

Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (*in vivo*) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom

Histological analysis of healthy epithelium of Wistar rats *in vivo* irradiated with different intensities of therapeutic ultrasound

Daiane M. De Bem¹, Carlos D. Maciel², José A. Zuanon³, Carlos B. Neto³, Nivaldo A. Parizotto⁴

Resumo

Contextualização: O Ultrassom (US) é um dos recursos físicos amplamente utilizado e pesquisado nos tratamentos de fisioterapia. Sabe-se que diante de uma escassa literatura sobre efeitos do US em tecidos sadios, muitos profissionais fisioterapeutas acabam realizando aplicações infundadas de métodos e parâmetros. **Objetivo:** Avaliar possíveis alterações histológicas e morfométricas do tecido sadio *in vivo* de ratos Wistar irradiados com diferentes intensidades de US. **Métodos:** Trinta ratos da linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de seis animais cada foram tratados na região dorsal do lado direito numa área de 4cm². O lado esquerdo serviu como controle. O tratamento foi feito durante quatro dias com 2 minutos de irradiação. Verificou-se a intensidade de saída com dosímetro de precisão antes das aplicações. Analisou-se a histologia e a morfometria por meio do *software* Image Tool. **Resultados:** Observou-se um discreto infiltrado inflamatório e adelgaçamento das fibras da derme, principalmente dos grupos irradiados com 1.5 e 2W/cm². Notou-se também um aumento na espessura da epiderme nas amostras dos animais irradiados. Para avaliar os resultados quantitativos, utilizou-se como análise estatística ANOVA *one way* e o teste *post hoc* de Tukey. Na espessura da epiderme, obtiveram-se diferenças significativas entre grupo controle e os grupos irradiados com 1.0, 1.5 e 2.0W/cm². **Conclusão:** Sob ação do US nas doses maiores houve alterações na epiderme e derme, respectivamente, o aumento da espessura e proliferação com adelgaçamento das fibras colágenas, o que alerta para possíveis implicações do uso do US em estética.

Palavras-chave: ultrassom terapêutico; dosimetria; efeitos colaterais; danos teciduais.

Abstract

Background: Ultrasound (US) is a widely used and studied resource for physical therapy treatments. Given the scarcity of studies on the effects of US on healthy tissue, many physical therapy professionals make unfounded decisions regarding its methods and parameters of application. **Objectives:** The possible histological and morphometric changes in the healthy tissue of Wistar rats *in vivo* irradiated with different intensities of US were evaluated. **Methods:** Thirty Wistar rats, randomly distributed among five groups of six animals each, were treated on the right side of the dorsal region, over an area of 4 cm². The left side served as a control. The treatment was applied over a four-day period, with two mins. of daily irradiation. The output intensity was checked using a precision dosimeter before the applications. Histological and morphometric analyses were performed using the Image Tool software. **Results:** There were slight inflammatory infiltration and thinning of the dermis fibers, particularly in the groups irradiated with 1.5 and 2 W/cm². There was also thickening of the epidermis in the samples from the irradiated animals. To evaluate the quantitative results, the statistical analyses consisted of one-way ANOVAs with the *post-hoc* Tukey tests. There were significant differences in epidermis thicknesses between the control group and the groups irradiated with 1.0, 1.5 and 2.0 W/cm². **Conclusions:** Higher doses of US produced changes in the epidermis and dermis, i.e. increased thickness and collagen fiber thinning and proliferation, respectively. These results serve as a warning of the possible implications of therapeutic ultrasound use in esthetics.

Key words: Therapeutic ultrasound; dosimetry; side effects; tissue damage.

