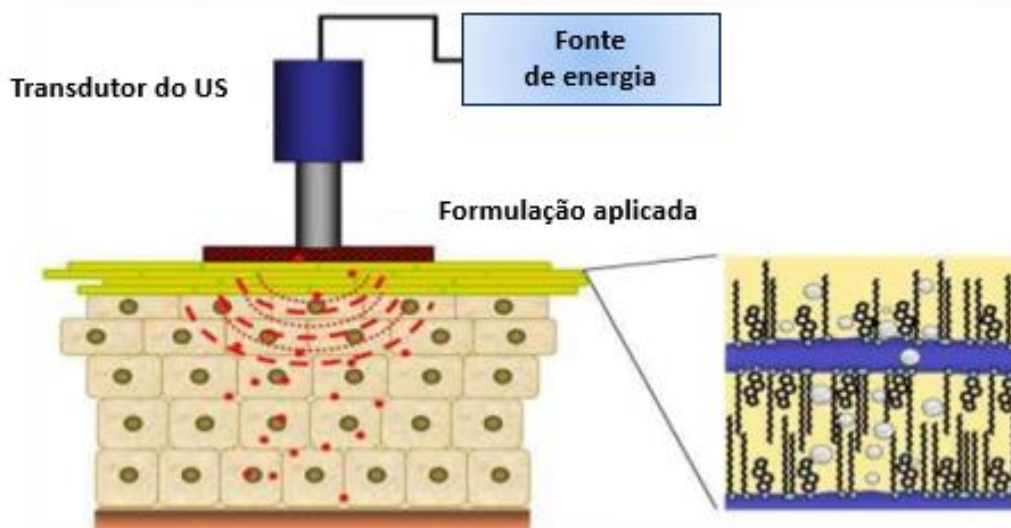


Figura 2. Aplicação e desempenho da fonoforese. As ondas do ultrassom, criadas através de um cristal piezoelétrico, são emitidas através do transdutor do equipamento. As moléculas das substâncias usadas na fonoforese (formulação aplicada) se movem para a pele por uma combinação de pressão da onda física e aumento da permeabilização das camadas intercelulares. Fonte: Adaptado de Rao e Nanda, 2009.

Os efeitos biológicos do ultrassom terapêutico como a transmissão de energia em ondas, pode melhorar a circulação sanguínea, e, assim, as biomoléculas são inseridas no meio intracelular causando alterações em processos inflamatórios. No entanto, a fonoforese ou sonoforese é aplicável, por vezes, quando as drogas anti-inflamatórias são misturados no gel de acoplamento durante a aplicação do equipamento, potencializando seu efeito anti-inflamatório. Neste caso, a aplicação de US com medicamentos anti-inflamatórios pode reduzir a dor ou a inflamação [32].

### 2.3. Plantas medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem políticas públicas para resgatar a medicina popular, em que as plantas medicinais tem seu emprego de forma muito comum.

Muitas ervas têm uso milenar e são base dos medicamentos desenvolvidos pela indústria farmacêutica com a utilização de muitas tecnologias [1].

Hoje, pode-se encontrar várias formas de aplicação de plantas e ervas medicinais, em formas de chá, emplastro, compressas e vários outros. Seu uso é muito difundido na cultura popular, porém, é importante obter respaldo científico, com conhecimento de suas reações adversas, doses e formas de administração para o uso mais apropriado dessa terapêutica [1].

### **2.3.1. *Ilex paraguariensis***

A *Ilex paraguariensis*, mais conhecida como erva-mate, é amplamente consumida no sul do Brasil, assim como na Argentina, Paraguai e Uruguai [33-36]. Embora muito utilizada socialmente para fazer uma bebida, conhecida como “chimarrão”, somente nos últimos anos que o seu potencial terapêutico, principalmente por suas propriedades antioxidante, vasodilatador, hipolipemiante e de controle de peso, vem sendo estudados [37].

A fitoquímica da erva-mate é caracterizada pela presença de xantinas (cafeína e teobromina) e polifenóis (ácido galocatequina, 4,5-dicafeoil ácido quínico, ácido clorogênico e catequinas) [37]. Ela possui componentes bioativos interessantes como as saponinas triterpênicos. Porém, a maioria dos efeitos benéficos à saúde atribuídos a erva-mate estão relacionados com a presença de compostos fenólicos ou polifenóis, com ação antioxidante, anti-inflamatório e anti-cancerígeno, como visualizado nos exemplos da Fig. 3. [2, 36, 38].

O extrato bruto da *Ilex paraguariensis* no tratamento da ativação de macrófagos humanos por lipopolissacarídeos foi capaz de inibir as respostas pró-inflamatórias medidas pelo bloqueio da COX-2. A combinação da quercetina e as saponinas presentes na erva-mate implicou na inibição tanto do óxido nítrico como de prostaglandinas, além de suprimir as respostas das citocinas pró-inflamatórias: IL-1 e IL-6 [2].

A *Ilex paraguariensis* também atua no metabolismo, pois é um agente com potencial terapêutico para a obesidade, pois pode estar associada a diminuição de absorção de lipídeos, inibindo a atividade da lipase pancreática e também na modulação da expressão de genes associados à obesidade [37, 38]. Além disso, ela pode aumentar a proteção antioxidante no plasma do sangue de pacientes com dislipidemia. Ainda, já

houve comprovação científica de que a *Ilex paraguariensis* melhora o perfil lipídico de indivíduos saudáveis [37].

Em estudo anterior, foi realizada análise fitoquímica de 3 ervas-mate brasileiras provenientes do noroeste e centro do estado do Rio Grande do Sul, em 5 doses diferentes (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> infusão de chimarrão), ao qual, encontrou-se na 10<sup>a</sup> infusão concentrações baixas de ácido clorogênico, ácido cafeico, cafeína e teobromina, com compostos fenólicos totais em torno de 0,338 mg de ácido gálico equivalente/ ml de extrato aquoso [34]. Nesta mesma pesquisa, observou-se uma redução do óxido nítrico em 40% da amostra de erva-mate brasileira, bem como uma capacidade quelante de ferro em torno de 80% [34].

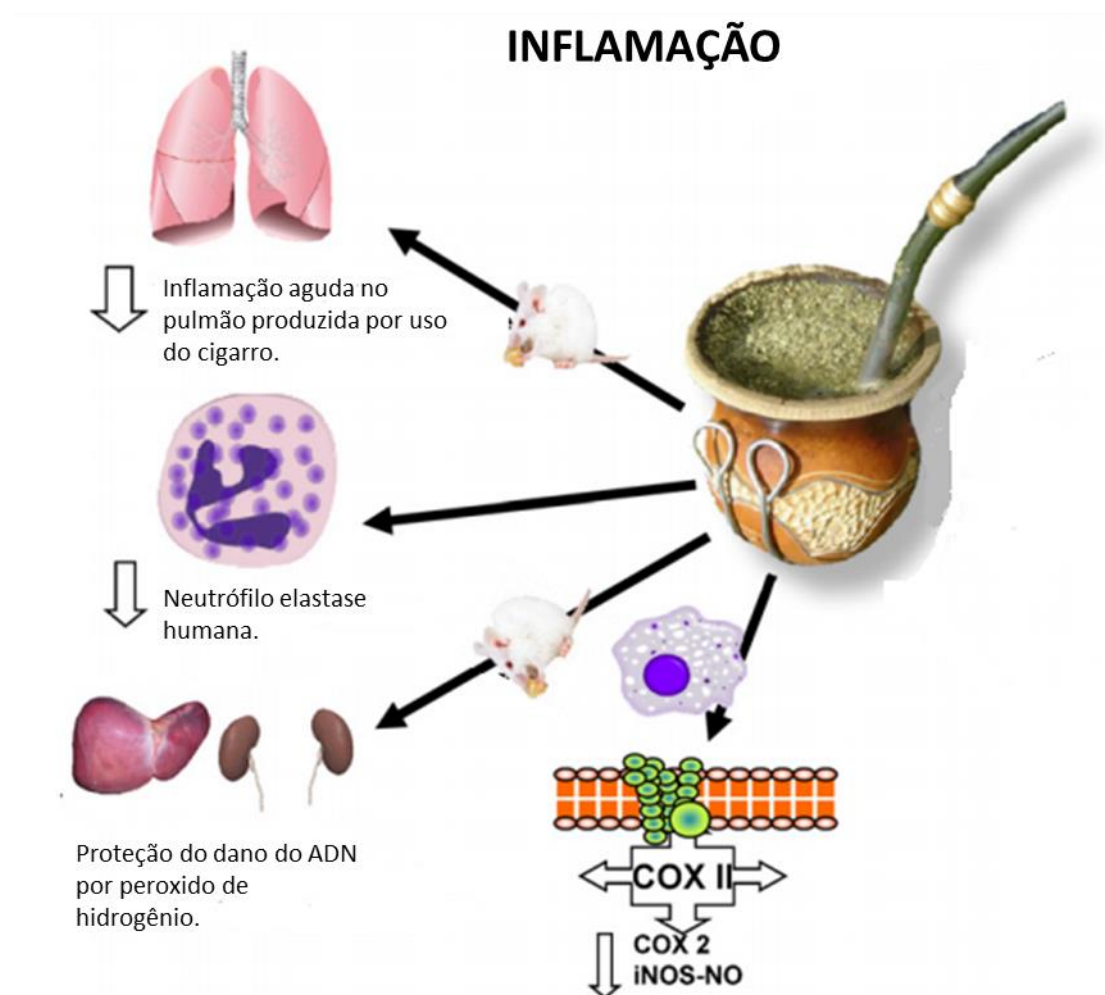


Figura 3. Efeitos anti-inflamatórios da *Ilex paraguariensis* de acordo com vários estudos. ADN - ácido desoxirribonucleico; COX-2 - ciclooxigenase-2; iNOS – óxido nítrico sintase induzida. Fonte: Adaptado de Brascesco et al., 2011.

Os níveis plasmáticos de antioxidantes totais de indivíduos que usaram a *Ilex paraguariensis* aumentaram, assim como enzimas antioxidantes. Desta forma, sugere-se que o consumo regular de chá de erva-mate pode melhorar as defesas antioxidantes por múltiplos mecanismos, não apenas pelo aumento dos compostos ativos circulantes, mas por regulamentação da maquinaria enzimática celular para inibir o estresse oxidativos [37].

