

Artigo original

Influência das propriedades antiinflamatórias do ultra-som terapêutico no tratamento de lesões musculares

Influence of anti-inflammatory properties of ultrasound therapy in muscle injuries treatment

Humberto de Sousa Fontoura*, Ricardo Bentes de Azevedo*

.....
*Universidade de Brasília – UnB

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antiinflamatórias do ultra-som pulsado no tratamento de inflamação aguda causadas por lesão muscular traumática em ratos Wistar. Foram utilizados ratos Wistar adultos e aparelho de ultra-som Sonopulse III, frequência de 1.0 MHz, modo pulsado, intensidade de 0,5W/cm². Os animais foram divididos em 3 grupos G1T = Grupo 1 tratado, G1C = Grupo 1 controle e G2 controle positivo. Os resultados foram obtidos por microscopia óptica, morfometria e analisados estatisticamente por análise de variância e teste t de Student, $p < 0,05$ (5%). Nas primeiras 72 horas após o trauma muscular, foi observado intenso processo inflamatório em todos os grupos estudados, não havendo diferença morfológica entre os grupos. Após 96hs de tratamento é possível observar uma intensa melhora no G1T e uma melhora moderada no G1C. A análise morfométrica na comparação entre o tratamento com ultra-som com gel comercial e seu controle interno mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$). A comparação entre o controle interno e o controle externo mostra que também houve uma melhora considerável ($p < 0,05$) sobretudo quando comparado após 96hs de tratamento. Estes achados permitem concluir que o ultra-som terapêutico tem ação efetiva na diminuição do processo inflamatório após lesão muscular traumática.

Palavras-chave: ultra-som, inflamação, lesão muscular.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the anti-inflammatory properties of pulsed ultrasound in the treatment of acute inflammation caused by traumatic muscle injury in Wistar rats. Wistar adult rats and ultrasound Sonopulse III, 1.0 MHz frequency, pulsed way, 0,5W/cm² intensity were used. The animals were divided into 3 groups G1T = Group 1 treated, G1C = Group 1 control and G2 positive control. The results were obtained by optical microscopy, morphometry and statistically analyzed by analysis of variance and Student t test, $p < 0.05$. During the first 72 hours after the muscle trauma, it was observed inflammatory process in all groups, not having morphologic difference among the groups. After 96hs of treatment it is possible to observe an intense improvement in G1T and a moderate improvement in G1C. The morphometry analysis in comparison with ultrasound treatment with coupling gel and his internal control showed a significant difference ($p < 0.05$). The comparison between internal and external control showed that there was also a considerable improvement ($p < 0.05$) when compared after 96hs of treatment. These findings allow us to conclude that the ultrasound therapy has effective action in decreasing inflammatory process after traumatic muscle lesion.

Key-words: ultrasound, inflammation, muscle injury.

Recebido em 5 de dezembro de 2007; aceito em 08 de janeiro de 2008.

Endereço para correspondência: Humberto de Sousa Fontoura, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto Central de Ciências, CS7, Laboratório de Morfologia e Genética, 70910-900 Brasília DF, E-mail: humbertofisio@hotmail.com

Introdução

Inflamação é uma resposta do organismo à infecção ou à lesão caracterizada por dilatação e aumento do fluxo sanguíneo local e aumento da permeabilidade capilar com extravasamento de líquido para os espaços intersticiais, seguido ou não de coagulação destes líquidos, o que depende da quantidade de fibrinogênio e outras proteínas que atravessam os capilares e da migração de granulócitos e monócitos para o tecido inflamado [1].

Na fase aguda da inflamação, as alterações do calibre e fluxo, aumento de permeabilidade e migração de leucócitos são mais intensos e ocorrem concomitantemente com o aparecimento de dor, calor, rubor, edema e perda de função, considerados como os cinco sinais cardinais da inflamação.

As inflamações crônicas têm duração mais longa (semanas ou meses) com inflamação ativa e participação de linfócitos, macrófagos e plasmócitos, além de destruição tecidual com proliferação de vasos sanguíneos e do tecido conjuntivo. Ela pode surgir em seqüência à inflamação aguda, mas freqüentemente começa insidiosamente como uma resposta de baixo grau e muitas vezes assintomática.

Estas inflamações crônicas inespecíficas podem ocorrer em virtude da persistência do estímulo causador da inflamação aguda, por exposição continuada a agentes tóxicos; interferência no processo normal de cicatrização, devido a ataques repetidos de inflamação aguda e sob certas condições como reações imunes contra o próprio tecido do indivíduo (doença auto-imune).

