

*Universidade Federal de Juiz de Fora*

ROSANA DE PAIVA OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS WISTAR  
PRENHES SUBMETIDAS AO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO  
DE 3 MHz.

JUIZ DE FORA

2007



*Universidade Federal de Juiz de Fora*

*Programa de Pós – Graduação em Saúde – Faculdade de Medicina da*

*Universidade Federal de Juiz de Fora*

*Curso de Mestrado em Saúde – Área de Concentração Saúde Brasileira*

**NÚCLEO DE PESQUISA EM TOXICOLOGIA REPRODUTIVA**

ROSANA DE PAIVA OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS WISTAR  
PRENHES SUBMETIDAS AO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO  
DE 3 MHz.**

JUIZ DE FORA

2007

ROSANA DE PAIVA OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS WISTAR  
PRENHES SUBMETIDAS AO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO  
DE 3 MHz.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós – Graduação em Saúde;  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal  
de Juiz de Fora, como requisito parcial para  
obtenção do Grau de Mestre em Saúde – área  
de concentração Saúde Brasileira.

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Martha de Oliveira Guerra

CO-ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vera Maria Peters

JUIZ DE FORA

2007

Oliveira, Rosana de Paiva

Desenvolvimento embrionário em ratas Wistar prenhes submetidas ao ultra-som terapêutico de 3 MHz / Rosana de Paiva Oliveira orientador: Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra; co-orientador: Profa. Dra. Vera Maria Peters. – 2007.

75 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde)-Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

1. Embriologia - Toxicologia. 2. Pesquisa com embriões - Animal.  
I. Guerra, Martha de Oliveira. II. Peters, Vera Maria. III. Título.

CDU 611-013

ROSANA DE PAIVA OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS WISTAR PRENHES  
SUBMETIDAS AO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO DE 3 MHz.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós – Graduação em Saúde;  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal  
de Juiz de Fora, como requisito parcial para  
obtenção do Grau de Mestre em Saúde – área de  
concentração Saúde Brasileira.

Aprovada em: 19 de Setembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Martha de Oliveira Guerra (Orientadora)

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Amaury Teixeira Leite Andrade

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria das Graças Ribeiro

Universidade Federal de Minas Gerais

Aos meus amados pais Cirenice e José Rubens.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha amada mãe Cirenice, que mesmo de longe tenho certeza que sempre guia meus passos.

Ao meu querido pai José Rubens, por estar sempre ao meu lado me incentivado.

Ao meu marido Eli, pela compreensão das horas ausentes.

À Dra. Martha de Oliveira Guerra pela amizade, paciência, dedicação e carinho durante a orientação.

À Dra. Vera Maria Peters, diretora do Centro de Biologia da Reprodução, pelo fornecimento dos animais e pelo apoio durante o desenvolvimento das atividades práticas.

Ao Prof. Dr. Mourão, pelo auxílio na estatística.

Ao Prof. Dr. Bernard, pelo auxílio durante o desenvolvimento prático.

Aos técnicos Evelise Rocha de Souza, Paulo Sérgio do Carmo e Rosemar Rodrigues de Azevedo pelo apoio e atenção durante o desenvolvimento prático.

Aos bolsistas Pedro, Marco Aurélio e Sâmia pela dedicação e amizade durante o experimento prático.

À querida amiga Lú, pela ajuda nas horas mais difíceis.

As amigas Alessanda Louzada pela amizade, paciência, pela força e encorajamento nas horas mais difíceis do Mestrado.

A todos os funcionários do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução, pelo cuidado com os animais de experimento e pela atenção que me dispensaram.

Às Redes Mineiras de Bioterismo – Rede 2824/05 e 2827/05.– FAPEMIG.

A todos muitíssimo obrigada.



## RESUMO

O ultra-som terapêutico tem amplo uso em diversas disfunções estéticas, cujo tratamento é procurado por mulheres jovens que podem se expor à irradiação em período precoce de gestação. Estudos sobre o efeito do ultra-som terapêutico na gestação são antigos, apresentam resultados controversos, foram realizados com metodologia nem sempre compatível com a clínica, com métodos e técnicas diversas, nenhuma reproduzida em dois trabalhos semelhantes e poucos envolveram as fases precoces de gestação. Os efeitos do ultra-som devem-se ao aumento da permeabilidade por vasodilatação, alteração de difusão de íons, modificação da posição de partículas intra e extracelular e alterações da configuração normal da célula, as quais podem acarretar alteração na sua atividade. Durante a fase precoce do desenvolvimento embrionário as células dependem de síntese protéica e de diversas sinalizações processadas através de canais de sódio e potássio. Além disso, microtúbulos e microfilamentos são extremamente importantes na morfogênese. Portanto, a exposição ao ultra-som poderia acarretar lesões no concepto. No presente estudo, avalia-se o efeito da exposição de ratas, no início da prenhez, ao ultra-som terapêutico por ondas pulsadas e ondas contínuas. A metodologia consistiu em utilizar ratas em dois períodos: pré-implantação (grupos A1, A2 e A3) e implantação (grupos B1, B2 e B3). Os animais foram sedados e expostos ao ultra-som terapêutico de frequência 3 MHz e intensidade de 0,6 W/cm<sup>2</sup> (SATA), por 5min. Os grupos A1 e B1 receberam ondas pulsadas; os grupos A2 e B2, ondas contínuas e os grupos A3 e B3 ultra-som simulado. As ratas foram eutanasiadas no 20<sup>o</sup> dia pós-inseminação. No sangue coletado procedeu-se à análise do hematócrito, da hemoglobina, dos leucócitos totais, do aspartato aminotransferase (AST/TGO), da alanina aminotransferase (ALT/TGP), do colesterol, dos triglicérides e da creatinina. Posteriormente, os animais foram submetidos à autópsia para identificação de lesões de órgãos internos, remoção e pesagem de fígado, rins e ovários. Foram contados os fetos vivos, malformados, mortos e reabsorvidos; seus cérebros, pulmões, fígados, rins e placentas foram pesados. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA - uma via - seguida de teste de Dunnett. Dados não paramétricos foram submetidos aos testes do Qui quadrado ou Kruskal Wallis. A hipótese nula foi rejeitada quando  $p < 0,05$ . Nas mães não foram observadas alterações de peso corporal e de órgãos, nem da capacidade reprodutiva. Nos fetos o peso relativo do coração, fígado, pulmão e dos rins aumentou no grupo A2; no grupo B2 o coração e o cérebro tiveram seu peso aumentado, e o peso da placenta diminuiu no grupo B1. Em conclusão, no modelo experimental usado, não foram observados efeitos tóxicos do ultra-som sobre o organismo materno, exceto pelo aumento dos triglicérides. O ultra-som pulsado no período de pré-implantação não alterou os fetos, mas as ondas contínuas induziram aumento do peso relativo do coração, fígado, dos pulmões e rins. No período de implantação, o ultra-som pulsado causou diminuição do peso da placenta, e as ondas contínuas acarretaram aumento do peso absoluto do cérebro e do coração fetais.

Palavras-chaves: Ultra-som terapêutico; Gestação; Efeitos teratogênicos.