O consumo de extratos de erva-mate pode proteger contra a reatividade dos radicais livres. Esta atividade antioxidante está associada principalmente aos polifenóis presentes na planta, que deslocam elétrons e formam ligações de hidrogênio intracelulares. Da mesma forma, inibe as reações em cadeia e apuram o reparo da lesão devido a esta reatividade da EROs [34].

O equilíbrio entre oxidação e antioxição ocorre para manutenção de sistemas biológicos saudáveis. Sob condições fisiológicas, o sistema de defesa antioxidante humano, incluindo, por exemplo, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione e outros, que permite a eliminação de EROs, incluindo outros  $O_2^-$ , OH, radicais alcoxilo (RO) e peroxidradiais (ROO) [39].

Os nossos sistemas de defesa antioxidante endógenos não funcionam perfeitamente sem compostos de redução de compostos exógenos, como vitamina C, vitamina E, carotenóides e polifenóis, essenciais em muitos mecanismos antioxidantes [39].

Portanto, há necessidade de antioxidantes exógenos para evitar o desequilíbrio oxidativo, representando um estado redox desigual e a favor da oxidação. No entanto, várias pesquisas apontam que doses elevadas de compostos isolados podem ser tóxicas, devido a efeitos pro-oxidativos em altas concentrações. Esses antioxidantes exógenos tem potencial para reagir com concentrações benéficas de EROs normalmente presentes em condições fisiológicas que são necessárias para o funcionamento celular [39].

Desta forma, este trabalho se justifica pela importância da busca de estratégias farmacológicas para o controle da dor e do processo inflamatório, pois formas de administração de fármacos e bioativos naturais como a *Ilex Paraguariensis*, apenas na periferia, como utilizada na fonoforese, podem ser um artifício interessante para os gestores, para os profissionais da saúde e principalmente para os indivíduos que sofrem com dor.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Verificar o efeito da fonoforese utilizando *Ilex paraguariensis* sobre a inflamação muscular induzida por carragenina em ratos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Analisar o efeito do US e da fonoforese com *Ilex paraguariensis* sobre a hiperalgesia mecânica e térmica (ao frio) em ratos com inflamação muscular;
- Verificar o efeito do US e da fonoforese com *Ilex paraguariensis* sobre o edema de ratos com inflamação muscular;
- Determinar o conteúdo de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no músculo de animais com inflamação muscular;
- Avaliar os marcadores de dano oxidativo e capacidade antioxidativa (TBARS e FRAP) presentes no músculo de ratos;
- Verificar as alterações histológicas no músculo gastrocnêmio (presença de células inflamatórias e extensão da lesão) de ratos.



#### **4. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A descrição metodológica, os resultados da dissertação, bem como a discussão deles estão apresentados em forma de um artigo científico. Pretende-se submeter esse artigo para a revista científica “Inflammation” - <http://www.springer.com/medicine/internal/journal/10753>- com fator de impacto de 2.955 e Qualis B1 na área de Ciências Biológicas II, requisito requerido pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Unipampa.

**Attenuation of inflammatory muscle pain by phonophoresis with aqueous extract of *Ilex paraguariensis* in rats**

Juliana Campodonico Madeira<sup>1</sup>, Mauren Assis Souza<sup>1</sup>, Pamela Billig Mello Carpes<sup>1,2</sup>, Franciane Bobinski<sup>3</sup>, Anna Paula Piovezan<sup>3</sup>, Daniel Fernandes Martins<sup>3</sup>, Eduardo Cargnin-Ferreira<sup>4</sup>, Morgana Duarte da Silva<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, University Campus of Uruguaiana, BR 472, Km 92, Uruguaiana, RS, 97500-970, Brazil.

<sup>2</sup>Multicentric Program of Post-graduation in Physiological Sciences, Federal University of Pampa, University Campus, BR 472, Km 92, Uruguaiana, RS, 97500-970, Brazil.

<sup>3</sup>Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, SC, 88137-272, Brazil.

<sup>4</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology, University Campus of Lages, Rua Heitor Vila Lobos, Lages, SC, 88506-400, Brazil.

\*Corresponding author: Morgana Duarte da Silva. Professor in Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, University Campus, BR 472, Km 92, Uruguaiana, RS, 97500-970, Brazil. E-mail: [dasilvamdbrazil@gmail.com](mailto:dasilvamdbrazil@gmail.com)

The authors report no conflicts of interest.

## Abstract

**Background:** The therapeutic ultrasound (US) associated with drugs or substances derived from plants (phonophoresis) could act in inflammation. *Ilex paraguariensis* (*Ilex*) is popular in South of America with antioxidant and anti-inflammatory activities which could be associated with US.

**Objectives:** Verify the effect of phonophoresis with extract of *Ilex* in muscle inflammation induced by carrageenan in the gastrocnemius muscle of rats.

**Methodology:** Muscular inflammation was induced by carrageenan injection in rats. Groups of animals were treated with US or phonophoresis with *Ilex*, performed daily for 10 days. Behavioral tests such as mechanical and thermal hyperalgesia and edema were performed. We analyzed muscle oxidative (Thiobarbituric acid reactive substance - TBARS) and antioxidants parameters (Ferric reducing antioxidant potential – FRAP); amount of proinflammatory (Tumor necrosis factor alpha - TNF- $\alpha$  and Interleukin-6 – IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) in muscle and spinal cord; as well as muscle histology.

**Results:** We observe reduction of the painful response and edema of the rats 24 hours after carrageenan and two hours after treatment ( $p \leq 0,01$ ), that allowed during the 10 days in phonophoresis group ( $p \leq 0,01$ ). The proinflammatory cytokines ( $p \leq 0,05$ ) and lipid peroxidation ( $p \leq 0,05$ ) were reduced both in phonophoresis and US groups. However, the phonophoresis group presented increased antioxidant capacity (FRAP) ( $p \leq 0,05$ ). Anti-inflammatory effects of US and phonophoresis were confirmed by histological analysis.

**Conclusion:** Phonophoresis reduced pain and edema more intensely than US. Both treatments reduced proinflammatory cytokines and TBARS. In addition, the phonophoresis with *Ilex* presented an antioxidant effect.

**Keywords:** Phonophoresis; *Ilex paraguariensis*; Inflammation; Cytokine; Oxidative damage.

## 1. Introduction

The use of therapeutic ultrasound (US) is an alternative to reduce behavioral and tissue problems found in patients with many problems including muscular inflammation. The US is a commonly applied feature in accelerating tissue repair of muscle injuries, resulting in increased protein synthesis and mast cell secretion, changes in fibroblast mobility, among others. This technique needs a conductive medium that enables a tight bond between the skin and the US transducer, usually a gel with or without associated substances [40]. Phonophoresis is the application of topical drugs to the external layer of the skin with the aid of US. The use of US increases the concentration of the drug in the tissue being treated by increasing the permeability of the skin to molecules with low or high molecular weights [29].

Substances derived from plants may be associated with use of the US and appear successfully used with plant extracts in animal models of inflammation [41, 42]. *Ilex paraguariensis* (*Ilex*), popularly known as mate-grass, is a species native to South America and its use is common within Brazil, Argentina, Uruguay and Paraguay [43]. In its phytochemical profile, yerba mate is composed of xanthines and polyphenols, which are phenolic compounds with effects on metabolism [37]. Authors describe *Ilex* with antioxidant, anti-inflammatory and antimutagenic activities [34, 35].

Muscle pain is one of the most frequent symptoms encountered by primary care providers and could be treated by several health professionals [44]. Muscle injury is characterized by increased production of inflammatory and biochemical mediators. The inflammation could be expressed by a set of indirect markers of muscle damage, such as muscle pain. Local cells of muscle inflammation release several substances among them are described inflammatory cytokines, growth factors and prostaglandins. Additionally, factors such as reactive oxygen species (ROS) and consequent oxidative stress are directly involved in the inflammatory process in the muscle [21].

Inflammatory processes are usually treated with drugs, but they may have important adverse effects, especially in gastrointestinal tract. In view of this, forms of administration of drugs and natural agents such as *Ilex* - just at the site of the injury, as in phonophoresis - may be an interesting strategy for the government, for health professionals and especially for patients with inflammatory pain, since both have anti-inflammatory potential. Thus, the aim of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of phonophoresis with *Ilex paraguariensis* (phonophoresis) on carrageenan-induced muscle inflammation in rats.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and Ethic Committee

A total of 66 male Wistar rats were used in these studies (200 - 300g). All of the procedures used in the present study were approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Pampa (CEUA/UNIPAMPA, protocol number 022/2016) and were carried out in accordance with the "Principles of Laboratory Animal Care" from the National Institutes of Health publication Nº. 85-23. Animals were housed in the Animal Care Facility with a 12-h light-dark cycle (lights on at 07:00 am), they

kept in a room with controlled temperature ( $22\pm 1$  °C) and humidity (50 to 80 %). The animals were acclimatized to the laboratory settings for at least 1 h before testing and were used only once throughout the experiments. In addition, the experimental procedures were in agreement with the current guidelines for the care and protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU revising Directive 86/609/EEC) and the National Institutes of Health Guidelines. Moreover, the experimental procedures were in agreement with the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals as previously specified [45].

## 2.2. Experimental Design

In Figure 1, we could observe the experimental design. Initially the animals were divided into seven experimental groups: (1) saline intra muscular (i.m.); (2) carrageenan i.m.; (3) carrageenan i.m. plus US; (4) carrageenan i.m. plus US associated with *Ilex* - infusion 1 (*Ilex* 1); (5) carrageenan i.m. plus US associated with *Ilex* - infusion 5 (*Ilex* 2); (6) carrageenan i.m. plus US associated with *Ilex* - infusion 10 (*Ilex* 3); (7) carrageenan i.m. plus *Ilex* - infusion 10 passed topically on the gastrocnemius muscle of rat with the US turned off (Topic). These animals were evaluated for mechanical and thermal sensitivity and edema. After the behavioral analyses of these animals, we chose the best dose of *Ilex* to proceed with more experimental procedures. In the second phase, the animals were divided into four experimental groups: (1) saline i.m.; (2) carrageenan i.m.; (3) carrageenan i.m. plus US; (4) carrageenan i.m. plus US associated with *Ilex* - infusion 10 (*Ilex*). In this group of animals, we evaluated the amount of cytokines in muscle and spinal cord, oxidative parameters and histology (Fig. 1).