No caso da inflamação muscular, o fator etiológico mais comum é o trauma, principalmente em esportes, sobretudo nos que ocorrem contatos entre participantes.

O ultra-som terapêutico é atualmente um dos recursos mais utilizados para o tratamento de lesões do sistema musculoesquelético dentro da fisioterapia [2,3]. Este aparelho é capaz de gerar vibrações mecânicas inaudíveis, de alta freqüência, que podem produzir efeitos fisiológicos térmicos. São utilizadas as freqüências de 0,7 a 5,0 MHz para fins terapêuticos no modo pulsado (com intervalos constantes de emissão da onda ultra-sônica) ou contínuo. Estas ondas são inaudíveis, pois o ouvido humano é capaz de captar freqüências máximas de aproximadamente 18.000 Hertz [4].

A vibração de alta freqüência (0,7 a 5,0 MHz) gerada pelo ultra-som tem dificuldade de se deslocar pelo ar, cuja velocidade do som é superior a 300m/s. Considerando que na água a velocidade do som é praticamente 5 vezes maior que no ar (1.500m/s), a onda ultra-sônica encontra neste meio uma maior facilidade de propagação [3]. A forma mais utilizada como acoplante do cabeçote do aparelho de ultra-som é o gel à base de água pela sua alta capacidade de cessar as impedâncias causadas pelas interfaces transdutor-gap gasosa-pele, evitando assim a reflexão das ondas ultrasônicas [5].

Para que as ondas ultra-sônicas sejam formadas, o aparelho deve ser dotado de um gerador de radiofreqüência responsável pela produção de correntes de alta freqüência para excitar um transdutor. Este é formado por um cristal, situado entre

eletrodos, capaz de converter energia elétrica em energia mecânica graças à deformação ocorrida neste cristal pelo efeito piezoelétrico [6]. A magnitude da freqüência produzida será inversamente proporcional à espessura do material piezoelétrico utilizado (zirconato-titanato de chumbo como recurso fisioterapêutico), ocorrendo uma maior freqüência produzida em cristais de menor espessura [7].

Quanto maior a freqüência de ondas ultra-sônicas emitidas, maior a absorção destas nos tecidos biológicos. Quando absorvido, ocorre uma conversão destas ondas em calor, responsável então pela sensação de calor profundo quando utilizado o modo contínuo [6].

Para que o ultra-som atinja os tecidos lesados, é necessário verificar a profundidade deste e ajustar o aparelho para uma freqüência ideal [8].

Segundo Kottke & Lehmann [6], a intensidade ideal para que ocorra uma cicatrização uniforme de tecidos moles em menor tempo é de 0,5 W/cm² (SATA); já para Dyson [8], uma intensidade mais baixa é suficiente para que ocorra o efeito fisiológico necessário, visto que altas intensidades podem resultar em lesões. Ainda conforme Kitchen & Basin [4], o uso do ultra-som, mesmo no modo pulsado no qual a geração de calor é menor quando comparado à mesma freqüência com o modo contínuo, resulta na estimulação de efeitos fisiológicos e reparadores tais como reparo do tecido mole e aumento do fluxo sanguíneo em tecidos com isquemia crônica.

Saad & Atlas [10] afirmam que o ultra-som pode ser utilizado com outras substâncias, principalmente com intuito de administração de substâncias ativas antiinflamatórias. Este é o conceito de fonoforese que é uma variante do ultra-som terapêutico direto, no qual substâncias biologicamente ativas são combinadas ao material do ultra-som, para serem forçadas através dos tecidos. Em revisão de literatura, Saad & Atlas [10] concluíram que parece haver elementos suficientes para que a fonoforese seja usada com confiança. Devido a esta propriedade, várias substâncias têm sido utilizadas como meio acoplante, sendo a água, vaselina, óleo mineral e gel as mais comumente utilizadas [5]. No entanto, tem crescido o uso de medicamentos, devidamente prescrito pelo médico responsável, em forma de pomadas, em sua maioria antiinflamatórios como o diclofenaco de sódio, sobretudo no tratamento de inflamações musculares [11].

Objetivo

Avaliar as propriedades antiinflamatórias do ultra-som pulsado no tratamento de inflamação aguda causadas por lesão muscular traumática em ratos Wistar.