Recebido: 28/10/08 – **Revisado:** 25/03/09 – **Aceito:** 22/06/09

¹ Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), São Carlos (SP), Brasil

² Departamento de Engenharia Elétrica, EESC, USP

³ Departamento de Patologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara (SP), Brasil

⁴ Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos (SP), Brasil

Correspondência para: Nivaldo Antonio Parizotto, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos(UFSCar), Via Washington Luiz, Km 235, CEP 13.565-905, São Carlos (SP) Brasil, e-mail: parizoto@ufscar.br

Introdução

A energia ultrassônica é um dos recursos físicos amplamente utilizado nos tratamentos de fisioterapia, estéticos e de diagnósticos médicos¹. Vários pesquisadores evidenciaram o aumento da síntese de colágeno pela aplicação do ultrassom (US), acelerando assim a cicatrização tecidual em diversos tipos de lesões². Com a estimulação do US em células que produzem colágeno tipo I e II com diferentes intensidades, Tsai et al.³ comprovou um aumento significativo na síntese das mesmas quando comparadas com as do grupo controle. Iwashina et al.⁴ pesquisaram o estímulo do US pulsado com diferentes intensidades nas células *in vitro* do disco intervertebral de coelhos (7.5 até 120 mW/cm²) média espacial e média temporal (I_{SATA} , spatial average temporal average intensity), constataram aumento significativo da síntese de colágeno pelas células do disco intervertebral. Esse resultado foi observado também nos grupos irradiados com menores intensidades. Por outro lado, há uma escassa literatura sobre os efeitos do US em tecidos sadios, condição básica dos tratamentos estéticos⁵, como também em muitos desses efeitos terapêuticos aplicados clinicamente, ainda não se sabe claramente quais são os mecanismos de ação⁶.

Gonçalves et al.⁷ estudaram o risco potencial do US nas terapias dermatológicas, estéticas e suas implicações no sistema cardiovascular. Demonstraram alterações dos parâmetros hemodinâmicos; níveis de lipídios e glicose séricos, além de produzir atenuação da vasodilatação induzida por adenosina, um possível fator para a presença de riscos cardiovasculares. Pesquisando a indução do US na desgranulação dos mastócitos da pele⁵, observou-se a ocorrência de lesão nas células dos mastócitos quando aplicado com intensidade de 3,0W/cm². Em outra abordagem, Valentini, Maciel e Parizotto⁸ estudaram a calibragem dos aparelhos de US, evidenciando a importância da conformidade dos equipamentos de US terapêutico com a NBR-IEC 1689. Neste estudo foram apresentados relatos de que os aparelhos de US no Brasil e no mundo não atendem às especificações dos parâmetros pedidos pela norma.

Dessa forma, torna-se preocupante a popularização e a crescente procura do uso do US nos tratamentos estéticos. Sabe-se que em tratamentos estéticos são utilizadas intensidades mais altas (2,5 a 3,0 W/cm²) em maior número de aplicações. Esses fatores combinados podem aumentar o risco de lesão tecidual. A principal motivação do presente estudo foi a hipótese dos possíveis riscos das aplicações do US nos tratamentos estéticos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar histologicamente possíveis alterações do tecido sadio *in vivo* de ratos Wistar irradiados com diferentes intensidades, analisando os cortes histológicos de forma qualitativa e quantitativa.

Sistema tegumentar

O sistema tegumentar é formado pela epiderme e derme. A primeira é constituída por células epiteliais chamadas de queratinócitos que são produzidas na camada basal, e a derme é responsável pela resistência e elasticidade da pele⁹, (Figura 1). Sabe-se que as camadas da pele são avasculares, com isso, a única forma de nutrição é feita por difusão através dos leitos capilares da derme, que se apresenta bem vascularizada⁹.

Na camada basal, ocorre uma constante renovação celular, com intensa atividade mitótica. Essas células sofrem diferenciação, sendo empurradas para a camada espinhosa e lúcida até chegarem à epiderme. Tais células formam de quatro a seis camadas sobrepostas de queratinócitos, conferindo uma resistência mecânica à epiderme. Na camada granular, são sintetizadas substâncias que asseguram a coesão ao estrato córneo. A camada córnea é a mais externa, constituída por células anucleadas e achatadas chamadas de corneócitos¹⁰ (Figura 1).