Figure 1

## 2.3. Inflammatory Muscle Pain Model

The rats received 100  $\mu$ L of 3 % carrageenan dissolved in sterile isotonic saline, which has a slightly acidic pH (6.0), was injected intramuscularly in the gastrocnemius muscle (right). In another group of animals, saline was injected intramuscularly (pH=6.0). [3]

## 2.4. Phonophoresis Treatment

Before the first treatment, all animals had the skin on the right gastrocnemius muscle depilated with a blade. Four days before the first treatment, all rats were exposed to the researcher's touch. The experimenter sustained the animal for one minute.

### 2.4.1. Extraction Method

The process of obtaining the aqueous extract was carried out in a similar to the preparation of the "chimarrão" by adding in a medium-sized gourd a sufficient amount of commercial sample mate (Madrugada®, Venâncio Aires/RS) to occupy a third of the volume of the bowl (85 g), and the free volume

was quenched with water (70 mL) at 80 °C. The water in the bowl remained in contact with the weed for 1 minute and soon after the water was sucked through a syringe. Extracts from infusions 1, 5 and 10 (mate) were filtered (5 mL) and added to the water-based carbopol gel (25 mL) and added to the gel for subsequent treatments [2, 33-35]. From the first extraction the first dose was withdrawn. In the same way, the fifth extraction was used as dose 2 and the tenth extraction as dose 3. The others (2,3,4,6,7,8,9) were removed and discarded. This process was done every day of treatment and the gel maintained the consistency.

#### 2.4.2 *Ultrasound Parameters*

The ultrasound generator used was the Sonopulse, Ibramed® (Amparo, São Paulo, Brazil) with a transduction area of 1 cm<sup>2</sup>. The treatment with US was performed by 1 min. Ultrasound was employed in the continuous mode at a frequency of 3 MHz and 0.8 W/cm<sup>2</sup>, directly on the skin [26, 37]. To perform the US or phonophoresis, the animals were held by the researcher. Thus, the right paw was positioned and the posterior part was exposed to the contact with the US transducer.

#### 2.5. Behavioral Testing

Animals were acclimated to the behavioral tests for 2 days prior to assessment. For cutaneous mechanical hyperalgesia, they were acclimated to the wire mesh platform for 5 min per session, twice per day. Prior to testing, animals were acclimated to the behavioral testing room for 1 h.

##### 2.5.1. *Cutaneous Mechanical Hyperalgesia*

Mechanical hyperalgesia of the paw was assessed with *von Frey* filaments (Stoelting, Chicago, USA) using bending forces from 0.02 to 4 g. Fifty percent mechanical paw withdrawal threshold (the force of the von Frey hair in grams to which an animal reacts in 50 % of the presentations) was determined according to the Dixon up-and-down method [46]. On each testing day, the rats were habituated in individual Plexiglas boxes (9 cm×7 cm×11 cm) on an elevated wire mesh platform for 1 h. Testing was initiated with the 0.4-g filament. The filaments were applied and held for a period of approximately 3 s from underneath the grid floor perpendicular to the plantar surface. A positive response was recorded if the paw was withdrawn, in which case the next weaker filament was applied and the next measurement recorded. In the absence of a response, the next stronger filament was presented. This procedure continued until six responses in the immediate vicinity of the 50 % threshold were obtained. The resulting sequence of positive and negative response was used to interpolate the threshold. Mechanical nociceptive thresholds were evaluated before the carrageenan injection to characterize the baseline response as well as 24 h after (time course) and after in the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> days after first phonophoresis treatment.

##### 2.5.2. *Thermal Sensitivity to Cold*

Cold hypersensitivity was evaluated with the animals were placed in observation chambers on top of an elevated wire mesh platform to allow access to the plantar surface. After that, 0.05 mL of acetone was sprayed against the ventral side of their hind paw. The animals were evaluated for 20 s and, in case of response, for an additional 20 s. Responses were graded to the following four-point scale: 0, no response; 1, quick withdrawal, flick or stamp of the paw; 2, prolonged withdrawal or repeated flicking of the paw; 3, repeated flicking of the paw with licking directed at the ventral side of the paw. Acetone was applied alternately, three times to each paw and the responses were scored.

Cumulative scores were then generated by adding the six scores together for each rat – the minimum score being 0 and the maximum 18. Cold hypersensitivity was evaluated before and 24h after saline or carrageenan treatments as described above, being assessed 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> days after the first phonophoresis treatment [47].

### 2.5.3. Edema

To evaluate the edema, a digital pachymeter was used to measure the muscular diameter (in millimeters). A line was drawn between the origin and insertion of the gastrocnemius muscle and the pachymeter was positioned transversely to the muscle, in the midline of it. At this local, the muscle diameter was measure. This evaluation was also performed on the unaffected limb of the animal for comparison to the affected muscle. The evaluation was performed three times in each muscle (both sides) and the difference between the measures was used as the final result. Edema response was assessed before and after carrageenan injection on 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> days after the treatments.

### 2.6. Removal of tissues for analysis

One day after carrageenan injection rats were killed by decapitation and gastrocnemius muscle injected with carrageenan and the whole lumbar spinal cord were removed. In treated animals, the muscle and spinal cord were removed 2h after phonophoresis or US. The muscle was divided transversely into three equal parts, the upper part was separated for evaluations of oxidative stress, the middle for the cytokines, and the lower for histology (Fig. 1).

### 2.7. Measurement of Cytokines in Muscle and Spinal Cord

All tissue samples for cytokines evaluations were weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70 °C until Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). For cytokine assay, samples were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) with Tween 20 (0.05 %), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM EDTA, 2 ng/mL aprotinin, and 0.1 mM benzemethonium chloride. After homogenization samples were centrifuged at 3,000×g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was obtained and used for further analysis. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 were measured using sample aliquots of 100  $\mu$ L and rat cytokine ELISA kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's. The level of cytokine was estimated by interpolation from a standard curve

by colorimetric measurements at 450 nm (correction wavelength 540 nm) on an ELISA plate reader (Berthold Technologies—Apollo 8—LB 912, KG, Germany). The total protein content of the supernatant was measured using the Bradford method and all results were expressed as picograms per milligram of protein.

## 2.8. Measurement of Oxidative Parameters in Muscle

### 2.7.1 Muscle Tissue Preparation

Rats of all groups were euthanized 2h after the treatment. Their muscles were removed and homogenized in 50 mM TrisHCl, pH 7.4, (1/10, w/v). Afterwards, samples were centrifuged at 2400rpm for 10 min and supernatants were used for assay.

### 2.8.2. *Detection of TBARS Level*

Lipoperoxidation was assessed through the Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) test [48]. Each sample aliquot was incubated with a solution of 0.8% thiobarbituric acid, acetic acid buffer (pH 3.2) and sodium dodecylsulfate solution (8%) at 95 °C for 2 h. The color reaction was measured at 532 nm and the results were expressed as nmol of Malondialdehyde (MDA) per mg of protein.

### 2.8.3. *Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP)*

The sample was prepared by mixing 25 mL of buffer acetate, 2.5 mL of 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) solution and 2.5 mL of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  solution. 10  $\mu\text{L}$  of homogenized sample was added to a microplate along with 300 $\mu\text{L}$  of working reagent [49]. A standard curve with 10  $\mu\text{L}$  trolox (concentrations of 15, 30, 60, 120 and 240 mM) and 300  $\mu\text{L}$  of working reagent. The microplate was incubated at 37 °C for 15 minutes before reading on the SpectraMax M5 Reader at 593 nm. Each sample was analyzed in triplicate.

## 2.9. Muscle Histology

Histological samples were fixed in formaldehyde buffered with 4% formaldehyde (0.1 M, pH 7.4) for a minimum of 48 hours. Samples were placed in tap water for 2 hours to remove excess fixative. After dehydration in increasing ethanolic series and xylol bath, the samples were included in paraffin maintained at 60 °C. Samples were cut into a Leica RM 2025 microtome with a thickness of 5  $\mu\text{m}$ . The histological sections were dewaxed, hydrated according to routine methods and stained using the Giemsa technique. The staining of Giemsa was used in preference to other stains since it is specific to blood cells and infiltrated. The histological slides were photographed using a light microscope (Opticam system, mod. O500R, USA) 10x magnification and using digital image capture (Opticam, mod. Lopt 14003, USA).



## 2.10. Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Behavioral experiments were statistically evaluated by repeated measures ANOVA followed by the *post hoc* Student-Newman-Keuls test. For ELISA and immunohistochemistry experiments, data were examined with a one-way ANOVA followed by the *post hoc* Student-Newman-Keuls test. Statistical analysis was performed with *GraphPad* Software (San Diego, CA, USA). The significance level in all cases was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Reduction of mechanical hyperalgesia and edema by ultrasound and phonophoresis using *Ilex paraguariensis*.

To test if ultrasound and phonophoresis reduces pain behaviors, we tested a series of pain behaviors in animals with muscle inflammation. Initially, we test withdrawal threshold of the paw in rats and we verified the animals that received carrageenan in the gastrocnemius muscle showed an increase in the paw withdrawal threshold compared to rats with saline in the muscle. We observed that the carrageenan group of animals maintained the hyperalgesic response compared to the saline group in those 24 hours (Fig. 2A) and during the evaluation protocol for 10 days (Fig. 2B).

After the first treatment with US or US with *Ilex*-associated (phonophoresis), we obtained a reduction of the painful response of the rats in the second hour after treatment (Fig. 2A). *Ilex* 2 (withdrawn from the fifth “chimarrão”) and *Ilex* 3 (withdrawn from the tenth “chimarrão”) were those that had a statistically significant response ( $p \leq 0.05$ ;  $p \leq 0.01$ ; Reverse inhibition [RI] = 220.61%).

During the 10-day treatment protocol, the US or the phonophoresis treatments decreased animal hyperalgesia response (Fig. 2B). Dose 2 of *Ilex* (*Ilex* 2) influenced hyperalgesia only from the fifth day of treatment, and *Ilex* 1 (withdrawal of the first “chimarrão”) showed response from the seventh day. The treatment with US presented results from the third day of treatment, however, phonophoresis with *Ilex* 3 obtained positive effects in decreased mechanical hyperalgesia of these rats from the first treatment day until the last day evaluated ( $p \leq 0.05$  in first day;  $p \leq 0.001$  and RI=311.46% in nine day).