Materiais e métodos

Animais

Ratos Wistar, pesando em média 325 gramas e com 75 dias de vida foram adquiridos da empresa Bioagri localizada

no município de Planaltina-DF. Os animais foram mantidos em biotério e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todos os ratos tiveram livre acesso à água e ração comercial Purina. Durante o procedimento os animais permaneceram no laboratório de histologia do Centro de Ensino Superior de Catalão – CE-SUC, onde foram mantidos em situação semelhante ao do biotério.

Aparelho de ultra-som

O aparelho utilizado foi o modelo Sonopulse III da empresa Ibramed, que possui as seguintes características conforme o fabricante: equipamento microcontrolado, com frequência de ultra-som de 1.0 MHz ou 3.0 MHz no mesmo cabeçote, emissão contínua e pulsada (razão de pulso de 1/5 a uma frequência de 100 MHz) e intensidade regulável de 0,1 a 2W/cm². O aparelho foi devidamente calibrado pela fábrica e foi adquirido e utilizado exclusivamente neste trabalho.

Optou-se ultra-som de 1 MHz do modo pulsado e intensidade de 0,5W/cm² por ser o mais utilizado pelos fisioterapeutas segundo pesquisa de Warder & Mcmeeken [12].

Procedimentos

Após anestesia intraperitoneal com ketamina 10 mg/kg e xilazina 4 mg/kg de peso corporal diluído em 1 ml de solução fisiológica, os animais (n = 12) sofreram trauma muscular gerado pelo impacto de um peso solto a 30 cm de altura no triceps sural da pata traseira direita.

Os grupos foram compostos da seguinte forma:

Grupo 1 (n = 12): Neste grupo, após 24 horas da lesão, a pata direita dos animais foram tratadas com ultra-som terapêutico no modo contínuo a uma frequência de 1 MHz com intensidade de 0,5 W/cm² por 9 minutos, 1 vez ao dia durante 4 dias seguidos (24, 48, 72 e 96 horas), utilizando como acoplante uma substância formada por gel ultra-sônico à base de água da marca carbogel. A pata esquerda serviu como controle interno e recebeu o acoplamento do cabeçote pelo mesmo tempo, porém com o aparelho desligado e sem a presença do gel, seguindo assim, o mesmo protocolo da pata tratada. Desta forma, para fins didáticos o grupo foi subdividido em dois:

G1T = Grupo 1 tratado, refere-se à pata direita que recebeu tratamento com ultra-som e gel comercial.

G1C = Grupo 1 controle, refere-se à pata esquerda que foi submetida ao uso do ultra-som desligado, controle interno. O G1T e G1C pertencem, portanto ao mesmo animal.

Grupo 2 (n = 12): Neste grupo, após a instalação da inflamação os animais não foram tratados (controle positivo), didaticamente denominado de **G2**. As patas esquerdas destes animais não foram lesadas e serviram de controle negativo por não apresentarem lesão.

Antes das sessões de tratamentos, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina 10 mg/kg e Xilazina 4

mg/kg de peso corporal diluído em 1 ml de solução fisiológica. Duas horas após o tratamento, ocorreu a coleta de sangue dos animais por punção cardíaca, havendo posteriormente o primeiro sacrifício de um animal de cada grupo. Esta conduta se repetiu em 48, 72 e 96 horas.

Fragmentos musculares das patas contendo a área lesada foram obtidos sendo fixada em solução de formol tamponado em PBS a 10% para análise histológica e morfométrica.

Microscopia óptica

Os tecidos foram fixados em solução de formol em PBS a 10% durante 24hs. Depois, desidratados em álcool a 70% por mais 24h. Após este período, continuou-se a desidratação dos tecidos em concentrações crescentes de álcool etílico, a saber: 80%, 85%, 90% e 95% durante 30 minutos em cada concentração e por 90 minutos a 100% divididos em 3 etapas de 30 minutos cada (álcool 100% 1, álcool 100% 2 e álcool 100% 3). Posteriormente foram submetidos ao xilol por 90 minutos divididos em 3 etapas de 30 minutos cada (xilol1, xilol2 e xilol3) e submetidos ao banho de parafina por mais 90 minutos divididos em 3 etapas de 30 minutos cada (parafina1, parafina2 e parafina3) e incluídos em blocos individuais de parafina. As peças foram cortadas em micrótomo com 5 µm de espessura, com algumas lâminas coradas pelo método hematoxilina e eosina, para análise histológica e fotomicrografia. O restante das lâminas foi utilizado para o processamento da técnica de imunohistoquímica.