## ABSTRACT

Therapeutic ultrasound is widely used in different aesthetic treatment by young women, who can be irradiated during early gestation. Researches regarding the effects of therapeutic ultrasound on gestation present controversial results. Methodologies incompatible with clinical aspects are used and different methods and technics were employed. However none of them were reproduced in two similar works and only a few observed the early gestation, period when pregnancy is commonly unnoticed. The ultrasound causes increased cell membrane permeability, alterations in ionic diffusion, vasodilation; modifies the intra and extracellular particles position and alter the normal configuration of cells, leading to functional alterations. During early embryo development, cells depend upon protein synthesis and on sinalizations triggered by sodium and potassium channels. Furthermore the participation of microtubules and microfilaments on morphogenesis are extremely important. All this indicates the exposition to ultrasound could cause lesions on the conceptus. In the present work the effects of therapeutic ultrasound with pulsed and continous waves during early pregnancy of the rat were assesed. The methodology consisted in rats exposition to ultrasound in two periods: preimplantation (groups A1, A2 and A3) and implantation (groups B1, B2 and B3). The animals were sedated and exposed to therapeutic ultrasound, frequence of 3 MHz, intensity of 0.6 W/cm<sup>2</sup> (SATA), during five minutes. Groups A1 and B1 received pulsed waves, groups A2 and B2 received continuous waves whereas the groups A3 and B3 were sham-exposed. The rats were euthanatized by an overdose of anesthetic 20 days after insemination. The hematocrit, hemoglobin, total leukocytes, and the level of aspartate aminotransferases, alanine transaminase, cholesterol, triglycerides and creatinine were analysed. The dams underwent authopsy for the identification of lesions in the internal organs and removal and weghing of the liver, kidneys and ovaries. The number of resorptions, live, dead and malformed fetuses were counted. The fetal brain, lungs, liver, kidneys and placentae were weighed. The data were processed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. Non parametric data were analyse using the Chi-Square or Kruskal-Wallis tests. The null hyphotesis was reject when  $p < 0.05$ . No alterarions were detected on body and maternal organs' weights, and reproductive performance. The relative weights of heart, liver, kidneys and lungs were higher in group A2. Heart and brain were heavier in group B2, and the weight of placentae decreased in group B1. In conclusion, in the experimental model used, the ultrasound showed no toxic effects on the maternal organism, except for the increased triglyceride levels. The pulsed -wave ultrasound presented no fetal toxic effects on the preimplantation period, but the continuous waves induced an increase on the relative weights of heart, liver, kidneys and lungs. During the implantation period, the pulsed-wave ultrasound caused a decrease in placentae weights, and the continuous waves induced an increased on the aboslute weights of fetal brain and heart.

Key-words: Therapeutic ultrasound; Pregnancy; Teratogenic

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

### FIGURAS

FIG. 1.	Peso corporal materno do experimento A.....	46
FIG. 2	Peso corporal materno do experimento B.....	51

### QUADRO

Quadro 1	Experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , vias de acesso ao procedimento, sedação/anestesia e tipo de onda em estudo sobre ultra-som e gestação.....	30
Quadro 2	Experimentos com ultra-som em animais gestantes: dias, tempo, intensidade e frequência de exposição... ..	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso corporal e dos órgãos de ratas Wistar submetidas, durante os dias 1- 5 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).....	47
Tabela 2	Hemogramas e análises bioquímicas de ratas Wistar submetidas, durante os dias 1-5 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).....	48
Tabela 3	Capacidade reprodutiva das ratas submetidas, durante os dias 1-5 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).....	49
Tabela 4	Peso corporal e de órgãos dos fetos das ratas submetidas, durante os dias 1-5 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).....	50
Tabela 5	Peso corporal e de órgãos das ratas submetidas, durante os dias 5-7 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).....	52
Tabela 6	Hemograma e análises bioquímicas das ratas submetidas, durante os dias 5-7 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).....	53
Tabela 7	Capacidade reprodutiva das ratas submetidas, durante os dias 5-7 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).....	54
Tabela 8	Peso corporal e de órgãos dos fetos das ratas submetidas, durante os dias 5-7 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas, pulsadas e ao ultra-som simulado.....	55

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. HIPÓTESE.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
4. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1 ULTRA-SOM.....	16
4.1.1 Generalidades.....	16
4.1.2 Ultra-som terapêutico.....	19
4.1.3 Efeitos biofísicos do ultra-som.....	20
4.1.4 Efeito mecânico.....	21
4.1.5 Efeito térmico.....	23
4.1.6 Efeitos terapêuticos do ultra-som.....	23
4.1.7 Contra-indicações ao ultra-som terapêutico .....	26
4.1.8 Ultra-som terapêutico: efeitos na reprodução.....	28
4.1.9 Estudos experimentais sobre os efeitos do ultra-som na gestação.....	28
4.2 Desenvolvimento Embrionário Precoce.....	32
4.2.1. Desenvolvimento embrionário: fase de pré-implantação.....	33
4.2.2. Desenvolvimento embrionário: fase de implantação.....	36
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
6. RESULTADOS.....	46
6.1 Experimento A: Tratamento do dia 1 a 5 pós - inseminação.....	46
6.2 Experimento B: Tratamento do dia 5 a 7 pós - inseminação.....	51
7. DISCUSSÃO.....	56



# 1. INTRODUÇÃO

Ultra-som é definido como um conjunto de vibrações mecânicas, essencialmente as mesmas das ondas sonoras, mas com uma frequência acima da capacidade de audição humana. Na medicina, é utilizado para a obtenção de imagens corporais; na área odontológica, como instrumento para remoção de cáries, clareamento dos dentes (BERNARDES et al., 2007) e, na fisioterapia, na especialidade dermato-funcional para tratamento de reabilitação das disfunções estéticas, reparo de tecidos lesados, no pré-operatório de lipocirurgias, na cicatrização de feridas cirúrgicas e não cirúrgicas e outras disfunções estéticas (ARAUJO et al., 2003; GUIRRO; GUIRRO, 2004; ULLMANN; REIS; STEIBEL, 2004; GONÇALVES et al., 2005; BORGES, 2006).

Tem aumentado a procura por tratamentos estéticos com a finalidade de diminuir lipodistrofias gelóides, particularmente por mulheres mais jovens (GUIRRO; GUIRRO, 2004; BORGES, 2006), que, por estarem em plena fase reprodutiva, correm o risco de serem expostas à irradiação por ultra-som terapêutico na fase precoce da gestação (15 primeiros dias).

Quando o concepto é lesado nesta ocasião, de uma maneira geral, ocorre aborto precoce, que a mulher raramente percebe, exceto por uma hemorragia vaginal freqüentemente confundida com alguma alteração da menstruação (SCIALLY, 1992).

Os estudos visando ao efeito do ultra-som sobre a gestação, além de apresentarem resultados controversos, foram realizados com metodologias diferentes, com intensidade e freqüências diversas (CHILD et al, 1984; BARNETT; WALSH; ANGLES, 1990; NORTON et al., 1991; HANDE; DEVI, 1992; VORHESS, 1994; JENSH et al., 1995) de tal forma que embora haja contra-indicação para seu uso durante a gestação, não existem dados científicos reproduzíveis e suficientes para afirmar ou negar sua contra-indicação.

Diante do exposto, no presente projeto, pretende-se avaliar o desenvolvimento fetal em ratas, expostas, no início da prenhez, ao ultra-som terapêutico por ondas pulsadas e ondas contínuas.



## 2. HIPÓTESE

A exposição ao ultra-som (pulso pulsado ou contínuo) altera o desenvolvimento embrionário precoce de ratos e interfere no desenvolvimento fetal.

### 3. OBJETIVOS

3.1 Observar o desenvolvimento dos fetos das ratas expostas, do primeiro ao quinto dia de prenhez, ao ultra-som terapêutico – ondas pulsadas ou contínuas.

3.2 Observar o desenvolvimento dos fetos das ratas expostas, do quinto ao sétimo dia de prenhez, ao ultra-som terapêutico – ondas pulsadas ou contínuas.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Ultra-Som:

#### 4.1.1 Generalidades

Ondas mecânicas são as que se propagam em meios deformáveis ou elásticos. Elas surgem de uma vibração numa região de meio elástico, a qual é transmitida para as partículas adjacentes, que vibram e transferem, novamente, parte da energia para outra partícula, e assim sucessivamente até o término da energia da onda.

A onda é um transferidor de energia, e as ondas sonoras envolvem o movimento vibratório de moléculas, de modo que há uma velocidade característica de propagação da onda para cada meio em particular, dependendo da relação entre a densidade e elasticidade do meio. Esta relação é denominada impedância acústica do meio (LOW; REED, 2001).