#### Figure 2

On thermal sensitivity to cold tests, the animals did not present any response after treatment, only the carrageenan group maintained a painful cold response until the third day evaluated (Fig. 2C). As for the analysis of edema, the treatments of US and phonophoresis with *Ilex* 2 obtained anti-edematogenic effect from the first day after treatment and was maintained throughout the protocol. Phonophoresis treatment with dose 1 responded only on days 3, 7 and 9, and phonophoresis with dose 3 had a decrease in paw edema after the third day of treatment, but remained until the end of the evaluated days (Fig. 2D) ( $p \leq 0.05$ ;  $p \leq 0.01$ ; maxima inhibition [MI]=425 $\pm$ 44).

### 3.2. Inhibition of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ and IL-6 in the muscle of animals treated with ultrasound and phonophoresis using *Ilex paraguariensis*.

The TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were higher in the inflamed muscle (Fig. 3A and B), but anti-inflammatory cytokines - IL-4 and IL-10 - did not differ significantly when compared with muscle of animals with saline i.m. (Fig. 3). Among US and phonophoresis treatments of rats, we observed difference in the amount of the pro-inflammatory cytokines in the gastrocnemius muscle. There was evidence in both TNF- $\alpha$  (Fig. 3A) and IL-6 (Fig. 3B) because we observe significantly reduced their levels in the animals treated with US and in the group treated with phonophoresis and yerba mate (*Ilex* group) ( $p \leq 0.05$  and MI=  $63 \pm 9$ ;  $77 \pm 6$  respectively).

It is important to note that we did not observe statistical difference in cytokine levels (anti or pro-inflammatory) in the spinal cord of animals after 24 h of carrageenan injection. That is, there was no difference even between the groups of animals that received saline i.m. with the carrageenan rats, which received carrageenan i.m. (data not shown).

#### Figure 3

### 3.3 Reduction of markers of oxidative damage in muscle of rats treated with ultrasound and phonophoresis associated with *Ilex paraguariensis*.

Muscle oxidative damage was assessed by production of reactive species of to thiobarbituric acid (TBARS) levels, which was increased in animals receiving carrageenan injection (Fig. 4A). There was significant reduction of oxidative stress in both the groups that received treatment - with US and phonophoresis - compared to the carrageenan group (Fig. 4A) ( $p \leq 0.05$  and MI=  $46 \pm 7$ ).

### 3.4 Increased antioxidant capacity in muscle of rats treated with phonophoresis with *Ilex paraguariensis*.

In the evaluation of the iron-reducing antioxidant capacity (FRAP), the carrageenan group caused a reduction of FRAP compared to the saline group (Fig. 4B). The treatment with US associated with *Ilex* showed to be able to prevent this decrease ( $p \leq 0.05$  and MI=  $36 \pm 6$ ).

#### Figure 4

### 3.5 Reduction of leukocyte infiltrate in muscle of rats treated with ultrasound and phonophoresis associated with *Ilex paraguariensis*.

Figure 5A shows the absence of leukocyte infiltrate in the endomysium and perimysium of the muscles that received saline (NaCl 0.9%) compared to the animal's muscle with carrageenan (Fig. 5B). In rats that received carrageenan (Fig. 5B), there was a conspicuous migration of polymorphonuclear cells

(leukocyte infiltrate). In the treatments with US and phonophoresis with *Ilex*, there was reduction of the inflammatory process, whose cellular indicator is the amount of polymorphonuclear infiltrate.

Figure 5

#### 4. Discussion

The processes of muscle damage and inflammation have been reviewed for many authors. Inflammation encompasses clinical, physiological, cellular and molecular changes within injured tissue [50-52]. In our study, we demonstrated for the first time the anti-inflammatory action of phonophoresis, using *Ilex* in vivo, on an inflammatory muscle injury induced by carrageenan and part of its mechanism of action. Prior to this work, phytochemical evaluation of *I. paraguariensis* had revealed the presence of chlorogenic acid, caffeic acid, caffeine and theobromine in the extracts [33-35].

In the present study, the effectiveness of treatment with phonophoresis using *Ilex* was comparable to that of treatment with US. The action of US on biologic tissue is based on thermal and nonthermal effects of the US waves. The US has been used to treat various musculoskeletal disorders with evidence of significant therapeutic effects, for example, favoring tissue regeneration, i.e. improving membrane permeability and cell diffusion, intracellular calcium levels and causing changes in electrical activity of peripheral nerves [42]. It is known that, when applied in the first hours after an injury, the US has anti-inflammatory action. US waves interacting with biologic tissue promotes reduction of stiffness, pain and muscle spasm, and produces a mild inflammatory reaction [53, 54].

In addition to accelerating the regenerative process, the US allows the entry or prior margination of macrophages in the damaged area. These cells in damage local accelerate the inflammatory process, in which it stimulates the release of growth factors that initiate the regenerative process. This procedure may be followed by changes in damage markers, such as muscle mass, protein concentration and number of mionuclears [23]. Our results show that the US was able to reduce inflammation of the gastrocnemius muscle of rats by reducing edema and hyperalgesia. However, when US was associated with the yerba mate extract, these effects were potentiated.

The skin has evolved to resist the penetration of foreign substances and particles. Effective topical drug delivery into and/or through the skin is hindered by these epidermal barriers. A range of physical enhancement methods has been developed to selectively overcome this barrier [55]. Acoustic targeted drug delivery (ATDD) has been explored as a promising method to enhance the delivery of therapeutic agents to the target tissues. The underlying mechanism for ATDD is the use of ultrasound energy mediated transport of molecules into the target tissues [31].

Authors report that phonophoresis could be administered to improve the penetration of drugs and other chemically active principles, for example, when given diclofenac diethylammonium, gold nano particles and a combination of them using US in a mouse model with tendinopathy. The results revealed a reduction of IL-1 $\beta$  in the three treated groups when compared to the external control. However, the best results were present in the group that received all associated techniques [16, 26]. .

Phonophoresis has some advantages, among them: localized action of the drug, absence and/or decrease of side effects of drugs resulting from systemic actions and prevention of gastrointestinal effects, as well as first pass effect in the liver. Another positive point of this technique is the addition of the effects of ultrasound associated with the effects of the drug in the treatment of the injuries, which can accelerate the process of reappearance of muscular injuries [1, 56]. In our work, we could observe that the anti-inflammatory effect of phonophoresis treatment in reducing edema and mechanical and thermal hyperalgesia was more prominent than treatment with US.

We also observed that the third dose of *Ilex* was better compared to the other two *Ilex* doses. In a comparative study of herbs from Brazil, Argentina and Uruguay, it was found that Brazilian herbs have a lower bioactive concentration than the others substances derived from plants, and the sequence of extractions performed simulating the habit of the mate interferes with the concentration of the extracted compounds [34, 35].

Following a higher concentration of chlorogenic acid, caffeic acid, caffeine and theobromine. Caffeic acid is an important biosynthetic precursor and has the ability to eliminate free radicals, which contributes to the high antioxidant capacity of the extracts of *Ilex*. However, a lower concentration of caffeic acid could inhibit more than 95% of the advanced end products of glycation [33, 34].

In the present study, we showed that US was able to decrease pro-inflammatory cytokines present in the injured muscle, as well demonstrated by other works [8, 15]. In addition to reducing inflammation, US decreased oxidative stress as demonstrated by levels of TBARS in muscle. Other studies also demonstrate the effects of US alone, with gel enriched with active products (eg, US plus gel-diosmin) [22] or with other associated treatments (eg cryotherapy) [57], in inflammation and TBARS levels.

Cellular infiltration of injured skeletal muscle progresses through several stages, generally characterized by early neutrophil invasion, followed by sequential increases in macrophages follows a sequential invasion of the damaged tissue by these cell types [58]. Neutrophils and M1 macrophages are major sources for Type 1 T (Th1) cytokines, as TNF- $\alpha$  and IL-6, and chemokines that promote satellite cell proliferation and migration. Although Th1 cytokines could further drive the activation of neutrophils and M1 macrophages to produce more Th1 cytokines. This positive feedback would tend to retain satellite cells in the proliferative stage if the Th1 inflammatory response were perpetuated.

Thus, attenuation of the Th1 inflammatory response and its role in driving the proliferative stage of myogenesis would require a negative regulator to deactivate neutrophils and M1 macrophages and thereby facilitate the transition of satellite cells to terminal differentiation [59]. Therefore, treatments such as US and phonophoresis can be greatly beneficial in this situation. The M1 macrophages can then be deactivated and switch to a M2 phenotype that promotes differentiation, regeneration, and growth of the injured muscle [59]. However, our treatments were unable to perform this function, at least in the timeline proposed in this work.

In addition, little is known of the complex interactions that may occur in injured muscle *in vivo* between the oxidative stress that commonly accompanies intense muscle use or muscle injury. Increased oxidative stress may be the most important among the many nonphysiological stresses applied to satellite cells *in vitro* that may have differential effects on dystrophic and wild-type satellite cells [59]. Some studies suggest that peak neutrophil infiltration of the damaged muscle occurs within 24 h post-injury and is

associated with both maximum fiber tearing and maximum oxidant production [19, 20], same time studied in our work. During the maximal activation of inflammatory cells such as neutrophils, monocytes and macrophages, superoxide radicals are produced. Reactive oxygen species include a large number of chemically reactive oxygen-derived molecules, including superoxide radical ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $OH^-$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) [60]. Both the US and phonophoresis treatments reduced lipid peroxidation and the amount of inflammatory cytokines, factors that seem to be related.

However, we demonstrated for the first time that, in addition to reducing inflammatory cytokines and oxidative stress, phonophoresis with *Ilex* was able to increase the antioxidant activity in the inflamed muscle. In the aerobic systems, it is essential the balance between oxide-reducing agents and the antioxidant defense system. Cellular defense systems can be detoxifying or repairing the injury [60]. Oxidative stress could increase cytokine production via several different mechanisms. Oxygen derivatives, acting as second messengers, activate the transcription factors nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) and activator protein-1 (AP-1) leading to the transcription of genes encoding cytokines and growth factors [24, 61]. There are not many works in the literature on yerba mate, however, it is suggested that the anti-inflammatory capacity may be due to the predominant compound of extracts which is chlorogenic acid (CGA, 3-O-caffeine acid). Recent evidence suggests that this compound may produce beneficial effects related to antioxidant activity, such as neuroprotective effects [33]. Natural antioxidants prevent the ROS generation, oxidation of proteins, and lipid peroxidation, thus acting as upstream therapeutic barriers to oxidative stress [30]. In fact, the pharmacological activity of *Ilex* beverage involves a potential antioxidant *in vitro* and *in vivo*, anti-inflammatory, anti-mutagenic properties, anti-obesity, among others [2, 36].