Morfometria

A contagem de células inflamatórias foi realizada utilizando o software Imagepro 5.0. Para obtenção das imagens analisadas, foram confeccionadas 12 lâminas por pata lesada, cada uma delas com 3 cortes. As lâminas foram numeradas de 1 a 12 e após isto ocorreu o sorteio de 4 lâminas de cada grupo. Separadas as 4 lâminas de cada grupo, numerou-se os cortes de cada lâmina de 1 a 3 e sorteou-se 1 corte de cada lâmina, finalizando assim com um total de 4 cortes por grupo de tratamento. Após separar os cortes sorteados, fotografou-se aleatoriamente os cortes na objetiva de 20x e as células inflamatórias foram contadas.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância e teste t de Student, a um nível de significância fixado em P < 0,05 (5%).

Resultados

Todos os 24 animais completaram o estudo não havendo óbito ou outro fator que impedisse a utilização dos dados obtidos.

O procedimento adotado para gerar a contusão muscular mostrou bons resultados e atendeu às expectativas do trabalho.

A lesão pôde ser constatada por inspeção visual e por análise microscópica o que confirmou a presença de processo inflamatório e hemorragia (Figura 1 e 2).

Figura 1 - Aspecto visual da lesão.

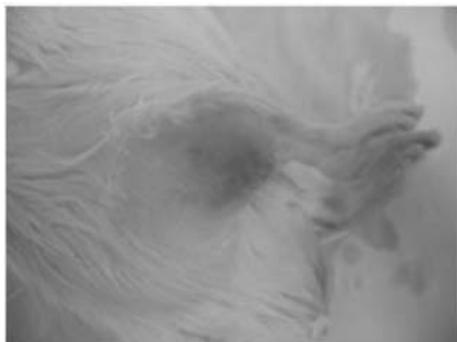
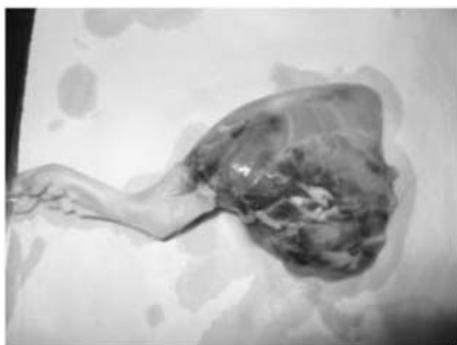


Figura 2 - Aspecto visual da lesão após dissecação da pata lesada.



Análise histológica por microscopia ótica

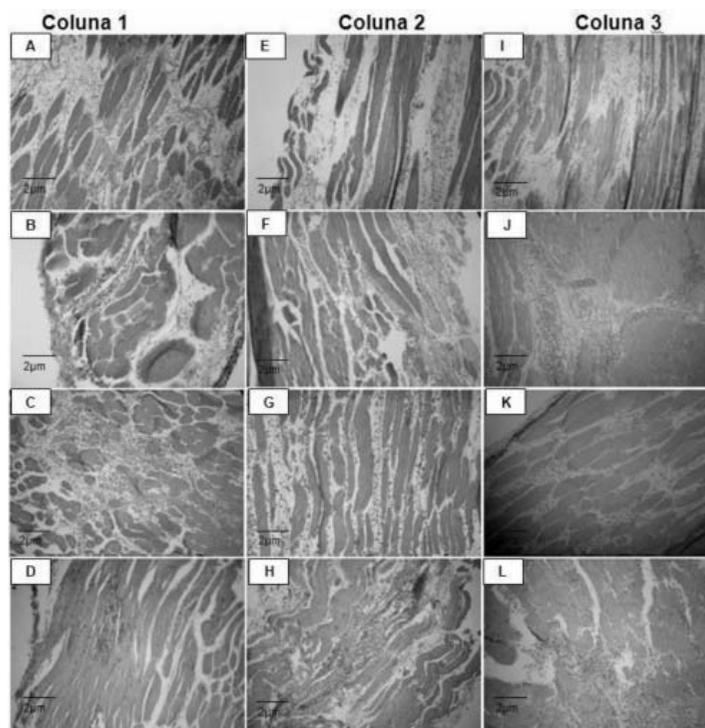
A figura 3 mostra a comparação entre os grupos G1T, G1C e G2 após 24, 48, 72 e 96 horas de lesão. Observa-se, na coluna 1, o grupo que recebeu tratamento (G1T), isto é, a pata esquerda lesada e tratada; na coluna 2, observa-se o controle interno do grupo 1 (G1C) sendo composta pela pata esquerda lesada e não tratada e na coluna c, encontram-se as fotomicrografias do grupo 2 (G2), composta pelos animais que foram lesados e não sofreram nenhum tipo de tratamento em nenhuma das patas, permitindo que a inflamação evoluísse sem nenhuma interferência.