Ultrassom

A terapia ultrassônica caracteriza-se por apresentar vibrações mecânicas de alta frequência, acima de 20 KHz¹¹. A principal forma de propagação da onda sonora no tecido biológico é longitudinal, em que as partículas vibram paralelamente à direção de propagação da onda¹². Conforme Hedrick, Hykes e Starchman¹³, a onda se propaga à medida que sofre alterações de pressão, ocorrem regiões de alta pressão (maior compressão) e regiões de baixa pressão (rarefação). O campo acústico do US, na parte mais próxima do transdutor, chamada de zona

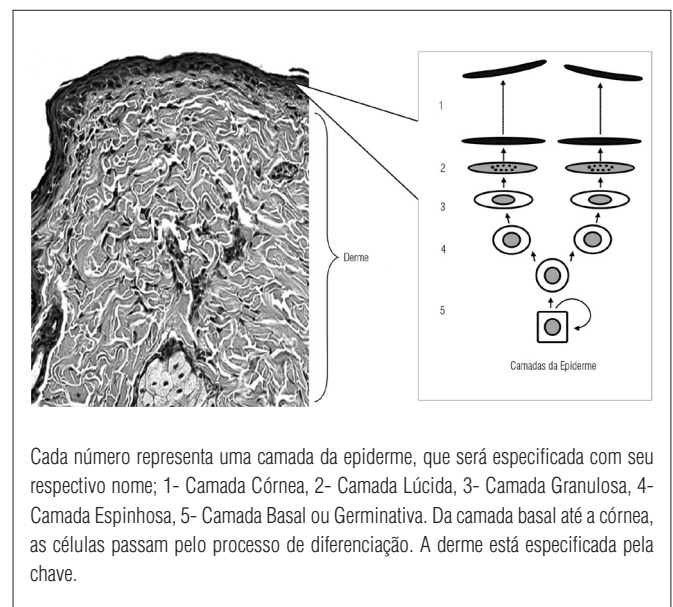


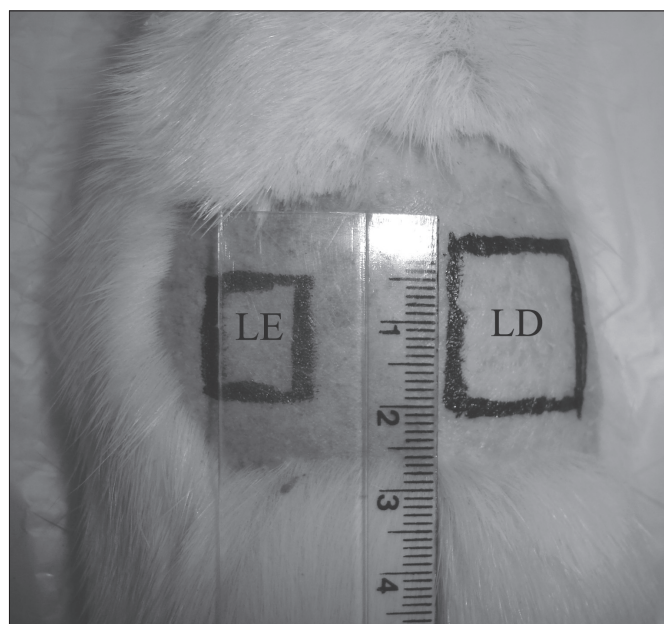
Figura 1. Mostra um tecido epitelial normal sem alterações. Ao lado, encontram-se as seis camadas da epiderme.

Fresnel, apresenta-se como um feixe bem irregular, com picos espaciais e temporais de energia. À medida que o feixe se afasta do transdutor, começa a ter um comportamento mais regular, chamado de campo distante ou zona Fraunhofer¹³. Diante

disso, sabe-se que os tratamentos de fisioterapia são realizados no campo próximo, o que dificulta mensurar o comportamento da onda no tecido biológico.

Tabela 1. Separação dos grupos para realização do experimento com suas respectivas intensidades e frequências utilizadas.

| Grupo | LE | LD | I(W/cm ²) |
|-------|----------|--------------|-----------------------|
| I | Controle | Sham | 0,0 |
| II | Controle | Experimental | 0,5 |
| III | Controle | Experimental | 1,0 |
| IV | Controle | Experimental | 1,5 |
| V | Controle | Experimental | 2,0 |



LE representa a região denominada de controle; LD é a região experimental.