O ultra-som é produzido por uma corrente alternada que flui através de cristal pizoelétrico, como quartzo, titanato de bário ou zirconato de chumbo, alojado em um transdutor. A vibração nestes materiais resulta na produção mecânica de ondas sonoras de alta frequência (STARKEY, 2001).

Quanto maior a frequência com que as ondas ultra-sônicas são emitidas por um dado transdutor, menos o feixe sonoro irá divergir; com isso há uma vibração maior das moléculas dos tecidos e, por conseguinte, uma maior absorção, pois o feixe estará incidindo em ângulo reto com menos refração e reflexão (BASS; SHIELDS, 1998; ZISKIN; McDJARMID; MICHLOVITZ, 1999).

As moléculas de todas as matérias se encontram em movimento aleatório constante durante a emissão de ondas sonoras, e quanto maior o movimento das moléculas maior é a temperatura gerada (LOW; REED, 2001; STARKEY, 2001). Em geral, a energia percorre um caminho em linha reta. Entretanto, quando percorre qualquer meio seu trajeto é influenciado pelas alterações de densidade do meio. A energia que atinge uma interface entre duas densidades diferentes pode ser refletida, refratada ou absorvida pelo material, ou pode continuar a atravessar o material não sofrendo mudança.

#### *Reflexão:*

A onda pode se refletir completamente, quando toda a energia é impedida de entrar na próxima camada, ou parcialmente, quando parte da onda é refletida e outra parte penetra no tecido. Tecidos moles e água refletem apenas 0,2 % das ondas emitidas, ou seja, 98,8% da onda penetram nesses meios (STARKEY, 2001; LOW; REED, 2001; GUIRRO; GUIRRO, 2004).

### *Refração:*

Ocorre devido a diferenças na impedância acústica (resistência) dos meios. Quando a energia deixa uma camada densa e entra em uma menos densa, sua velocidade aumenta. Se o feixe incide na interface dos meios de forma não normal, o feixe que passa pelo segundo meio não continua em linha reta, pois muda de direção na interface por causa das velocidades diferentes nos dois meios (STARKEY, 2001; LOW; REED, 2001).

### *Absorção:*

O ultra-som aumenta o movimento das moléculas causando vibrações e colisões moleculares, o que resulta em calor. Desse modo a energia cinética é convertida em energia térmica à medida que passa pelo tecido. A energia diminui exponencialmente com a distância da fonte, pois uma proporção fixa dela é absorvida a cada unidade de distância, de modo que a quantidade restante será sempre menor que a inicial (LOW; REED, 2001). A absorção de energia sonora é maior nos tecidos com quantidades maiores de proteína e menor conteúdo de água (FRIZZEL; DUNN, 1984).

### *Atenuação:*

É proporcional à absorção e dependerá também da reflexão e refração das interfaces (LOW; REED, 2001). Quanto mais alta a frequência,

maior é a atenuação do feixe quando este passa pelos tecidos moles (GUIRRO; GUIRRO, 2004).

#### 4.1.2 Ultra-som terapêutico

O ultra-som terapêutico é um movimento ondulatório na forma de onda mecânica de alta frequência que transmite energia através da vibração de partículas do meio (TER HAAR, 1987).

Dependendo da frequência do ultra-som, a intensidade do feixe ultra-sônico pode atingir diferentes profundidades e sofrer maior atenuação da intensidade. A taxa de absorção e, conseqüentemente, a atenuação aumentam conforme aumenta a frequência do ultra-som, por causa da fricção das moléculas que as ondas devem superar para passar para o próximo meio, através dos tecidos (KITCHEN; PARTRIDGE, 1990). Sendo assim, há menos energia para penetrar nos tecidos (ZISKIN; McDJARMID; MICHLOVITZ, 1999).

O feixe de 1MHz apresenta maior divergência que o de 3 MHz (ZISKIN; McDJARMID; MICHLOVITZ, 1990). Logo, frequências maiores apresentam feixes de ondas com divergência menor, levando a uma absorção maior pelas camadas mais superficiais do tecido, com penetração mais superficial (TER HAAR, 1987).

O feixe ultra-sônico de 1MHz atinge profundidade média de 30mm, e o de 3MHz aproximada de 65mm (Wadsworth; Chanmugan, 1980). A intensidade de frequência 1MHz pode ser reduzida à metade em

aproximadamente 48mm de gordura ou 9mm de músculo, ao passo que um feixe de 3 MHz pode ter a sua intensidade reduzida pela metade em aproximadamente 16mm de gordura ou 3mm de músculo (MacDiarmid; Burns, 1987).

#### 4.1.3 Efeitos biofísicos do ultra-som

O ultra-som é uma modalidade de onda de penetração profunda, capaz de produzir alterações nos tecidos. Na prática clínica do ultra-som terapêutico há dois regimes de pulso comumente empregados: o contínuo e o pulsado. Conforme o regime de pulso selecionado, prevalecem mecanismos de efeitos térmicos ou não térmicos (STARKEY, 2001).

As alterações fisiológicas dentro dos tecidos, associadas à aplicação do ultra-som, podem ser agrupadas em duas classes, mas há sobreposições entre elas: *efeitos mecânicos* (alterações dentro dos tecidos, resultantes do efeito mecânico da energia sonora) e *efeitos térmicos* (alterações dentro dos tecidos, como um resultado direto da elevação da temperatura do tecido, promovida pelo ultra-som). Estes efeitos não são restritos a cada pulso selecionado. Os dois tipos de efeitos ocorrem, porém a proporção e a amplitude de cada um deles dependem do pulso selecionado e da intensidade de saída da onda (STARKEY, 2001).

A produção dos efeitos biofísicos depende da forma como são emitidas as ondas ultra-sonoras (LOW; REED, 2001). Quanto maior for o ciclo

de fornecimento, maiores serão os efeitos térmicos; quanto maior for a intensidade de saída, maior será a grandeza dos efeitos.

#### 4.1.4 Efeito mecânico:

Como efeitos mecânicos do ultra-som terapêutico podemos citar:

a. Ondas estacionárias - resultam da sobreposição de ondas refletidas sobre as ondas, incidentes no tecido. Esse efeito pode levar à lesão tecidual e é evitado pela movimentação contínua do cabeçote durante o tratamento (DYSON, 1987).

b. Cavitação - consiste na formação de pequenas bolhas gasosas no interstício, graças à vibração produzida pela energia ultra-sonora em um meio contendo líquido - sangue ou fluidos dos tecidos -, quando estimulado acusticamente (FLINT; SUSLICK, 1991; HALLOW et al., 2006). A cavitação engloba formação, crescimento, colapso e efeitos físicos, químicos e biológicos, associados às bolhas gasosas (FRIZZEL; DUNN, 1984).

Quando a onda sonora é de intensidade moderada, as bolhas de gás podem permanecer intactas por muitos ciclos e vibram, produzindo alterações reversíveis na permeabilidade da membrana celular - *cavitação estável* (MORTIMER; DYSON, 1988). Este tipo de cavitação é responsável, em parte, pela estimulação do reparo de



tecidos, através de modificações na permeabilidade da membrana celular para os íons de cálcio (KITCHEN; BAZIN, 1998) e sódio (YOUNG; DYSON, 1989).

Ocorrendo ondas com intensidade elevada e ondas estacionárias, as bolhas entram em colapso, liberando grande quantidade de energia, causadora de compressão violenta das bolhas durante o pico de alta pressão, seguida de colapso total. A compressão violenta pode levar à formação de radicais livres altamente reativos (YOUNG, 2003), que podem ser lesivos, danificando tecidos, células sanguíneas e outras estruturas biológicas. Esse efeito é denominado *cavitação transitória* (TER HAAR, 1987; YOUNG, 2003; STARKEY, 2001).

c. Correntes acústicas - referem-se ao movimento unidirecional do fluido no campo do ultra-som (YOUNG, 2003). Exercem sobrecarga viscosa sobre a membrana das células, aumentando sua permeabilidade. Logo, podem alterar a taxa de difusão de íons, causando alterações terapêuticamente úteis, como o aumento na captação de cálcio pelas células (MORTIMER; DYSON, 1988). Esta alteração é de grande importância, já que o cálcio, como “segundo mensageiro celular”, pode ter efeito acentuado no aumento da produção e liberação de fatores que contribuem para o processo de reparo tecidual. Dessa forma, o ultra-som terapêutico tem o potencial

de acelerar a resolução normal da inflamação, desde que o estímulo inflamatório seja removido (DYSON, 1982, 1987).