In this way, our suggestion is that phonophoresis with *Ilex* may be a potent ally in the treatment of inflammatory conditions, especially in muscle damage. We also believe that its potent reduction in hyperalgesia over the course of treatment days, more prominent than the effect observed only with treatment with the US, is due to the fact that *Ilex* increases the antioxidant activity of the muscle and possibly a further reduction of inflammatory cells as well as factors released by them (such as inflammatory cytokines). Our next studies aim to analyze the muscular response during the treatment with phonophoresis associated with yerba mate and to discover its mechanisms in models of chronic inflammation.

In a subsequent study, it was shown that the extract of *Ilex* was able to reduce carrageenin-induced inflammation and edema in rats and the ability to discontinue inducible nitric oxide-synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 expression (COX-2). The main agents involved in the formation of edema are bioactive amines, histamines and serotonin, as well as bradykinin. After, they follow the prostaglandins, which are involved in the increase of vascular permeability, together with nitric oxid (NO), formed by leukocytes, endothelial and sensory cells, nerve cells at the site of inflammation [37].

*In vitro* NO production by lymphatic endothelial cells in direct response to the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  suggests that any cytokine-associated lymphatic vessel dilation may result from NO production by LECs only with cooperation from other cells, by cell types other than LECs, from complex cytokine/NO feedback interactions, or from mechanisms not directly connected to NO [62].

## 5. Conclusion

Our data demonstrate that carrageenan was able to generate behavior of mechanical pain and edema and that the US reduced mechanical hyperalgesia and decreased edema. Additionally, we have also demonstrated the enrichment US gel with *I. Paraguariensis* showed a greater antinociceptive and antidematogenic effect bigger than US alone. Furthermore, our data demonstrated that the US and the US plus *Ilex* effects may be, at least in part, due to the fact that both treatments decrease inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ), as well as reduce the lipid peroxidation of the cell. In addition, the US associated to *Ilex* presented an antioxidant effect that may also be responsible for the inflammatory reduction response found in rats. Thus, phonophoresis associated to *Ilex paraguariensis* may be an alternative to medications to stimulate anti oxidative and anti-inflammatory pathways to promote inflammation healing and reduce muscular pain.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval:** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

## Referências

1. Aldrich, M. B., and E. M. Sevic-Muraca. 2013. Cytokines are systemic effectors of lymphatic function in acute inflammation. *Cytokine* 64 (1):362-369. doi:10.1016/j.cyto.2013.05.015.
2. Alfredo, P. P., C. A. Anaruma, A. C. Piao, S. M. Joao, and R. A. Casarotto. 2009. Effects of phonophoresis with Arnica montana onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: an experimental study. *Ultrasonics* 49 (4-5):466-471. doi:10.1016/j.ultras.2008.12.002.
3. Benzie, I. F., and J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239 (1):70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292.
4. Bracesco, N., A. G. Sanchez, V. Contreras, T. Menini, and A. Gugliucci. 2011. Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview. *J Ethnopharmacol* 136 (3):378-384. doi:10.1016/j.jep.2010.06.032.
5. Brickson, S., J. Hollander, D. T. Corr, L. L. Ji, and T. M. Best. 2001. Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 33 (12):2010-2015.
6. Chaplan, S. R., F. W. Bach, J. W. Pogrel, J. M. Chung, and T. L. Yaksh. 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53 (1):55-63.
7. Chazaud, B. 2016. Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: application to exercise-induced muscle damage management. *Immunol Cell Biol* 94 (2):140-145. doi:10.1038/icb.2015.97.
8. Chen, S., Y. Han, D. Yu, F. Huo, F. Wang, Y. Li, L. Dong, Z. Liu, and H. Huang. 2017. Transdermal delivery of isoniazid and rifampin in guinea pigs by electro-phonophoresis. *Drug Deliv* 24 (1):467-470. doi:10.1080/10717544.2016.1267275.
9. Colpo, A. C., M. E. de Lima, M. Maya-Lopez, H. Rosa, C. Marquez-Curiel, S. Galvan-Arzate, A. Santamaria, and V. Folmer. 2017. Compounds from Ilex paraguariensis extracts have antioxidant effects in the brains of rats subjected to chronic immobilization stress. *Appl Physiol Nutr Metab* 42 (11):1172-1178. doi:10.1139/apnm-2017-0267.
10. Colpo, A. C., H. Rosa, M. E. Lima, C. E. Pazzini, V. B. de Camargo, F. E. Bassante, R. Puntel, D. S. Avila, A. Mendez, and V. Folmer. 2016. Yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chem* 209:185-195. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.059.
11. da Silva, Morgana Duarte, Francisco José Cidral-Filho, Elisa Cristina Winkelmann-Duarte, Eduardo Cargin-Ferreira, João B. Calixto, Rafael C. Dutra, and Adair Roberto Soares Santos. 2017. Diacerein reduces joint damage, pain behavior and inhibits transient receptor potential vanilloid

- 1, matrix metalloproteinase and glial cells in rat spinal cord. *Int J Rheum Dis* 20 (10):1337-1349. doi:10.1111/1756-185x.12741.
12. Dohnert, M. B., G. K. Ferreira, P. C. Silveira, E. T. Zaroni, L. H. Dohnert, C. T. de Souza, and M. M. Paula. 2015. Inflammatory cytokines content in Achilles tendinopathy after phonophoresis treatment combined with gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium in rats. *Inflammation* 38 (3):1044-1049. doi:10.1007/s10753-014-0069-x.
  13. Draper, D. O., J. C. Castel, and D. Castel. 1995. Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther* 22 (4):142-150. doi:10.2519/jospt.1995.22.4.142.
  14. Elmarakby, A. A., and J. C. Sullivan. 2012. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Ther* 30 (1):49-59. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00218.x.
  15. Engelmann, J., M. F. Vitto, P. A. Cesconetto, P. C. Silveira, J. C. Possato, R. A. Pinho, M. M. Paula, E. G. Victor, and C. T. De Souza. 2012. Pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide gel treatment reduces the expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *Ultrasound Med Biol* 38 (8):1470-1475. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2012.03.020.
  16. Ferrari, R., and A. S. Russell. 2003. Regional musculoskeletal conditions: neck pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17 (1):57-70.
  17. Filho, L. F. S., P. P. Menezes, D. V. S. Santana, B. S. Lima, S. Saravanan, G. K. M. Almeida, Jerm Filho, M. M. B. Santos, Aaas Araujo, and E. D. de Oliveira. 2017. Effect of Pulsed Therapeutic Ultrasound and Diosmin on Skeletal Muscle Oxidative Parameters. *Ultrasound Med Biol*. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.09.009.
  18. Halliwell, B.; Gutteridge, J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 6<sup>a</sup> Aufl. Oxford University.
  19. Lakshmanan, S., G. K. Gupta, P. Avci, R. Chandran, M. Sadasivam, A. E. Jorge, and M. R. Hamblin. 2014. Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation. *Adv Drug Deliv Rev* 71:98-114. doi:10.1016/j.addr.2013.05.010.
  20. Lima, M. E., A. C. Colpo, W. G. Salgueiro, G. E. Sardinha, D. S. Avila, and V. Folmer. 2014. Ilex paraguariensis Extract Increases Lifespan and Protects Against the Toxic Effects Caused by Paraquat in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Environ Res Public Health* 11 (10):10091-10104. doi:10.3390/ijerph111010091.
  21. Maia Filho, A. L., A. B. Villaverde, E. Munin, F. Aimbire, and R. Albertini. 2010. Comparative study of the topical application of Aloe vera gel, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair in collagenase-induced rat tendinitis. *Ultrasound Med Biol* 36 (10):1682-1690. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.06.012.
  22. Martins, C. N., M. B. Moraes, M. Hauck, L. F. Guerreiro, D. D. Rossato, A. S. Varela, Jr., C. E. da Rosa, and L. U. Signori. 2016. Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats. *Physiotherapy* 102 (4):377-383. doi:10.1016/j.physio.2015.10.013.
  23. Mateos, R., G. Baeza, B. Sarria, and L. Bravo. 2018. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. *Food Chem* 241:232-241. doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.085.
  24. Matheus, JPC, FB Oliveira, LB Gomide, JGPO Milani, JB Volpon, and AC Shimano. 2008. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. *Braz J Phys Ther* 12:241-247.
  25. Merini, L. R., C. Furtado Sda, M. M. de Oliveira, A. L. Carneiro, A. L. Boechat, and J. F. Barcellos. 2014. Attenuation of adjuvant-induced arthritis in rats by phonophoresis with an aqueous gel of the Amazonian plant *Elaeoloma nuda* (Sapotaceae). *Cytokine* 65 (2):231-235. doi:10.1016/j.cyto.2013.10.007.
  26. Meyer, M., R. Schreck, and P. A. Baeuerle. 1993. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *The EMBO Journal* 12 (5):2005-2015. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05850.x.
  27. Mitragotri, S., and J. Kost. 2004. Low-frequency sonophoresis: a review. *Adv Drug Deliv Rev* 56 (5):589-601. doi:10.1016/j.addr.2003.10.024.
  28. Nagata, K., T. Nakamura, S. Fujihara, and E. Tanaka. 2013. Ultrasound modulates the inflammatory response and promotes muscle regeneration in injured muscles. *Ann Biomed Eng* 41 (6):1095-1105. doi:10.1007/s10439-013-0757-y.
  29. O'Brien, W. D., Jr. 2007. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 93 (1-3):212-255. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.010.

30. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95 (2):351-358.
31. Peake, J. M., O. Neubauer, P. A. Della Gatta, and K. Nosaka. 2017. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. *J Appl Physiol (1985)* 122 (3):559-570. doi:10.1152/jappphysiol.00971.2016.
32. Radhakrishnan, R., S. A. Moore, and K. A. Sluka. 2003. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 104 (3):567-577.
33. Raphael, A. P., O. R. Wright, H. A. Benson, and T. W. Prow. 2015. Recent advances in physical delivery enhancement of topical drugs. *Curr Pharm Des* 21 (20):2830-2847.
34. Rosim, G. C., C. H. Barbieri, F. M. Lancas, and N. Mazzer. 2005. Diclofenac phonophoresis in human volunteers. *Ultrasound Med Biol* 31 (3):337-343. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2004.11.012.
35. Schinella, G., E. Neyret, G. Console, H. Tournier, J. M. Prieto, J. L. Rios, and R. M. Giner. 2014. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. *Planta Med* 80 (12):961-968. doi:10.1055/s-0034-1382876.
36. Schneider, S. P., and M. Lopez. 2002. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in physiologically identified interneurons of hamster spinal laminae III-V. *Neuroscience* 115 (2):627-636.
37. Scott, A., K. M. Khan, C. R. Roberts, J. L. Cook, and V. Duronio. 2004. What do we mean by the term "inflammation"? A contemporary basic science update for sports medicine. *Br J Sports Med* 38 (3):372-380.
38. Silveira, P. C., L. A. da Silva, P. T. Tromm, L. Scheffer Dda, C. T. de Souza, and R. A. Pinho. 2012. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide phonophoresis on oxidative stress parameters after injury induced by eccentric exercise. *Ultrasonics* 52 (5):650-654. doi:10.1016/j.ultras.2012.01.007.
39. Souza, J., A. Meira, N. M. Volpato, P. Mayorga, and C. Gottfried. 2013. Effect of phonophoresis on skin permeation of commercial anti-inflammatory gels: sodium diclofenac and ketoprofen. *Ultrasound Med Biol* 39 (9):1623-1630. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.02.009.
40. Tidball, J. G. 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 27 (7):1022-1032.
41. Tidball, J. G. 2011. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* 1 (4):2029-2062. doi:10.1002/cphy.c100092.
42. Vieira, M. A., M. Maraschin, C. M. Pagliosa, R. Podesta, K. N. de Simas, Rockenbach, II, R. D. Amboni, and E. R. Amante. 2010. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. *J Food Sci* 75 (3):C280-285. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01548.x.
43. Zimmermann, Manfred. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 (2):109-110. doi:10.1016/0304-3959(83)90201-4.
44. Zortea, D., P. C. Silveira, P. S. Souza, G. S. Fidelis, C. S. Paganini, B. G. Pozzi, T. Tuon, C. T. De Souza, M. M. Paula, and R. A. Pinho. 2015. Effects of phonophoresis and gold nanoparticles in experimental model of muscle overuse: role of oxidative stress. *Ultrasound Med Biol* 41 (1):151-162. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2014.08.020.



## Figure legends

Fig 1. Experimental design: first phase - mechanical and thermal sensitivity and edema evaluations over 10 days of treatment with US or US + *Ilex paraguariensis* or topic *Ilex* after muscle inflammation induced by carrageenan; second phase - amount of cytokines in muscle and spinal cord, oxidative parameters and histology evaluations at 2h after treatment with US or US + *Ilex paraguariensis* (phonophoresis).

Fig 2. Behavioral tests in animals submitted to injection of carrageenan and treated with phonophoresis and *Ilex paraguariensis*. [A] Evaluation of hyperalgesia (*von Frey*) at 24 hours after the first treatment with US and phonophoresis associated with *Ilex*. [B] Evaluation of hyperalgesia (*von Frey*) during a 10-day treatment protocol. [C] Thermal sensitivity to cold test. [D] Evaluation of edema during 10-day treatment protocol with US and phonophoresis associated with *Ilex*. # Carrageenan group compared to the saline; + US group compared to the carrageenan group; % *Ilex* 1 group compared to the carrageenan group; & *Ilex* 2 group compared to the carrageenan group; \* *Ilex* 3 group compared to the carrageenan group. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$  was considered to indicate a statistically significant difference based in one-way analysis of variance followed by Newmann-Keuls *post hoc* test.

Fig 3. Effects of phonophoresis with *Ilex paraguariensis* in pro-inflammatory and anti-inflammatory interleukins in animals exposed to an experimental model of muscle inflammation. Cytokines evaluated were tumor necrosis factor  $\alpha$  [TNF $\alpha$ ] [A], interleukin-6 [IL-6] [B], interleukin-4 [IL-4] [C] and interleukin-10 [IL-10] [D]. # means the difference between carrageenan group and saline ( $p \leq 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference). \* means the difference when compared to the carrageenan group ( $p \leq 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference based in one-way analysis of variance followed by Newmann-Keuls *post hoc* test.).

Fig 4. Effect of US and phonophoresis with *Ilex paraguariensis* on oxidative damage (thiobarbituric acid reactive substance [TBARS] [A] and in the antioxidant capacity (Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP) [B]. # means the difference between carrageenan group and saline ( $p < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference). \* means the difference when compared to the carrageenan group ( $p \leq 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference based in one-way analysis of variance followed by Newmann-Keuls *post hoc* test.).

Fig 5. Representative images of the gastrocnemius muscle of rats receiving i.m. (A) or carrageenan i.m. (B, C and D). C represents the muscle of the ultrasound (US) treated animal and D represents the muscle of an animal treated with phonophoresis using *Ilex paraguariensis*. Black arrows indicates migration of polymorphonuclear cells (leukocyte infiltrate). Stain: Giemsa. Bar: 50  $\mu\text{m}$