Figura 2. Região dorsal tricotomizada com a marcação da respectiva área a ser estudada.



Figura 3. Equipamentos utilizados para aferição das diferentes intensidades de cada grupo mais o equipamento de US utilizado no experimento.

Materiais e métodos ::::

Utilizou-se um total de 30 ratos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, mammalia*), adultos, da linhagem Wistar, machos, com uma massa corporal de 195,06 g±20,9. No presente estudo, os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de seis animais. Cada grupo foi irradiado com diferente intensidade, conforme a Tabela 1.

O local escolhido para a realização das aplicações do US foi a região dorsal (Figura 2), sendo dividida em duas partes; lado esquerdo (LE) controle do próprio animal e lado direito (LD) experimental. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) sob protocolo número 007/2008. Inicialmente os animais passaram pelo processo de adaptação com o pesquisador durante uma semana a fim de evitar um nível de estresse elevado e assegurando uma confiabilidade nos resultados do trabalho. Logo após, os animais foram colocados na cuba, onde foram anestesiados com éter etílico para realização da tricotomia digital da região a ser tratada (Figura 2). Durante dois dias, foi simulado o tratamento – com o US desligado – com o objetivo de adaptar os animais ao procedimento.

O tratamento foi realizado durante quatro dias consecutivos, com duração de 2 minutos de irradiação em uma área de 4cm². O aparelho de US utilizado foi da marca BIOSET, Sonacel Expert, de frequência 3 MHz (Figura 3). Antes de cada aplicação, foram realizados testes de aferição em cada grupo a fim de se obter maior precisão das diferentes intensidades irradiadas. Para isso, foi utilizado um dosímetro de precisão (balança), ULTRASOUND POWER METER UPT-1 MODEL (Figura 3), para determinar a intensidade média espaço-temporal.

Após a quarta aplicação do tratamento, os animais foram anestesiados por meio da combinação de cetamina[®] (35 mg/ Kg) e xilazina[®] (4 mg/Kg), injetada de forma intramuscular na coxa. Em seguida, deu-se início à retirada do tecido da região dorsal, epiderme e derme. Os animais ainda anestesiados foram submetidos à eutanásia com guilhotina por um profissional treinado. Após a coleta, as amostras foram colocadas nos cassetes com papel filtro e mergulhadas em formaldeído 10% não tamponado por 24 horas. Passaram pela tramitação padrão para obtenção dos cortes histológicos incluídos em parafina e posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (HE).

Os cortes histológicos foram analisados microscopicamente de forma qualitativa a fim de avaliar comparativamente a estrutura do tecido epitelial no grupo controle e experimental.

Essas análises foram realizadas no laboratório de Odontologia de Fisiologia e Patologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Araraquara (SP), Brasil. Para obtenção das imagens histológicas foi utilizado o microscópio Olympus BX51 e a câmera digital da marca Olympus Camedia C-5060, 5.1 mega pixels.

Para obtenção das medidas da espessura da epiderme de cada uma das amostras, foi realizada uma análise quantitativa das imagens dos cortes histológicos, utilizando o *software* UTHSCSA Image Tool¹⁴. O *software* foi calibrado utilizando-se a imagem de uma régua fotografada no mesmo aumento, e todas as imagens foram analisadas mediante essa calibração. Foram realizadas quatro medidas da espessura da epiderme em regiões aleatórias. Tal procedimento foi feito nas seis amostras de cada grupo, obtendo-se 120 medidas para cada lado (LE e LD). Os resultados de cada grupo foram submetidos à análise estatística por meio do teste de variância ANOVA *one way* com nível de significância de 1% e complementado com o *post hoc* de Tukey, para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos grupos. A análise dos dados quantitativos foi realizada com a biblioteca de estatística do Excel e o programa Bioestat 3.0.