#### 4.1.5 Efeito térmico:

As vibrações sônicas do ultra-som terapêutico produzem *micromassagem* nos tecidos, gerando calor por fricção (HOOGLAND, 1986). E por esse meio favorece a cicatrização, alivia a dor, reduz a rigidez articular e o espasmo muscular e aumenta o fluxo sanguíneo local (LOW; REED, 2001; YOUNG, 2003). Para se obterem tais efeitos, a temperatura precisa ser mantida entre 40° a 45° C por, pelo menos, cinco minutos (DeLISA; GANS, 2002).

#### 4.1.6 Efeitos terapêuticos do ultra-som

##### a) Em processos inflamatórios

Após uma lesão, ocorrem vários eventos celulares e químicos nos tecidos moles (YOUNG, 2003). O processo de reparo de uma lesão pode ser dividido em três fases (CLARK, 1990), todas elas influenciáveis pela terapia do ultra-som (DYSON, 1987).

(I) Inflamação:

Os neutrófilos são os primeiros a entrar no leito da ferida, com a função de limpar o local de partículas estranhas como bactérias e restos de tecidos lesados (YOUNG, 2003). Em seguida migram os macrófagos, que fazem a fagocitose e produzem, no local, fatores que induzem a formação do tecido de granulação (LEIBOVICH; ROSS, 1975). A suave vibração das moléculas líquidas, produzidas pelo ultra-som nos tecidos, pode aumentar a taxa de fagocitose e o movimento de partículas e células (EVANS, 1980). Os efeitos da cavitação estável e da corrente acústica parecem aumentar a difusão do cálcio através da membrana celular. Como segundo mensageiro celular, o cálcio pode induzir aumento, produção e liberação de fatores que facilitam a cicatrização, como a histamina dos mastócitos (DYSON, 1990; YOUNG, 2003).

(II) Proliferação/ Formação de tecido de granulação

Esta fase se sobrepõe ao final da fase inflamatória, iniciando, dentro de três dias após a lesão, quando ocorre uma intensa proliferação de fibroblastos e de células endoteliais, que formam os novos vasos sanguíneos (GUIRRO; GUIRRO, 2004). Nesta fase, a lesão é preenchida com células, principalmente, macrófagos e fibroblastos. Também ocorre angiogênese e formação de matriz de tecido conjuntivo, composta de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipo I e II (YOUNG, 2003). Segundo Mummery (1987) apud Dyson (1987) e Ramirez (1997), a cavitação estável com baixa intensidade favorece o influxo de cálcio em fibroblastos expostos ao ultra-som.

O autor comenta que este processo se deve à alteração temporária na permeabilidade da membrana celular, e o influxo de cálcio sinaliza que ocorreram alterações extracelulares, sendo, portanto, necessário uma resposta reparadora.

Os fibroblastos, quando expostos à energia ultra-sônica, em níveis terapêuticos, podem sintetizar mais colágeno, aumentando a força de tensão dos tecidos moles (HARVEY et al, 1992). Em ratos, a irradiação de feridas por energia de baixa intensidade abreviou a resolução do processo inflamatório (GUIRRO; FERREIRA; GUIRRO, 1995; YOUNG; DYSON, 1989).

(III) Remodelamento:

Pode continuar por meses ou anos após a fase de proliferação. O colágeno do tipo III é substituído por colágeno tipo I, em resposta ao estresse mecânico a que o tecido está sendo submetido. O processo continua até o colágeno I adquirir características semelhantes às do tecido antes da lesão, porém as características do tecido cicatricial nunca serão idênticas às do tecido não lesado (GUIRRO; GUIRRO, 2004).

Quando o ultra-som é aplicado, logo após a lesão, pode melhorar tanto a aparência estética, como as propriedades mecânicas do tecido cicatricial resultante (YOUNG, 2003). Experimentalmente foi observado que o uso do ultra-som (três vezes / semana –  $0.1W / cm^2$ ) em lesões ocorridas há duas semanas, levou ao aumento da força tênsil e da elasticidade (WEBSTER,

1980 apud KITCHEN, 2003). No tratamento de lesões por incisão na fase inflamatória, aumentou também a força tênsil e o conteúdo de colágeno (BYL et al., 1992; 1993).

O tratamento com ultra-som, durante a fase inflamatória de reparo, aumenta a quantidade de colágeno depositado na lesão e estimula a deposição de colágeno com características mais semelhantes às da pele não lesada que nos controles não tratados (DYSON, 1981).

#### b) Na Fonoforese

A fonoforese é a aplicação tópica de agentes farmacológicos através da camada externa da pele (estrato córneo), dirigida pelo ultra-som para o tecido subjacente. Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar o aumento da penetração das drogas com auxílio do ultra-som (SKAUEN, 1984; FANG et al., 1999), entre eles o aumento da temperatura e da cavitação, bem como a pressão de radiação (TYLE; AGRAWALA, 1989; GUIRRO; GUIRRO, 2004).

#### 4.1.7 Contra-indicações ao ultra-som terapêutico:

O ultra-som pode ser uma terapia efetiva ou um risco potencial dependendo do modo como é aplicado e da área irradiada, mas muitas das contra-indicações não se baseiam em qualquer evidência científica:

- Diretamente sobre o coração – pela possibilidade de modificação no potencial de ação e suas propriedades contráteis.
  
- Diretamente sobre tumores – pela possibilidade de induzir crescimento e/ou metastáses.
  
- Globo ocular – pela chance de produzir cavitação, podendo ocorrer dano à retina.
  
- Diretamente sobre endopróteses – pelo alto coeficiente de absorção do cimento acrílico, e dos componentes à base de polímeros poderiam sofrer ação dos efeitos térmicos.
  
- Diretamente sobre implantes metálicos – podem aumentar o índice de reflexão do feixe ultra-sônico.
  
- Processos infecciosos – risco de disseminação pelo aumento da permeabilidade vascular.
  
- Tromboflebitas e varizes – pelo risco de promover embolias.
  
- Sobre o útero gravídico – pela possibilidade da cavitação do líquido amniótico e da ocorrência de malformações no feto.

#### 4.1.8 Ultra-som terapêutico: efeitos na reprodução

##### 4.1.8.1 Útero gravídico

As contra-indicações do uso do ultra-som terapêutico sobre o útero gravídico prendem-se ao fato de o ultra-som produzir cavitação e elevação da temperatura (DELISA; GANS, 2002); interferir com proliferação de células (reparo dos tecidos), com risco para as células embrionárias/fetais em desenvolvimento (LOW; REED, 2001) e, dessa forma, induzir a malformações (GUIRRO; GUIRRO, 2004). De fato, Shoji, Murakami, Shimizu (1975), relatam que a intensidade do ultra-som, dentro da escala terapêutica, pode estar associada a anomalias congênitas em camundongos. McLEOD; FOWLOW (1989), relataram agenesias sacrais, microcefalia e atraso no desenvolvimento, deficiência no crescimento intrauterino e pós-natal em recém - nascido de uma mulher submetida a 18 aplicações de ultra-som terapêutico, do 6<sup>o</sup> ao 29<sup>o</sup> dia de gestação, para tratar uma bursite no íleo esquerdo.