Nas primeiras 72 horas após o trauma muscular, foi observado intenso processo inflamatório em todos os grupos estudados, não havendo diferença morfológica entre os grupos.

Após 96hs de tratamento é possível observar uma intensa melhora no G1T. O G4 apresentou um intenso processo inflamatório, o que indica que no grupo cuja inflamação não foi tratada continuou seu curso normal e que a aplicação do ultra-som diminuiu o processo inflamatório causado pelo trauma muscular. É possível observar também que o controle interno do grupo 1 (G1C), mostrou uma melhora conside-

rável no arranjo das fibras e na diminuição da inflamação, o que provavelmente ocorreu pela ação das ondas ultrassônicas no sistema imunológico.

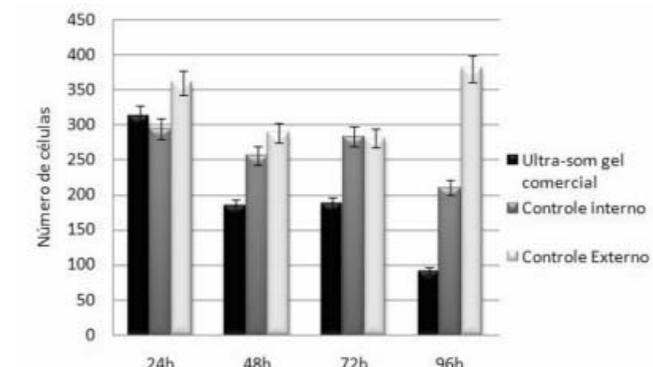
Figura 3 - Fotomicrografias após 24h, 48h, 72h e 96h após a lesão. A coluna 1 composta pelas imagens A, B, C e D corresponde ao grupo 1 tratado (G1T) após 24h (imagem A); 48h (imagem B), 72h (imagem C) e 96h (imagem D); A coluna 2 composta pelas imagens E, F, G e H corresponde ao grupo 1 controle (G1C – controle interno) após 24h (imagem E); 48h (imagem F), 72h (imagem G) e 96h (imagem H); A coluna 3 composta pelas imagens I, J, K e L corresponde ao grupo 4 (G4 – controle externo) após 24h (imagem I); 48h (imagem J), 72h (imagem K) e 96h (imagem L).



Análise morfológica

Na contagem de células inflamatórias, a comparação entre o tratamento com ultra-som com gel comercial e seu controle interno, isto é, a pata esquerda não tratada, mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$), principalmente quando comparado após 72h e 96h de tratamento, sendo que o mesmo ocorre quando comparado com o controle externo (animais que sofreram lesão muscular, mas não foram tratados), A comparação entre o controle interno e o controle externo mostra que também houve uma melhora considerável ($p < 0,05$) sobretudo quando comparado após 96hs de tratamento (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Comparação entre o tratamento com Ultra-som com gel comercial, o controle interno e o controle externo.



Discussão

O tratamento muscular é uma prática muito comum nas clínicas de fisioterapia e na sua grande maioria os fisioterapeutas utilizam o ultra-som como principal recurso no auxílio da regeneração muscular. Para se compreender melhor a influência do ultra-som na regeneração muscular é importante entender o que ocorre com um músculo após a lesão.

Por se tratar de uma inflamação aguda, os efeitos térmicos neste trabalho foram minimizados pelo uso do ultra-som no modo pulsado, sendo assim o aumento de temperatura local foi considerado desprezível [13,14].

É importante ressaltar que o tecido muscular é dotado da capacidade de se recuperar [15], porém após uma grave lesão algumas fibras entram em necrose e perdem a capacidade de se recuperar com funcionalidade [16].