Resultados

Resultados qualitativos

Os cortes histológicos foram observados ao microscópio por um patologista experiente, e foram constatadas alterações teciduais nos cortes das amostras irradiadas com US. A Figura 4 mostra os cortes histológicos dos grupos III, IV e V. As imagens da esquerda (A, C e E) são as amostras controle de cada um dos grupos. As imagens da direita (B, D e F) são as amostras dos grupos experimentais. No grupo II irradiado com 0,5W/cm², não houve alteração. As alterações foram visíveis a partir das amostras irradiadas com 1W/cm², quando comparadas com o controle. Observa-se aumento na espessura da epiderme, infiltrado inflamatório e uma proliferação das fibras colágenas, que se apresentam menores e adelgaçadas.

Resultados quantitativos

O teste ANOVA indicou haver diferença entre os grupos estudados. O teste de Tukey indicou que o grupo I possui a menor média na espessura da epiderme (29,25µm±6,53), quando comparado com os grupos III (40,62µm±9,49), IV (45,32µm±9,43) e V (43,91µm±9,55), e as diferenças foram significativas (p≤0,01). Esses dados mostraram que os grupos irradiados com intensidades mais elevadas apresentaram as maiores médias. Observa-se, na Figura 5, uma

tendência ao aumento progressivo da espessura da epiderme quando correlacionado com as intensidades utilizadas em cada grupo. Constata-se que ocorre uma saturação desse aumento após 1W/cm², levando a um patamar com doses superiores.

Discussão

A alta intensidade utilizada em tratamentos estéticos é uma das principais preocupações deste estudo. Sabe-se que

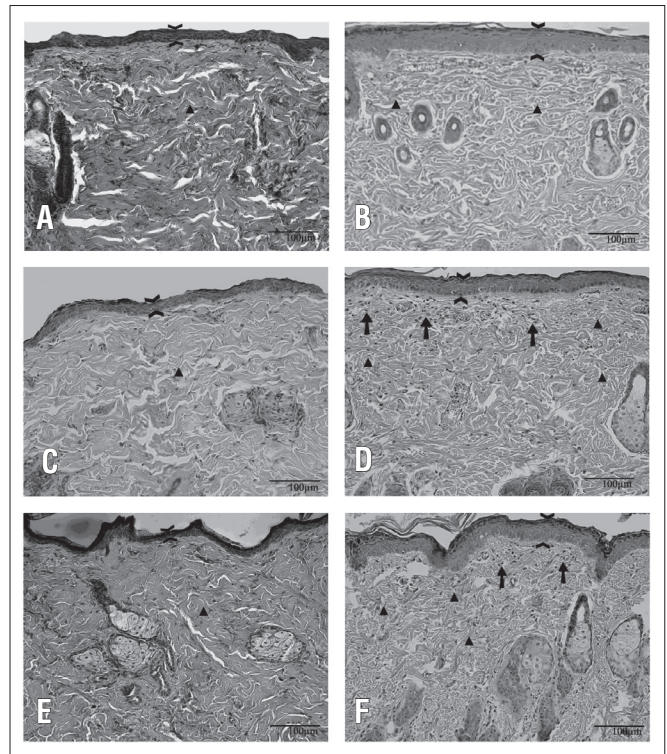


Figura 4. Em A - Mostra o corte histológico da amostra do grupo III, que não recebeu irradiação LE. O tecido encontra-se normal, sem alterações, com um aumento de 200x. O triângulo serve para comparar as fibras dos grupos controle e experimental. Em B - Mostra o corte histológico da amostra do grupo III, irradiado com 1,0 W/cm² LD, com aumento de 200x. O tecido encontra-se com alterações, as pontas de setas indicam aumento da espessura da epiderme, e o triângulo indica adelgaçamento das fibras. Em C - Mostra o corte histológico da amostra do grupo IV, (controle) LE. Em D - Mostra o corte histológico da amostra do grupo IV, LD, irradiado com 1,5 W/cm². Observou-se aumento na espessura da epiderme indicado apenas com pontas de flecha, o adelgaçamento das fibras na região da derme marcado com triângulos e um discreto infiltrado inflamatório representado pelas flechas inteiras, quando comparado com as figuras do grupo controle LE. Em E - Mostra o corte histológico da amostra do grupo V, LE (controle), o tecido encontra-se sem alteração, com aumento de 200x. Em F - Mostra o corte histológico da amostra do grupo V, LD irradiado com intensidade de 2,0 W/cm², apresentando as mesmas alterações do corte dos grupos III e IV, LD.