##### 4.1.9 Estudos experimentais sobre os efeitos do ultra-som na gestação

Estudos sobre os efeitos do ultra-som durante a gestação foram realizados em camundongos e ratos. Alguns indicam a ocorrência de mortes (SHOJI; MURAKAMI; SHIMIZU, 1975); alterações embrionárias *in vitro* (BARNETT; WALSH; ANGLES, 1990; AKAMATSU, 1981); retardo de crescimento fetal (HANDE; DEVI, 1992; SHOJI; MURAKAMI; SHIMIZU, 1975),

decréscimo do peso (HANDE; DEVI,1992). Já outros não relatam alteração no desenvolvimento embrionário ou fetal (McCLAIN; HOAR; SALTZMAN, 1972; CHILD; CARSTENSEN; DAVIS, 1984; KIMMEL et al., 1983; KIMELL et al., 1989; ATKINSON; WILLIAMS, 1990; MARGUILES et al., 1991; NORTON et al.,1991; VORHESS et al., 1994; FISHER et al., 1994).

São encontradas diversas abordagens na metodologia utilizada para os estudos sobre ultra-som e gestação, tanto no que se refere à intensidade e às frequências, quanto ao período de desenvolvimento ao qual se expôs o animal prenhe à terapêutica (CHILD; CARSTENSEN; DAVIS, 1984; BARNETT; WALSH; ANGLES, 1990; NORTON et al., 1991; HANDE; DEVI, 1992; VORHESS, 1994; JENSH et al., 1995). Alguns estudos relatam a exposição por emissão das ondas via abdominal, com anestesia (ABRAHAM; ZISKIN; HEYNER, 1989; ATKINSON; SIBLEY; WILLIAMS, 1990; CHILD; CARSTENSEN; DAVIS, 1984; HANDE; DEVI, 1992; JENSH et al., 1995; KIMMEL et al., 1989; MARGULIES et al., 1991; McCLAIN; HOAR; SALTZMAN, 1972; NORTON et al., 1990; NORTON et al., 1991; O' BRAIN; STRATMEYER, SHOJI; MURAKAMI; SHIMIZU, 1975) e outros sem anestesia prévia (BARNETT; WALSH; ANGLES, 1990; FISHER et al., 1994; VORHEES et al., 1991; VORHESS et al., 1994).

Durante a aplicação das ondas, ocorreram casos em que as ratas eram treinadas na água para permanecerem imóveis (VORHEES et al., 1991; VORHESS et al., 1994) em outros, eram imobilizadas (BARNETT; WALSH; ANGLES, 1990; FISHER et al., 1994). As modulações do aparelho em relação



ao tempo, à frequência e à intensidade de exposição, nos estudos relatados, são diversas. O tempo de exposição foi variado de dois minutos (O' BRIEN; STRATMEYER, 1975) até 5 horas (SHOJI; MURAKAMI; SHIMIZU, 1975), o período de gestação variou muito e foram testadas tanto ondas pulsadas como contínuas.

O QUADRO 1 mostra algumas das abordagens usadas no estudo do ultra-som na gestação

QUADRO 1. Experimentos *in vitro* e *in vivo*, vias de acesso ao procedimento, sedação/anestesia e tipo de onda em estudo sobre ultra-som e gestação.

Experimento	Autores
<i>in vivo</i>	1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 19
<i>in vitro</i>	2, 4, 8
Exposição direta do corno uterino	1, 3, 5, 14
Via abdominal	6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19
Com anestesia	1, 3, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
Sem anestesia	4, 6, 18, 19
Onda contínua	1, 3, 7, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19
Onda pulsada	2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 14

Autores: ABRAHAM; ZISKIN; HEYNER (1989)<sup>1</sup>; AKAMATSU (1981)<sup>2</sup>; ATKINSON; SIBLEY; WILLIAMS (1990)<sup>3</sup>; BARNETT; WALSH; ANGLES (1990)<sup>4</sup>; CHILD; CARSTENSEN; DAVIS (1984)<sup>5</sup>; FISHER et al. (1994)<sup>6</sup>; HANDE; DEVI (1992)<sup>7</sup>; IWABE (1993)<sup>8</sup>; JENSH et al. (1995)<sup>9</sup>; KIMMEL et al. (1983)<sup>10</sup>; KIMMEL et al. (1989)<sup>11</sup>; MARGULIES et al. (1991)<sup>12</sup>; McCLAIN; HOAR; SALTZMAN (1972)<sup>13</sup>; NORTON et al. (1990)<sup>14</sup>; NORTON et al. (1991)<sup>15</sup>; O' BRIEN<sup>16</sup>; STRATMEYER, 1975; SHOJI; MURAKAMI; SHIMIZU (1975)<sup>17</sup>; VORHEES et al. (1991)<sup>18</sup>; VORHESS et al. (1994)<sup>19</sup>.

No QUADRO 2 estão resumidos os dias de prenhez, a duração da exposição, a frequência e a intensidade relatados em experimentos obtidos na literatura.

QUADRO 2. Experimentos com ultra-som em animais gestantes: dias, tempo, intensidade e freqüência de exposição.

Dias de prenhez	Tempo de exposição	Freqüência	Intensidade de exposição
3 e 6 <sup>(5)</sup>	15 min <sup>(4, 8, 18)</sup>	1 MHz <sup>(1, 10, 11, 12)</sup>	0 a 1.0 mW/cm <sup>2</sup> <sup>(9)</sup>
4 a 19 <sup>(6, 7, 18)</sup>	2.5 min <sup>(5)</sup>	1.1 MHz <sup>(3)</sup>	1.5 ou 15 mW/cm <sup>2</sup> <sup>(5)</sup>
4 a 20 <sup>(19)</sup>	3 min <sup>(3)</sup>	2 MHz <sup>(2, 8)</sup>	2.5 mW/cm <sup>2</sup> <sup>(9)</sup>
8 <sup>(10, 11, 17)</sup>	5 min <sup>(5, 12)</sup>	2.25 MHz <sup>(17)</sup>	10 mW/cm <sup>2</sup> <sup>(13)</sup>
8 a 10 e 11 a 13 <sup>(13)</sup>	10min <sup>(1, 7, 10, 11, 19)</sup>	2.5 MHz <sup>(5, 13, 14, 15)</sup>	40 mW/cm <sup>2</sup> <sup>(17)</sup>
9,5 <sup>(4)</sup>	12 min <sup>(6)</sup>	3 MHz <sup>(6, 18, 19)</sup>	65 mW/cm <sup>2</sup> <sup>(7)</sup>
10 <sup>(12)</sup>	20 min <sup>(15)</sup>	3.14 MHz <sup>(4)</sup>	120 mW/cm <sup>2</sup> <sup>(8)</sup>
11 a 13 <sup>(13)</sup>	30 min <sup>(4, 13, 14, 15)</sup>	3.5 MHz <sup>(7)</sup>	0; 0.05; 0.050 ou 1.0W/cm <sup>2</sup> <sup>(11)</sup>
13 <sup>(16)</sup>	35 min <sup>(9)</sup>	5 MHz <sup>(9)</sup>	0; 2; 10; 20; 30 W/cm <sup>2</sup> <sup>(19)</sup>
14 e 15 <sup>(15)</sup>	2horas <sup>(13)</sup>		0.1; 0,2 ou 30.0 W/cm <sup>2</sup> <sup>(18)</sup>
15 e 16 <sup>(14)</sup>	5 horas <sup>(17)</sup>		0.65; 1.0 ou 1.8 W/cm <sup>2</sup> <sup>(2)</sup>
15, 17 e 19 <sup>(9)</sup>	60 min <sup>(2)</sup>		0.78 w/ cm <sup>2</sup> <sup>(14 e 15)</sup>
15 a 20 <sup>(1)</sup>			0; 2.0 ou 30 W/cm <sup>2</sup> <sup>(6)</sup>
15, 18, 21 e 22 <sup>(3)</sup>			1 W/ cm <sup>2</sup> <sup>(3)</sup>
			3 W/ cm <sup>2</sup> <sup>(2)</sup>
			15 a 1.2 W/cm <sup>2</sup> <sup>(4)</sup>
			16 a 2.5 W/cm <sup>2</sup> <sup>(12)</sup>