Após a lesão pode haver um esvaziamento do sarcoplasma na região da necrose, porém a membrana sarcolemal que envolve o sarcoplasma que permanece parcialmente preservada poderá apresentar espessamento. O espaço que surge entre as fibras lesadas sofre imediatamente um edema seguido ou não de hematoma, sendo posteriormente invadido por um infiltrado celular inflamatório que migra para a área da lesão cerca de 12 horas após esta ter ocorrido.

Existe a tendência da diminuição deste infiltrado celular, após quatro dias da lesão, ocorrendo então a substituição por macrófagos que migram para a área lesada com o intuito de remover e fagocitar restos celulares da área necrosada.

O uso do ultra-som terapêutico pode influenciar de forma positiva na aceleração deste processo inflamatório. Observamos em nosso estudo que as patas tratadas com o ultra-som terapêutico apresentaram importante melhora quando comparado com o controle interno e externo. Este resultado vai de encontro ao de Gouvêa *et al.* [17]. Nesta pesquisa, utilizou-se o ultra-som terapêutico pulsado com frequência de 1 MHz, intensidade de 0,5 W/cm², durante cinco minutos, na regeneração de fibras musculares do músculo tibial anterior de ratos que foram submetidos a lesões incisivas. Os autores concluíram que o padrão histológico do músculo lesado e tratado com o ultra-som obteve um

melhora significativa quando comparado com o do grupo controle, sendo o processo inflamatório acelerado pelo uso do ultra-som, bem como a remoção mais efetiva das fibras necróticas do músculo.

Bischoff & Heintz [18] reiteram a tese de que o ultra-som pulsátil possui uma excelente capacidade de influenciar na regeneração muscular sob várias condições e aspectos, o que abre um leque para futuras finalidades de aplicação deste recurso.

Bassoli [15], em estudo realizado com ultra-som pulsado na regeneração de músculos esqueléticos, obteve resultados semelhantes a este trabalho. Foi utilizada uma técnica de incisão cirúrgica no músculo glúteo máximo e depois tratado com ultra-som terapêutico com intensidade de 0,5 W/cm² e com gel comercial à base de água, durante 10 dias, sendo a pata direita tratada e a pata esquerda como controle. Concluiu-se, portanto, que há uma regeneração precoce das fibras musculares bem como uma intensa formação neovascular e diminuição no processo inflamatório.

A comparação do grupo tratado com ultra-som com gel comercial com o respectivo controle interno e o controle externo mostrou uma melhora considerável no grupo tratado, sendo que houve também melhora no processo inflamatório da pata esquerda (controle interno) que não sofreu tratamento direito, principalmente quando comparado com o controle externo que não sofreu influência nenhuma das ondas ultrasônicas. Esta constatação corrobora estudos de que o ultra-som terapêutico pode influenciar o sistema imunológico, promovendo, assim, uma reação sistêmica do organismo contra o processo inflamatório.

A influência no sistema imunológico ocorrida pela utilização do ultra-som terapêutico foi estudada por Li *et al.* [19]. Neste trabalho, os autores investigaram a hipótese de que o uso do ultra-som terapêutico promoveria o crescimento de osteoblastos e liberação de citocinas. Os resultados mostraram que a exposição de ultra-som terapêutico no modo pulsado aumentou a população de osteoblastos bem como a secreção de TGFβ1 e a diminuição nas concentrações de interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNFα) em meio de cultura. Este mesmo grupo estudou os efeitos do ultra-som pulsado sobre a prostaglandina E2 (PGE2) na indução da produção de osteoblastos e concluíram que a influência do ultra-som pulsado de 1 MHz influenciou a liberação desta prostaglandina.

Maddi *et al.* [20] não encontraram influências significativas da influência do ultra-som (45 kHz, intensidade 30 MW/cm²) no modo contínuo por 5 minutos na expressão do fator de necrose tumoral α (TNF α).

A influência sistêmica do ultra-som pulsado pode ser confirmada no gráfico 5, onde mostra a comparação entre o controle interno dos grupos tratados e o controle externo. Nota-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os controles internos dos grupos que receberam as ondas ultrasônicas, sobretudo após 96hs, o que confirma que a pata

não tratada também sofreu influências do ultra-som aplicado na pata direita.

Os animais que não foram submetidos ao ultra-som, ou seja, o grupo 3 tratado com aplicação tópica de gel à base de arnica e o grupo 4, animais que foram lesados e não tratados, não apresentaram redução do processo inflamatório na análise morfológica e nem na morfométrica, sendo que no grupo 3 estes resultados são os mesmos para a pata tratada e para o controle interno (gráficos 4 e 5).