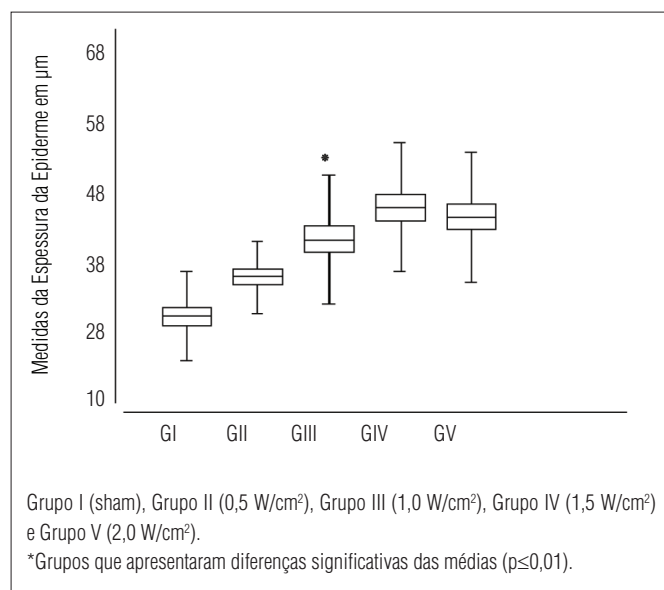


Figura 5. Gráfico Box-Plot mostrando a diferença das médias das medidas da espessura da epiderme em μm de cada grupo, com desvio-padrão e valores de máximos e mínimos.

o US é utilizado com muita frequência nas clínicas para fins terapêuticos e estéticos. Entretanto, pesquisas revelam dados infundados referentes à intensidade, tempo de exposição e às condições de calibragem dos aparelhos de US¹⁵. Guirro et al.¹⁶ pesquisou a intensidade acústica média temporal e média espacial dos aparelhos de US utilizados nas clínicas da cidade de Piracicaba, com o objetivo de analisar se haveria alguma diferença entre a intensidade que o painel do equipamento registra e a intensidade distribuída do transdutor. Este estudo mostrou que a maioria dos equipamentos emitiam energia acima de 30%, ultrapassando o valor das especificações propostas pela norma. Noutro estudo, observou-se que um terço dos equipamentos de US estavam fora dos padrões, reduzindo a confiabilidade na aplicação e nos resultados¹⁷.

Preocupado em avaliar o efeito e o risco potencial do US em altas intensidades no sistema venoso, Araújo et al.¹⁸ realizou aplicações na veia auricular de coelhos. Constatou-se que, com intensidade de 3W/cm², no modo contínuo, houve a indução de trombose venosa e um aumento dos linfócitos de forma significativa, podendo ser observada macroscopicamente por apresentar edema, eritema e calor. As imagens do trabalho evidenciam lesão na parede vascular com extravasamento de células.

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que a aplicação do US também tinha gerado alterações no tecido epitelial sadio de ratos Wistar. Obteve-se um notório aumento na espessura da epiderme. Isso provavelmente ocorreu por estímulo na mitose das células da camada basal da epiderme. As evidências encontradas nos resultados apresentaram uma relação com o trabalho realizado por Silva¹⁹, que

avaliou o efeito do US pulsado na atividade mitótica androgênica das células de Leydig. Ele constatou um aumento na velocidade do ciclo celular. Tais evidências mostraram o papel da camada proliferativa da epiderme no processo de renovação celular, susceptível à influência da energia do US.

Boucaud et al.²⁰ encontraram alterações no tecido epitelial. Eles pesquisaram o efeito biológico que o US pode causar com a fonoforese. As amostras de pele *in vitro* que foram irradiadas acima de 2,5 W/cm² apresentaram lesão. Esses autores realizaram estudos em tecido epitelial de ratos *in vivo* e constataram lesões mais profundas, entre as quais necrose capilar e muscular. Tais dados corroboram os achados deste trabalho.