Autores: ABRAHAM; ZISKIN; HEYNER, (1989)<sup>1</sup>; AKAMATSU, (1981)<sup>2</sup>; ATKINSON; SIBLEY; WILLIAMS, (1990)<sup>3</sup>; BARNETT; WALSH; ANGLES, (1990)<sup>4</sup>; CHILD; CARSTENSEN; DAVIS, (1984)<sup>5</sup>; FISHER et al., (1994)<sup>6</sup>; HANDE; DEVI, (1992)<sup>7</sup>; IWABE, (1993)<sup>8</sup>; JENSH et al., (1995)<sup>9</sup>; KIMMEL et al., (1983)<sup>10</sup>; KIMMEL et al., (1989)<sup>11</sup>; MARGULIES et al., (1991)<sup>12</sup>; MCCLAIN; HOAR; SALTZMAN, (1972)<sup>13</sup>; NORTON et al.,(1990)<sup>14</sup>; NORTON et al.,(1991)<sup>15</sup>; O' BRIEN; STRATMEYER<sup>16</sup>; SHOJI; MURAKAMI; SHIMIZU, (1975)<sup>17</sup>; VORHEES et al., (1991)<sup>18</sup>; VORHESS et al., (1994)<sup>19</sup>.

Acompanhando-se os procedimentos seguidos pelos autores, como assinalado pelas células com mesmo fundo, colocadas no Quadro 2, é possível observar que não existem dois experimentos semelhantes, e não há reprodutibilidade dos dados. Isso faz com que os resultados relatados não permitam avaliar com segurança os riscos do ultra-som para a gestação.

#### 4.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE

A compreensão do modelo experimental usado no presente trabalho exige alguns conhecimentos básicos sobre o desenvolvimento embrionário inicial em mamíferos.

O desenvolvimento dos mamíferos inicia-se com os processos de fertilização, nos quais ocorrem eventos moleculares coordenados. Estes eventos continuam com as fases de transporte e segmentação do embrião pelo trato genital feminino, sua implantação no útero, a gastrulação, a organogênese, o crescimento e a maturação dos órgãos e sistemas. A completa maturação de alguns órgãos e sistemas somente se faz após o nascimento.

E a fertilização, neles, ocorre na ampola da tuba uterina. Com a penetração do espermatozóide, o ovócito é ativado, o segundo corpúsculo polar é produzido, os pronúcleos masculino e feminino são formados, o material genético dos dois gametas funde-se e forma-se o zigoto, que iniciará diferentes eventos morfológicos e bioquímicos. Iniciam-se as segmentações

sucessivas e o transporte pela tuba uterina até o útero, onde o blastocisto se implanta dando início à embriogênese (GUERRA; PETERS, 1999; PARIA; SONG; DEY, 2001; ROSSI-FERRAGUT *et al.*, 2001; RONDEROS, 2006).

#### 4.2.1. Desenvolvimento embrionário: fase de pré-implantação.

Após a fertilização, os embriões migram pela tuba uterina, enquanto passam pelos primeiros estágios da clivagem. É a fase de pré-implantação, que acontece nos primeiros sete dias de gestação em humanos e nos primeiros quatro a cinco dias, em roedores. Divisões subseqüentes vão se seguindo e originando células-filha denominadas blastômeros (PARIA; SONG; DEY, 2001; DUMM, 2006).

Em ratos a fase de zigoto a dois blastômeros ocorre na ampola da tuba uterina, no primeiro dia de prenhez. Enquanto o embrião transita pela tuba uterina, no segundo dia atinge a fase de dois blastômeros e, entre o segundo e o quarto dia, ocorrem as divisões subseqüentes até quatro células. A fase de mórula é atingida no quarto dia, também na tuba uterina (CARSON; NAFTOLIN, 1982; SINGH *et al.*, 1993; SOUZA *et al.*, 1997), embora SINGH *et al.* (1993) tenham detectado alguns blastocistos precoces, nesse mesmo dia.

Na fase de mórula, os blastômeros se alinham, apertando-se uns contra os outros para formar uma esfera compacta de 16 blastômeros (MOLEY, 1999; O'RAHILLY, MÜLLER, 2001). Este fenômeno, denominado compactação, ocorre quando as células reorganizam as organelas

intracitoplasmáticas, tornam-se polarizadas, trocam a forma esférica pela cilíndrica e aderem-se umas às outras mais firmemente por junções “tight”. Algumas células localizam-se no centro da estrutura, e as demais células as circundam. As células centrais dão origem ao maciço celular interno (MCI), do qual se origina o embrião, e as externas, às células do trofotoderma, fonte de origem da placenta (PARIA; SONG; DEY, 2001; O’RAHILLY, MÜLLER, 2001).

Na mórula, as células do MCI começam a secretar fluido e, logo aos 64 blastômeros, estabelece-se o início de uma cavidade, chamada de blastocelo, identificando-se aí a fase de blastocisto inicial (DUMM, 2006). Esta mudança coincide com a entrada do blastocisto na cavidade uterina (CARSON; NAFTOLIN, 1982).

As fases iniciais do desenvolvimento embrionário (até a terceira divisão celular) são controladas pelo genoma materno; em ratos corresponde ao estágio de duas células e em humanos a 4-8 células. Desta fase em diante, o controle passa a ser efetuado pelo genoma do embrião (LAURINCK et al., 2000; PARIA; SONG; DEY, 2001), que começa a produzir sinais moleculares, recebidos pelas células epiteliais da tuba uterina, as quais respondem produzindo secreções específicas necessárias ao desenvolvimento do embrião. Assim, o controle das clivagens e a formação da mórula e do blastocisto estão estreitamente correlacionadas a fatores produzidos pelo próprio embrião e pelo epitélio tubário (KOBAYASHI et al., 1997).

*Trânsito do embrião pela tuba uterina e útero*

De acordo com MOORE e CROXATTO (1988), o transporte tubário não se faz de maneira regular; o zigoto permanece algum tempo na região da ampola, aprisionado pelo fechamento da junção istmo - ampolar. Depois de algumas horas ou dias (no ser humano 95% do tempo de transporte é gasto nesta região, e no camundongo 25%), a junção istmo - ampolar abre-se e deixa passar o (s) zigoto (s) para a região do istmo. Em seguida, fecha-se de novo e parece só reabrir na próxima ovulação. CROXATTO et al. (1991) afirmam que este fato parece ser importante para o transporte mecânico dos embriões, como também por isolá-los num ambiente especial, provavelmente necessário para o seu desenvolvimento. Na etapa seguinte, quando já ocorrem as clivagens sucessivas, o embrião fica no istmo por um tempo variável até que, com a abertura da junção útero - tubária, passa para o útero, onde ocorrerá a implantação.

As contrações circulares, e progressivas, das fibras musculares lisas da tuba uterina são importantes para o encaminhamento do embrião em direção ao útero (HARPER, 1994). Hormônios interferem na contratilidade tubária: ela fica aumentada sob efeito do estrogênio e retardada, pela presença de progesterona (CARSON; NAFTOLIN, 1982; FORCELEDO; CROXATTO, 1988; VINIJSAMUN et al., 1990; CROXATTO et al., 1991). Em ratas, níveis elevados de estrogênio retardam o crescimento de embrião em fase de pré-implantação, e ele pode, inclusive, sofrer degeneração (TONG et al., 2000).

O embrião de rata produz grande quantidade de prostaglandina E1, que diminui a contratilidade das fibras musculares, sugerindo que o embrião pode influir no seu transporte (VIGGIANO; CEBRAL; GIMENO, 1994 apud HARPER, 1990; VIGGIANO et al., 1992).