Figure 1

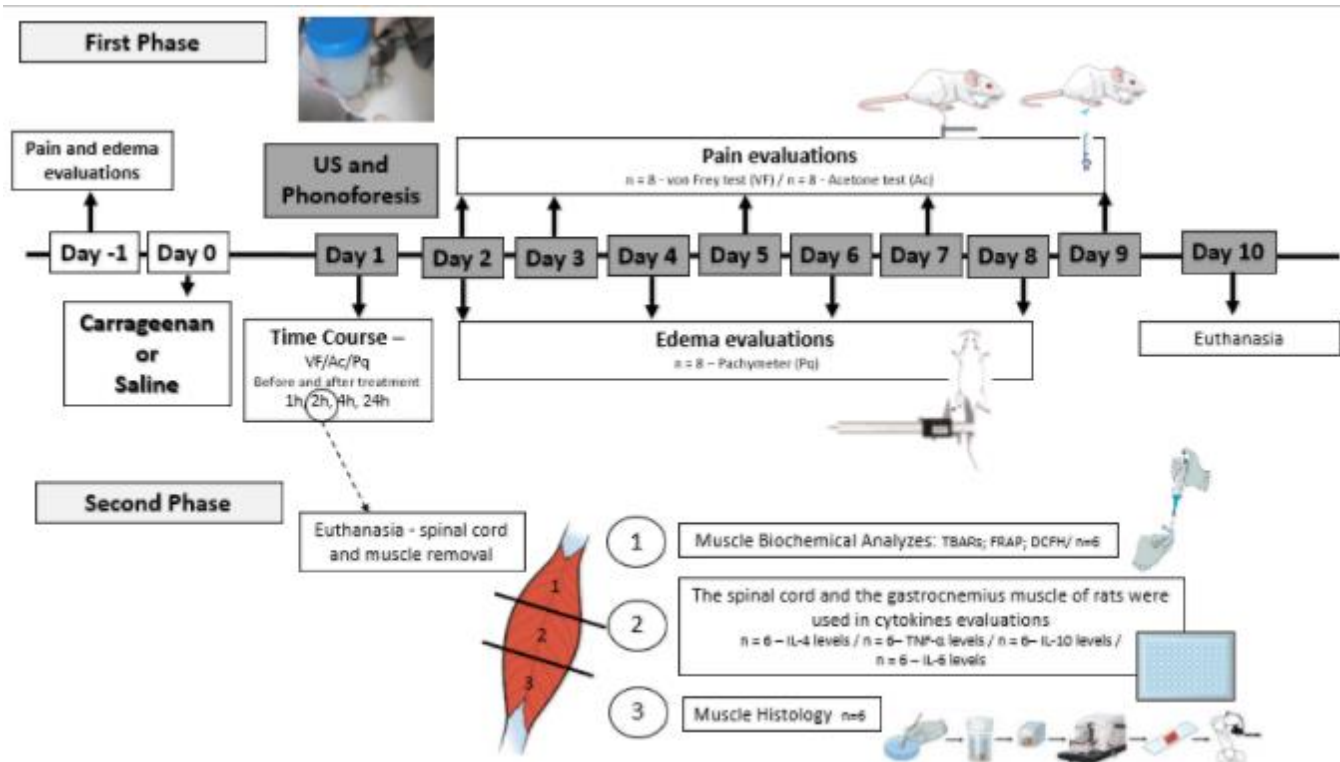


Figure 2

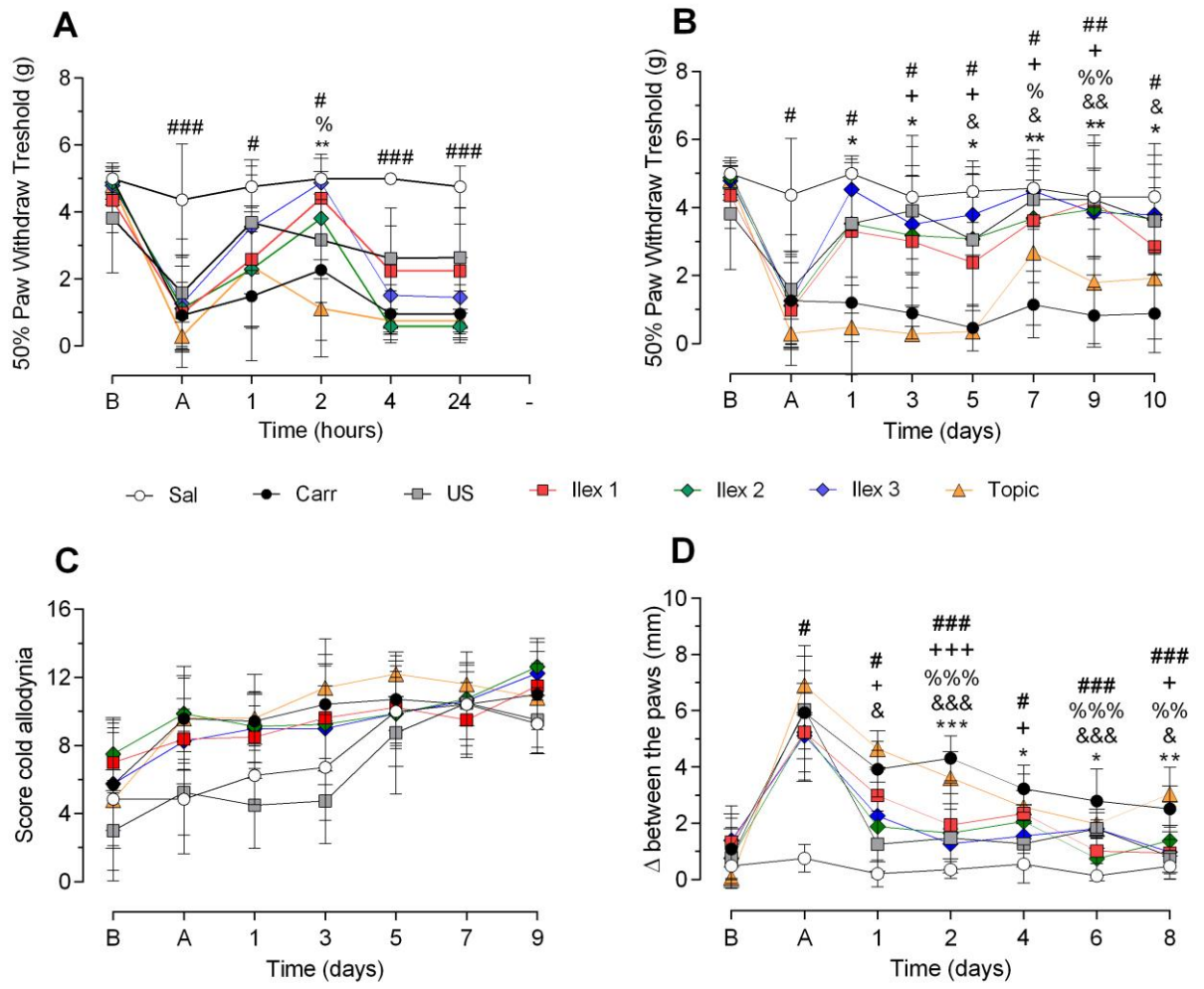


Figure 3

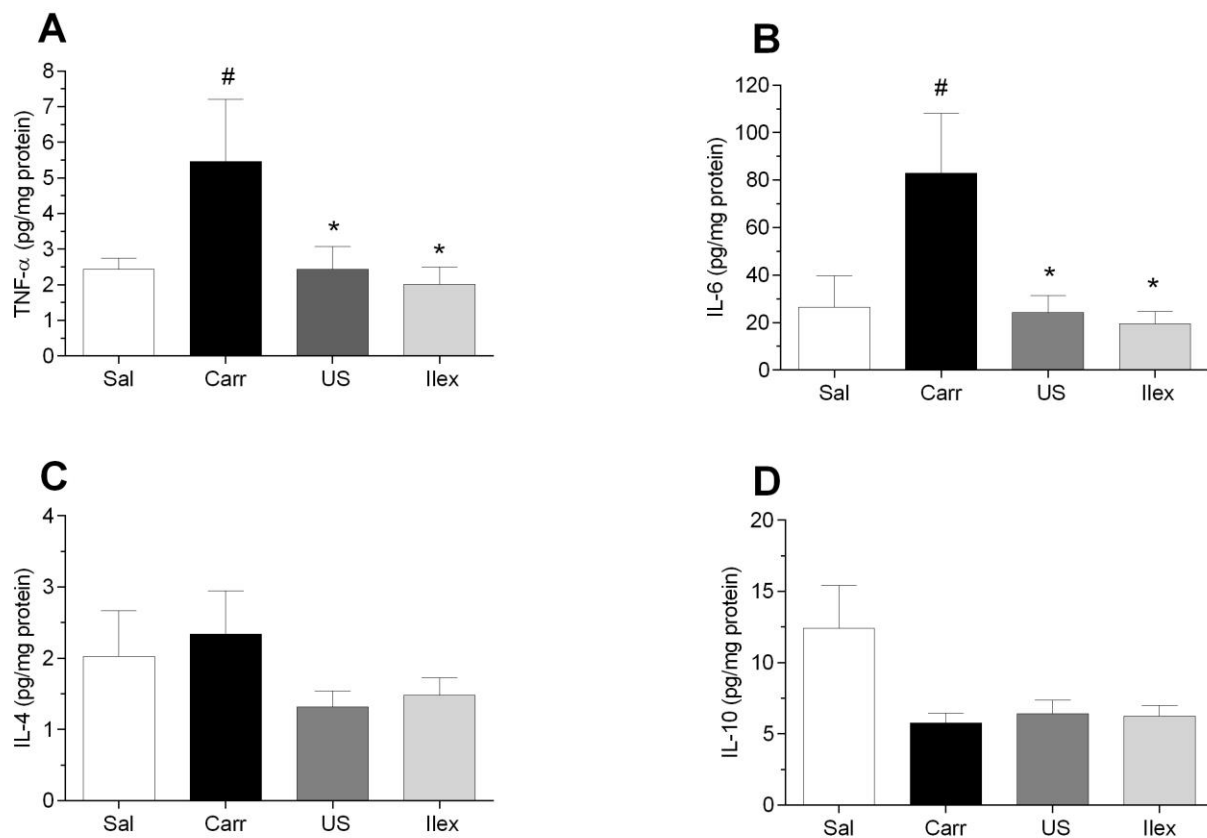


Figure 4

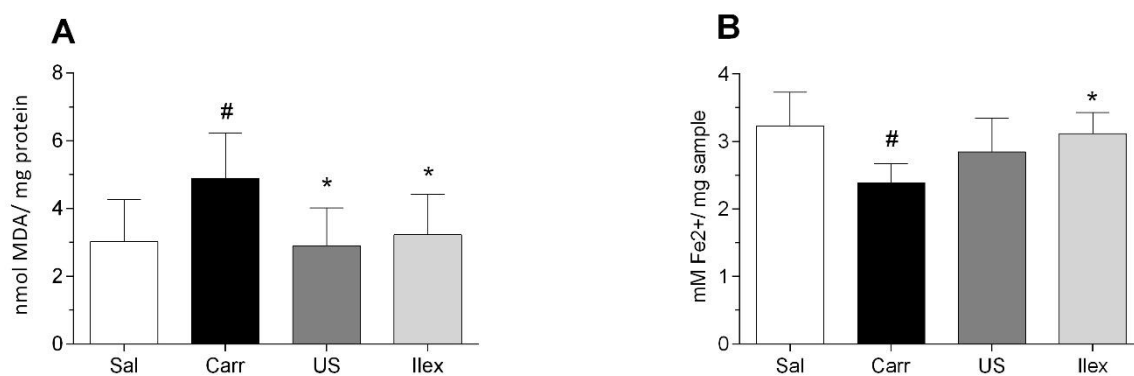
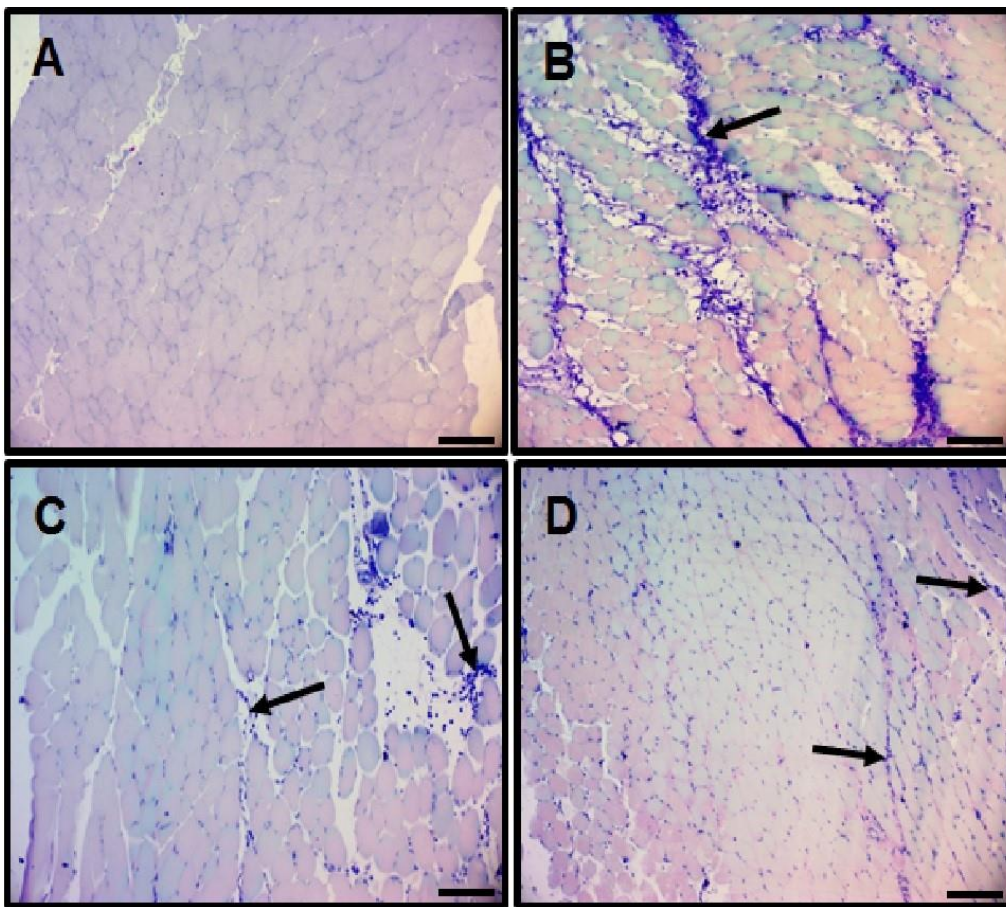


Figure 5



10x magnification image

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra claramente que a Carragenina foi capaz de gerar hiperalgesia mecânica e edema em ratos submetidos a uma lesão inflamatória muscular induzida por carragenina. Além disso, também demonstrou que o gel de US enriquecido com o extrato da planta *Ilex paraguariensis*, tratamento conhecido como fonoforese, possuiu maior efeito antihiperálgico e antiedematogênico, comparado ao tratamento somente com US e gel sem princípio ativo.

Ademais, os dados demonstraram que os efeitos do US e do US associado a *Ilex* podem ser, devido ao fato de que ambos os tratamentos diminuem as citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e reduzem a peroxidação lipídica da célula. Ainda, o US associado à *Ilex paraguariensis* apresentou um efeito antioxidante que também pode ser responsável pela redução da inflamação encontrada em ratos tratados com a fonoforese.

Assim, a fonoforese associada a *Ilex paraguariensis* pode ser uma alternativa terapêutica aos medicamentos para estimular caminhos antioxidativos e anti-inflamatórios que promovem o reparo tecidual e reduzem a dor muscular.