Conforme a análise histológica do presente estudo, também foram observadas alterações das fibras colágenas localizadas na região da derme nas amostras irradiadas a partir de 1W/cm². Isso leva a considerar o adelgaçamento das fibras como um mecanismo de proliferação de fibras colágenas, levando a apresentar no local fibras mais jovens e com grande probabilidade de redução da resistência mecânica deste tecido. Resultados parecidos foram constatados no trabalho realizado por Visnardi²¹, que pesquisou o efeito do US de baixa intensidade em colágeno da pele sadia de ratos e mostrou, por meio da análise de birrefringência textural (intrínseca), que houve uma desorganização das fibras colágenas, principalmente na camada mais profunda da derme.

Outra alteração tecidual observada neste estudo foi a presença de um discreto infiltrado inflamatório abaixo da epiderme das amostras irradiadas acima de 1W/cm², o que pode estar relacionado com o aumento da temperatura tecidual local. Esse aumento de temperatura pode se relacionar ao comportamento do campo acústico do US que se apresenta de forma irregular. Essa irregularidade pode apresentar picos de intensidade, resultando em maior aquecimento em algumas regiões do tecido.

Neste trabalho, as biópsias foram realizadas no mesmo dia após a última aplicação do US. Com isso, pode-se considerar que as alterações obtidas do tecido epitelial são de um caráter mais agudo. No entanto, é importante salientar que elas ocorreram com apenas quatro dias de aplicação. Já nos tratamentos estéticos, geralmente são realizadas mais de 20 sessões com intensidades bastante altas (nas faixas entre 2,5 à 3,0W/cm²), maiores do que as utilizadas neste trabalho.

Conforme os resultados morfométricos apresentados na Figura 5, observou-se um aumento linear em relação às medidas da espessura da epiderme até a intensidade de 1,0W/cm². Nos grupos irradiados com 1,5 e 2,0W/cm², esse aumento foi mantido. Aparentemente houve uma resposta máxima de mitose nas células da camada basal, resultando em espessuras semelhantes ao final dos quatro dias de tratamento. Em um trabalho de revisão de literatura sobre

dosimetria do US²², os autores relatam que as altas dosagens, como 1,5 e 2,0W/cm², podem ser menos efetivas do que as doses baixas. Além disso, os autores chamam a atenção para o fato de que nas aplicações clínicas se observam evidências de que as altas intensidades não são tão eficientes. Diante disso, sugerem que os profissionais preferencialmente utilizem subdoses ao invés de superdosagens, por serem mais efetivas e oferecerem menor risco de lesão.

Além de apresentar uma escassa literatura sobre efeitos do US no tecido sadio, não se sabe bem ao certo que fatores causam essas modificações no tecido biológico. A maioria dos efeitos atribuídos ao tratamento ultrassônico são dependentes de mediadores químicos cujos mecanismos de ação no tecido biológico não são bem conhecidos. Existem muitas divergências na literatura²³, portanto, sugere-se, com os resultados deste estudo, que haja uma grande precaução no uso do US, especialmente nos tratamentos estéticos, em que as doses são elevadas, com risco de ocasionar lesões, algumas delas internas, cujas conseqüências podem aparecer tardiamente.

Conclusão

O presente estudo experimental demonstra que o US contínuo (de 3MHz, com aplicações de 2 minutos de duração e nas intensidades acima de 1W/cm² até 2W/cm²) no tecido epitelial sadio de ratos Wistar provocou alterações no tecido biológico. Tais alterações se caracterizaram por um aumento significativo na espessura da epiderme, presença de um discreto infiltrado inflamatório abaixo da epiderme e também uma alteração das fibras colágenas, tornando-as mais delgadas e numerosas. Portanto, tornam-se relevantes maiores estudos do US aplicado em tecidos sadios, para avaliar as possíveis alterações morfológicas e bioquímicas, além disso, o estudo dos mecanismos de ação que estariam gerando tais modificações, por meio de diferentes técnicas. Cuidados são importantes na aplicação do US.