#### 4.2.2. Desenvolvimento embrionário: fase de implantação.

A implantação do blastocisto é uma seqüência de interações bioquímicas e físicas entre blastocisto e útero que conduz à formação de um contato íntimo e especializado entre trofoblasto e endométrio (ACOSTA, 1994; LEE; DeMAYO, 2004). Implica também processos que impedem a rejeição materna. Já foi observado, em seres humanos, que o sucesso da implantação está correlacionado a níveis de citocina TH1 baixos e TH2 altos (LIM et al., 2000) e, em camundongos, a expressão materna do fator inibidor de leucemia é crucial para a sua implantação (STEWART et al., 1992; TSAI et al., 1999).

A implantação só ocorre quando blastocisto e endométrio estão “maduros”, isto é, fisiologicamente capacitados para se unirem. Desde a entrada no útero, blastocisto e endométrio interagem, mas mesmo antes disso, é a presença do blastocisto que mantém o corpo lúteo funcionando e garante o ambiente progesteronal do útero, necessário ao implante do blastocisto.

São produzidos no útero: [1] Fatores que estimulam o crescimento e protegem o embrião da apoptose (HERRLER et al, 1998); [2] Proteína relacionada ao processo de proliferação celular nos estágios iniciais de adesão (FAZLEABAS; VERHAGE, 1991); [3] Proteína trofoblástica 1 (o TP-1), que

suprime a secreção de prostaglandina F-2alfa (PGF 2 $\alpha$ ), hormônio que induz contratilidade da musculatura uterina e estimula a luteólise (BAZER; ROBERT, 1983); [4] EGF (fator de crescimento epidérmico), que contribui para a sobrevivência do blastocisto (SPANOS et al.,2000).

O blastocisto, por seu turno, produz óxido nítrico (NO), que induziria vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa uterina, colaborando com a implantação (GAGIOTI et al., 2000); estrogênio, que contribuiria para a sensibilização do endométrio (SARTOR; DULUC, 1980; SENGUPTA et al., 1981) e prostaglandinas, que teriam efeito local no endométrio, provavelmente estimulando vasodilatação (PAKRASI; DEY, 1982; HARPER; NORRIS; RAJKUMAR, 1983; KINOSHITA et al., 1985).

Para se implantar o blastocisto, é preciso ativar e, em seguida perder a zona pelúcida, que se adelgaça progressivamente até se romper em algum ponto e o blastocisto escapa por ele – um fenômeno denominado “eclosão”.

A ativação do blastocisto compreende modificação na expressão de moléculas de antígenos de histocompatibilidade (WEITLAUF, 1994); a transformação de sua carga elétrica neutra para negativa (CLEMETSON; MOSHFEGHI; MALLIKARJU-NESWRA, 1971); a produção pelo endométrio de proteínas – blastoquinina ou uteroglobina (FINN, 1977), além de outros fatores.



O útero também necessita modificar-se com as alterações típicas da fase progestacional: vasos sangüíneos dilatados e tortuosos, glândulas endometriais dilatadas e cheias de secreção, células do estroma contendo glicogênio. Além disso, o endométrio deve torna-se receptivo para o blastocisto. Psychoyos (1966) demonstrou que, em ratas, nos três a quatro primeiros dias após a inseminação, o endométrio é “neutro” ou não receptivo ao blastocisto, porém, a partir da tarde do quarto dia e o início do quinto dia, sofre diversas alterações que o tornam receptivo. É do mesmo autor a afirmação de que um pico de estrogênio, agindo no endométrio, previamente sensibilizado por concentrações elevadas de progesterona, tornava-o receptivo. Mais tarde o período de receptividade endometrial foi chamado de janela de implantação e definido como: “uma janela temporal de maturação do endométrio durante a qual o trofoblasto pode unir-se às células epiteliais do endométrio” (STRAUSS III; COUTIFARIS, 1999). A janela de implantação no rato tem duração de 12 horas (PSYCHOYOS, 1966) e em humanos, quatro dias (STRAUSS III; COUTIFARIS, 1999).

As alterações morfológicas do endométrio são um conjunto de transformações da membrana plasmática das suas células epiteliais tais como: alterações nos contornos, ultra-estrutura e composição bioquímica; aumento da densidade e tipos de proteínas; decréscimo de carga da superfície, expressão de novos carboidratos e epitopos (PARIA; SONG; DEY, 2001).

A implantação ocorre em três etapas: união, penetração e inclusão (PARR; PARR, 1989; ACOSTA, 1994; PARIA; SONG; DEY, 2001). A união

compreende duas fases: aposição, pré-união ou primeiro estágio de oclusão e adesão ou segundo estágio de oclusão (PARR; PARR, 1989).

Na aposição do blastocisto se imobiliza, mas não se prende no endométrio (ACOSTA, 1994; WEITLAUF, 1994). Durante a aposição, microvilosidades da superfície do trofoblasto e da região apical das células epiteliais do endométrio se interdigitam, aumentando muito a superfície de contato entre as duas estruturas (ENDERS, 1972).

A adesão caracteriza-se pela fixação definitiva do blastocisto ao endométrio. Nessa ocasião observa-se no endométrio: o desaparecimento do glicocálice da superfície luminal das células epiteliais e do trofoblasto e a redução das cargas negativas do glicocálice e das células epiteliais do endométrio (PARR; PARR, 1989; WEITLAUF, 1994).

Na penetração, os processos citoplasmáticos do trofoblasto se estendem entre e debaixo das células epiteliais, que são deslocadas, sofrem apoptose, destacam-se grupos ou isoladamente e são fagocitadas pelo trofoblasto. A penetração do trofoblasto é facilitada pela redução de desmossomos, observado no quinto dia de prenhez (SCHLAFKE; ENDERS, 1975; WEITLAUF, 1994; ILLIIGWORH et al., 2000).

Em seres humanos, observou-se que as células epiteliais do endométrio expressam fator sinalizador de morte – FAS, e o trofoblasto expressa seu ligante FAS-L. Quando se forma o complexo FAS-FAS-L, as

fases da apoptose são ativadas em segundos e desencadeiam a morte celular em horas. Com a morte das células epiteliais, a lâmina basal fica exposta, ocorrendo sua invasão pelo trofoblasto, que chega até ao estroma (PARR; PARR, 1989).

Diante do que foi explanado, fica claro que o período entre fertilização e término da implantação de um embrião envolve alterações de organelas; troca de sinalização entre embrião em desenvolvimento e células endometriais, que resultam em síntese de proteínas e outras substâncias; além de um delicado equilíbrio hormonal e de interações de estruturas do citoesqueleto de células embrionárias e maternas (CATALA, 2000), todas passíveis de se alterarem sob efeito do ultra-som.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Foram usadas ratas Wistar, com três meses de idade, nulíparas, pesando entre 150 e 180g, obtidas na colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução - Universidade Federal de Juiz de Fora. Todos os animais em experimento foram mantidos em armários climatizados (ALESCO).

As condições do alojamento dos animais já foram descritas anteriormente (PINTO et al. 2007).

As ratas foram mantidas em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalha selecionada, mamadeira para água filtrada e cocho para ração do tipo peletizada. A água foi oferecida *ad libitum* e cada rata recebeu, em média, 25g de ração/dia.

As fêmeas foram inseminadas com machos de fertilidade comprovada, considerando-se o primeiro dia de gestação aquele em que foi detectada a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal.

Constatada a inseminação as ratas foram aleatoriamente distribuídas em grupos experimentais - Grupo 1: pulso pulsado; Grupo 2: pulso contínuo; Grupo 3: ultra-som simulado - e mantidas em armários climatizados (ALESCO).

Cada animal foi sedado com 12 mg/Kg de Xilazina, via intraperitoneal e submetido à tricotomia na região abdominal para demarcação

da região de aplicação do ultra-som (Ultrasound Plus marca Advice Máster<sup>1</sup>), que foi realizado desde o primeiro até o quinto dia pós-inseminação (Experimento A) ou do quinto ao sétimo dia pós-inseminação (Experimento B).

*Grupos Experimentais:*

Grupos A1 e B1: foram emitidas ondas com pulso pulsado com 5ms de energia ativa e 5ms inativo.