## REFERÊNCIAS

1. Maia Filho, A.L., et al., *Comparative study of the topical application of Aloe vera gel, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair in collagenase-induced rat tendinitis*. *Ultrasound Med Biol*, 2010. **36**(10): p. 1682-90.
2. Bracesco, N., et al., *Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview*. *J Ethnopharmacol*, 2011. **136**(3): p. 378-84.
3. Radhakrishnan, R., S.A. Moore, and K.A. Sluka, *Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats*. *Pain*, 2003. **104**(3): p. 567-77.
4. Loeser, J.D. and R.D. Treede, *The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology*. *Pain*, 2008. **137**(3): p. 473-7.
5. McMahon, S.B., W.B. Cafferty, and F. Marchand, *Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators*. *Exp Neurol*, 2005. **192**(2): p. 444-62.
6. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
7. Sherwood, E.R. and T. Toliver-Kinsky, *Mechanisms of the inflammatory response*. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2004. **18**(3): p. 385-405.
8. Nagata, K., et al., *Ultrasound modulates the inflammatory response and promotes muscle regeneration in injured muscles*. *Ann Biomed Eng*, 2013. **41**(6): p. 1095-105.
9. Juban, G. and B. Chazaud, *Metabolic regulation of macrophages during tissue repair: insights from skeletal muscle regeneration*. *FEBS Lett*, 2017. **591**(19): p. 3007-3021.
10. Barrot, M., *Tests and models of nociception and pain in rodents*. *Neuroscience*, 2012. **211**: p. 39-50.
11. Moreau, M.E., et al., *The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets*. *J Pharmacol Sci*, 2005. **99**(1): p. 6-38.
12. Basbaum, A.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of pain*. *Cell*, 2009. **139**(2): p. 267-84.
13. Schaible, H.G., et al., *The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1193**: p. 60-9.
14. Rittner, H.L., et al., *Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue--role of hypertonicity and the perineurium*. *Brain Behav Immun*, 2009. **23**(4): p. 548-57.
15. Engelmann, J., et al., *Pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide gel treatment reduces the expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury*. *Ultrasound Med Biol*, 2012. **38**(8): p. 1470-5.
16. Dohnert, M.B., et al., *Inflammatory cytokines content in Achilles tendinopathy after phonophoresis treatment combined with gold nanoparticles and diclophenac diethylammonium in rats*. *Inflammation*, 2015. **38**(3): p. 1044-9.
17. Kaplanski, G., et al., *IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(1): p. 25-9.
18. Kostek, M.C., et al., *IL-6 signaling blockade increases inflammation but does not affect muscle function in the mdx mouse*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2012. **13**: p. 106.
19. Schneider, S.P. and M. Lopez, *Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in physiologically identified interneurons of hamster spinal laminae III-V*. *Neuroscience*, 2002. **115**(2): p. 627-36.
20. Brickson, S., et al., *Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle*. *Med Sci Sports Exerc*, 2001. **33**(12): p. 2010-5.

21. Zortea, D., et al., *Effects of phonophoresis and gold nanoparticles in experimental model of muscle overuse: role of oxidative stress*. *Ultrasound Med Biol*, 2015. **41**(1): p. 151-62.
22. Filho, L.F.S., et al., *Effect of Pulsed Therapeutic Ultrasound and Diosmin on Skeletal Muscle Oxidative Parameters*. *Ultrasound Med Biol*, 2017.
23. Silveira, P.C., et al., *Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide phonophoresis on oxidative stress parameters after injury induced by eccentric exercise*. *Ultrasonics*, 2012. **52**(5): p. 650-4.
24. Elmarakby, A.A. and J.C. Sullivan, *Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy*. *Cardiovasc Ther*, 2012. **30**(1): p. 49-59.
25. Mittal, M., et al., *Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(7): p. 1126-67.
26. Souza, J., et al., *Effect of phonophoresis on skin permeation of commercial anti-inflammatory gels: sodium diclofenac and ketoprofen*. *Ultrasound Med Biol*, 2013. **39**(9): p. 1623-30.
27. Stevenson, D.D., *Diagnosis, prevention, and treatment of adverse reactions to aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. *J Allergy Clin Immunol*, 1984. **74**(4 Pt 2): p. 617-22.
28. Abreu, V.G., et al., *Anti-inflammatory effects in muscle injury by transdermal application of gel with *Lychnophora pinaster* aerial parts using phonophoresis in rats*. *BMC Complement Altern Med*, 2013. **13**: p. 270.
29. Mitragotri, S. and J. Kost, *Low-frequency sonophoresis: a review*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004. **56**(5): p. 589-601.
30. Chen, S., et al., *Transdermal delivery of isoniazid and rifampin in guinea pigs by electro-phonophoresis*. *Drug Deliv*, 2017. **24**(1): p. 467-470.
31. Lakshmanan, S., et al., *Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014. **71**: p. 98-114.
32. Leelarungrayub, J., J. Manorsoi, and A. Manorsoi, *Anti-inflammatory activity of niosomes entrapped with Plai oil (*Zingiber cassumunar* Roxb.) by therapeutic ultrasound in a rat model*. *Int J Nanomedicine*, 2017. **12**: p. 2469-2476.
33. Colpo, A.C., et al., *Compounds from *Ilex paraguariensis* extracts have antioxidant effects in the brains of rats subjected to chronic immobilization stress*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2017. **42**(11): p. 1172-1178.
34. Colpo, A.C., et al., *Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals*. *Food Chem*, 2016. **209**: p. 185-95.
35. Lima, M.E., et al., **Ilex paraguariensis* Extract Increases Lifespan and Protects Against the Toxic Effects Caused by Paraquat in *Caenorhabditis elegans**. *Int J Environ Res Public Health*, 2014. **11**(10): p. 10091-104.
36. Mateos, R., et al., *Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity*. *Food Chem*, 2018. **241**: p. 232-241.
37. Schinella, G., et al., *An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation*. *Planta Med*, 2014. **80**(12): p. 961-8.
38. Gomez-Juaristi, M., et al., *Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans*. *Food Chem*, 2018. **240**: p. 1028-1038.
39. Bouayed, J. and T. Bohn, *Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses*. *Oxid Med Cell Longev*, 2010. **3**(4): p. 228-37.
40. Matheus, J., et al., *Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão*. *Braz J Phys Ther*, 2008. **12**: p. 241-247.



41. Alfredo, P.P., et al., *Effects of phonophoresis with Arnica montana onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: an experimental study*. Ultrasonics, 2009. **49**(4-5): p. 466-71.
42. Merini, L.R., et al., *Attenuation of adjuvant-induced arthritis in rats by phonophoresis with an aqueous gel of the Amazonian plant Elaeoluma nuda (Sapotaceae)*. Cytokine, 2014. **65**(2): p. 231-5.
43. Vieira, M.A., et al., *Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (Ilex paraguariensis) residue*. J Food Sci, 2010. **75**(3): p. C280-5.
44. Ferrari, R. and A.S. Russell, *Regional musculoskeletal conditions: neck pain*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2003. **17**(1): p. 57-70.
45. Zimmermann, M., *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*. Pain, 1983. **16**(2): p. 109-110.
46. Chaplan, S.R., et al., *Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw*. J Neurosci Methods, 1994. **53**(1): p. 55-63.
47. da Silva, M.D., et al., *Diacerein reduces joint damage, pain behavior and inhibits transient receptor potential vanilloid 1, matrix metalloproteinase and glial cells in rat spinal cord*. Int J Rheum Dis, 2017. **20**(10): p. 1337-1349.
48. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction*. Anal Biochem, 1979. **95**(2): p. 351-8.
49. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Anal Biochem, 1996. **239**(1): p. 70-6.
50. Chazaud, B., *Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: application to exercise-induced muscle damage management*. Immunol Cell Biol, 2016. **94**(2): p. 140-5.
51. Peake, J.M., et al., *Muscle damage and inflammation during recovery from exercise*. J Appl Physiol (1985), 2017. **122**(3): p. 559-570.
52. Scott, A., et al., *What do we mean by the term "inflammation"? A contemporary basic science update for sports medicine*. Br J Sports Med, 2004. **38**(3): p. 372-80.
53. Draper, D.O., J.C. Castel, and D. Castel, *Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound*. J Orthop Sports Phys Ther, 1995. **22**(4): p. 142-50.
54. O'Brien, W.D., Jr., *Ultrasound-biophysics mechanisms*. Prog Biophys Mol Biol, 2007. **93**(1-3): p. 212-55.
55. Raphael, A.P., et al., *Recent advances in physical delivery enhancement of topical drugs*. Curr Pharm Des, 2015. **21**(20): p. 2830-47.
56. Rosim, G.C., et al., *Diclofenac phonophoresis in human volunteers*. Ultrasound Med Biol, 2005. **31**(3): p. 337-43.
57. Martins, C.N., et al., *Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats*. Physiotherapy, 2016. **102**(4): p. 377-383.
58. Tidball, J.G., *Inflammatory cell response to acute muscle injury*. Med Sci Sports Exerc, 1995. **27**(7): p. 1022-32.
59. Tidball, J.G., *Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration*. Compr Physiol, 2011. **1**(4): p. 2029-62.
60. Halliwell, B.G., J., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 6<sup>a</sup> ed2007, Oxford University.
61. Meyer, M., R. Schreck, and P.A. Baeuerle, *H2O2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor*. The EMBO Journal, 1993. **12**(5): p. 2005-2015.
62. Aldrich, M.B. and E.M. Sevick-Muraca, *Cytokines are systemic effectors of lymphatic function in acute inflammation*. Cytokine, 2013. **64**(1): p. 362-9.

62. Parish, C. R. *Heparan sulfate and inflammation*. *Nat Immunol*, 2005. **6**, p. 861-862,
63. Rao, R.; Nanda, S. *Sonophoresis: recente advancements and future trend*. *J. Pharmacy and Pharmacology*, 2009. **61**: p. 689-705.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais/Unipampa

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

**Pró-Reitoria de Pesquisa**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Fone: (55) 3413-4321, E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

---

### **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: **022/2016**

Título: **Efeito do ultrassom terapêutico associado ao gel de *Ilex paraguariensis* sobre inflamação muscular induzida por carragenina em ratos**

Data da aprovação: **18.08.2016**

Período de vigência do projeto: 15.12.2017

Pesquisador: Morgana Duarte da Silva

Campus: **Uruguaiana**

Telefone: **55 9152-8089**

E-mail: [morganasilva@unipampa.edu.br](mailto:morganasilva@unipampa.edu.br)



**Prof. Dr. Vanusa Manfredini**  
**Coordenadora CEUA/UNIPAMPA**