Pela análise dos resultados desta pesquisa com o ultra-som pulsado e gel à base de arnica fica evidente que há uma melhora na velocidade de regeneração muscular bem como da diminuição do processo inflamatório e do edema, o que pôde ser constatado nas fotomicrografias e na morfometria realizadas.

Conclusão

Os resultados obtidos mediante análise histopatológica da evolução da regeneração do tecido muscular das patas dos ratos submetidos a trauma direto no grupo muscular isquiotibiais e tratados com ultra-som pulsado por 4 sessões (24, 48, 72 e 96hs) permitem concluir que:

1. Os animais que receberam tratamento com gel comercial apresentaram melhores resultados quando comparados com o seu respectivo controle interno (pata esquerda do mesmo animal lesada e não tratada) e o controle externo (pata lesada de animal que não sofreu nenhum tipo de tratamento), o que indicou uma influência positiva do ultra-som nas lesões musculares.
2. As patas esquerdas usadas como controle interno, que, portanto não receberam sonificação direta, obtiveram uma expressiva melhora quando comparado com o controle externo indicando assim uma influência das ondas ultrassônicas no sistema imunológico, o que confirma dados da literatura.
3. O uso do ultra-som no modo pulsátil com frequência de 1 MHz e intensidade de 0,5 W/cm² mostrou ser um método físico eficiente na organização e reparo tecidual pós-trauma direto.

Referências

1. MacIntyre DL, Reid WD, McKenzie DC. Delayed muscle soreness - the inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. *Sports Med* 1995;20(1):24-40.
2. Agne JE. Eletrotermoterapia teoria e prática. 2a ed. Santa Maria: Orium; 2006. 336p.

3. Guirro R, Cancelieri AS, Santana IL. Avaliação dos meios intermediários utilizados na aplicação do ultra-som terapêutico. *Rev Bras Fisioter* 2001; 5(2):49-52.
4. Kitchen S, Bazin S. Eletroterapia de Clayton. 10a ed. São Paulo: Manole; 1998.
5. Casarotto RA. Agentes acoplantes em fisioterapia: perdas acústicas e térmicas [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 1999.
6. Kottke & Lehmann. Tratado de Medicina Física e Reabilitação de Krusen. 4a ed. São Paulo: Manole; 1994.
7. Guirro E, Guirro R. Fisioterapia em estética. 2a ed. São Paulo: Manole; 1996.
8. Merrick MA, Mihalyov MR, Roethemeier JL, Cordova ML, Ingersoll CD. A comparison of intramuscular temperatures during ultrasound treatments with coupling gel or gel pad. *J Orthop Sports Phys Ther* 2002;32:216-20.
9. Dyson M. Role of ultrasound in wound healing. In: Kloth LC, McCulloch JM, Feedar JA, eds. *Wound healing: alternatives in management*. Philadelphia: Davis; 1990. p. 259-85.
10. Saad M, Atlas S. Fonoforese: revisão de literatura. *Med Rehabil* 1995;(41):7-10.
11. Gam An, Johanan F. Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: meta-analysis. *Pain* 1995;63:85-91.
12. Warden SJ, McMeeken JM. Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound Med Biol* 2002;28(8):1075-80.
13. Duarte IDG, Nakamura M, Ferreira SH. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Braz J Med Biol Res* 1988;21:341-43.
14. Hadaad S. Estímulo do testículo de ratos pré-púberes, púberes e adultos com ultra-som pulsado de baixa intensidade [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1992.
15. Bassoli DA. Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos; 2001.
16. Brown SJ, Child RB, Day SH, Donnelly AE. Exercise-induced skeletal muscle damage and adaptation following repeated bouts of eccentric muscle contractions. *J Sports Sci* 1997;15:215-22.
17. Gouvêa CMCP, Vieiral PMN, Amaral AC. Efeito do ultra-som na recuperação de músculo tibial anterior de rato lesado. *Rev Univ Alfenas* 1998;4:165-173.
18. Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1994. p. 97-118.
19. Li JK, Chanh WH, Lin JC, Ruaan RC, Liu HC, Sun JS. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials* 2003; 24(13):2379-85.
20. Maddi A, Hai H, Ong ST, Sharp MH, Meghji S. Long wave ultrasound may enhance bone regeneration by OPG/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Bone* 2006;39:283-88.