Sugerem-se estudos que observem os efeitos a longo prazo das aplicações de US, a fim de verificar se as alterações permanecem e qual a aparência que elas apresentam após um período mais prolongado de tratamento.

Referências bibliográficas

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Ultra-som sistemas de fisioterapia: prescrições para desempenho e métodos de medição na faixa de frequência de 0,5 MHz a 5 MHz. Rio de Janeiro: ABNT; 1998.
2. Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. 1987;73:116-20.
3. Tsai WC, Pang JHS, Hsu CC, Chu NK, Lin MS, Hu CF. Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor β . *J Orthop Res*. 2006;24(6):1310-6.
4. Iwashina T, Mochida J, Miyazaki T, Watanabe T, Iwabuchi S, Ando K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate. *Biomaterials*. 2006;27(3):354-61.
5. Dyson M, Luke DA. Induction of mast cell degranulation in skin by ultrasound. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 1986;33(2):194-201.
6. ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;93(1-3):111-29.
7. Gonçalves WLS, Cirqueira JP, Soares LS, Bissoli NS, Moysés MR. Utilização da terapia ultra-sônica de baixa intensidade na redução da lipodistrofia ginecoidal: uma terapia segura ou risco cardiovascular transitório: Um estudo pré-clínico. *An Bras Dermatol*. 2005;80(Suppl 3):S352-9.
8. Valentini EV, Maciel CD, Parizotto NA. Importância da conformidade dos equipamentos de ultra-som terapêutico com a NBR-IEC 1689. *Fisioter Bras*. 2006;7(1):59-65.
9. Spence AP. Anatomia humana básica. São Paulo: Manole; 1991.
10. Gartner LP, Hiatt JL. Atlas colorido de histologia. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
11. Zagzebski JA. Essentials of ultrasound physics. Saint Louis: Mosby; 1996.
12. Leighton TG. What is ultrasound? *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;93(1-3):3-83.
13. Hedrick WR, Hykes DL, Starchman DL. Ultrasound physics and instrumentation. Saint Louis: Mosby; 2005.
14. Dove SB. UTHSSA Image Tool [homepage na internet]. Texas: The University of Texas Health Science Center, Inc.; c1996 [atualizada em 2002; acesso em 26/02/2007]. Disponível em: <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>
15. Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40(12):1331-6.
16. Guirio R, Serrão F, Elias D, Bucalon AJ. Calibration of therapeutic ultrasound equipment. *Physiotherapy*. 1997;83(8):419-23.
17. Artho PA, Thyne JG, Warring BP, Wills CD, Brismee JM, Latman NS. A calibration study of therapeutic ultrasound units. *Phys Ther*. 2002;82(3):257-63.
18. Araujo M, Baptista-Silva JCC, Gomes PO, Campos HO, Novo NF, Juliano Y. Efeitos do ultra-som de baixa intensidade na veia auricular de coelhos. *Acta Cir Bras*. 2003;18(1):25-31.
19. Silva RF. Efeito da estimulação ultrassônica sobre a espermatogênese de ratos pré-púberes e adultos. Estudo experimental [dissertação]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo; 2007.

20. Boucaud A, Montharu J, Machet L, Arbeille B, Machet MC, Patat F, et al. Clinical, histologic and electron microscopy study of skin exposed to low-frequency ultrasound. *Anat Rec.* 2001;264(1):114-9.
21. Visnardi AR. Efeito do ultra-som de baixa intensidade no colágeno da pele sadia de ratos [dissertação]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo; 2007.
22. Blume K, Matsudo E, Lopes MS, Lopes LG. Dosimetria proposta para o tratamento por ultra-som – uma revisão de literatura. *Fisioter Mov.* 2005;18(3):55-64.
23. Lopes LG, Bertolini SMMG, Martins ER, Gewehr P, Lopes MS. Análise morfométrica de tecido muscular de coelhos submetido a ultra-som pulsado e contínuo de 1 MHz. *Fisioter Pesqui.* 2005;12(3):15-21.