Grupos A2 e B2: foram submetidos ao mesmo procedimento que os grupos anteriores, porém com pulso contínuo.

Grupos A3 e B3: ultra-som simulado. Procedimento semelhante aos anteriores mas o aparelho ficou desligado.

Para a exposição, foi passado um gel condutor no abdome da rata (LOW; REED, 2001) e nela aplicado o ultra-som com as seguintes características: ERA de 0,4 cm<sup>2</sup>, frequência de 3 MHz, intensidade de 0,6 W/cm<sup>2</sup> (SATA), com um tempo de cinco minutos de aplicação.

<sup>1</sup> Gentilmente cedido pela empresa RO; SU- Indústria e comércio Ltda.

Completado o tempo o gel foi removido do abdome e as ratas foram transportadas para gaiolas limpas, com forro de maravalha selecionada.

Todos os animais foram observados por 30 minutos após a aplicação do ultra-som e, posteriormente, uma vez ao dia, visando à constatação de alterações clínicas indicativas de estresse, dor ou toxicidade, seguindo os critérios descritos por Christian (2001) e Hood; Miller (2006): modificação na deambulação, presença de piloereção, estereotipia, ocorrência de diarreia, cromodacriorréia, perdas sangüíneas vaginais e óbitos.

Os animais pertencentes ao Grupo A foram pesados no 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias pós-inseminação e os do Grupo B no 1<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup>. O consumo de ração pelo Grupo A foi estimado no 2<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> dias pós-inseminação e no Grupo B 2<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> dias de prenhez após esse período foi medido uma vez por semana, tomando-se como base a diferença de peso em gramas da ração colocada num dia e sobras obtidas no dia posterior.

As ratas foram eutanasiadas no 20<sup>o</sup> dia pós-inseminação através de exsangüinação por punção cardíaca sob anestesia com 90 mg/Kg de Ketamina, i.m e 10 mg/Kg de Xilazina i.p. No sangue coletado procedeu-se à análise do hematócrito, da hemoglobina, dos leucócitos totais, do aspartato aminotransferase (AST/TGO), da alanina aminotransferase (ALT/TGP), do colesterol, dos triglicerídeos e da creatinina. Posteriormente, os animais foram submetidos à autópsia para identificação de lesões de órgãos internos. Fígado, rins, ovários, cornos uterinos e tubas uterinas foram removidos, pesando-se os três primeiros em balança de precisão.

Cada ovário foi examinado sob estereomicroscópio para contagem do número de corpos lúteos, e os cornos uterinos foram seccionados longitudinalmente desde a extremidade ovárica esquerda até a direita, expondo-se o seu conteúdo e contando os fetos vivos, mortos e reabsorções.

Foram considerados fetos vivos os que apresentaram movimentos espontâneos ou após estímulo ao toque de uma pinça. Fetos foram examinados externamente à procura de malformações e depois pesados, do mesmo modo que suas respectivas placentas.

Os fetos foram submetidos à crioanestesia e autopsiados para remoção e pesagem de cérebro, coração, pulmão, fígado e rins.

Os dados obtidos foram processados por análise de variância (uma via) e, posteriormente, submetidos a ANOVA – uma via, e ao teste de Dunnett. Dados não paramétricos foram submetidos aos testes do Qui quadrado ou Kruskal Wallis. A hipótese nula foi rejeitada quando  $p < 0,05$ . Para análise estatística foi considerado o peso da cria e não os pesos individuais dos fetos.

O protocolo experimental foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFJF, sendo aprovado (protocolo n<sup>o</sup> 040/2005 CEEA).

## 6. RESULTADOS

6.1 Experimento A: Tratamento do dia 1 ao 5 pós – inseminação.

Não foram observados indícios clínicos de toxicidade materna em nenhum dos grupos analisados. A FIGURA 1 resume os dados sobre o peso corporal materno do experimento A.

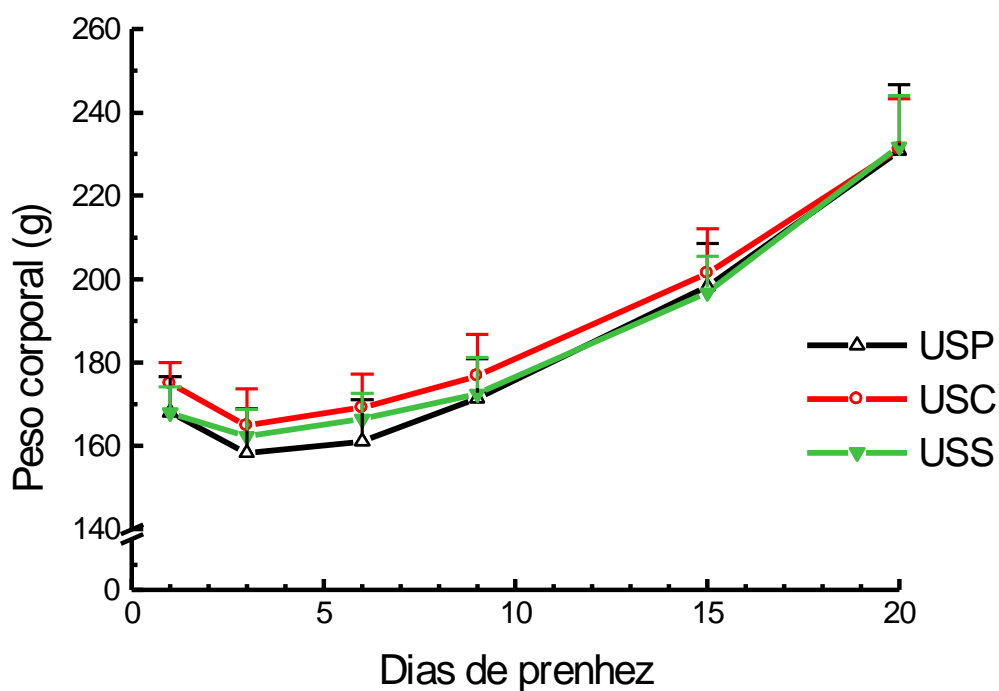


FIGURA 1. Peso corporal materno do experimento A.

Nota-se que o peso corporal das ratas foi semelhante em todos os grupos.



Na TABELA 1 são apresentados os dados referentes ao peso corporal e ao dos órgãos maternos.

TABELA 1 - Peso corporal e dos órgãos de ratas Wistar submetidas, durante os dias 1- 5 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).

Variáveis analisadas	GRUPOS		
	USC	USP	USS
Peso corporal corrigido (g) <sup>1</sup>	194,72 ± 9,81 (14)	188,39 ± 12,64 (15)	191,71 ± 9,87 (13)
Ganho de peso (g)	21,08 ± 6,40 (13)	22,15 ± 4,43 (14)	23,83 ± 7,11 (13)
Fígado (g)	9,51 ± 0,80 (14)	9,45 ± 0,80 (15)	9,21 ± 0,57 (13)
Rim D (g)	0,73 ± 0,08 (14)	0,69 ± 0,04 (14)	0,68 ± 0,05 (13)
Rim E (g)	0,70 ± 0,08 (14)	0,69 ± 0,04 (14)	0,67 ± 0,05 (13)
Rins E+D (g)	1,44 ± 0,16 (14)	1,38 ± 0,07 (14)	1,35 ± 0,10 (13)
Peso relativo rins %	0,74 ± 0,08 (14)	0,73 ± 0,04 (14)	0,70 ± 0,05 (13)
Ovário D (mg)	41,71 ± 9,66 (14)	42,00 ± 14,38 (15)	38,31 ± 10,70 (13)
Ovário E (mg)	31,93 ± 7,86 (14)	35,00 ± 9,23 (15)	37,46 ± 11,03 (13)
Ovários E+D (mg)	73,64 ± 7,93 (14)	77,00 ± 10,38 (14)	75,77 ± 8,74 (13)

<sup>1</sup>Peso corporal corrigido = peso corporal sem útero, ovários e tubas uterinas. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. (N) número de mães estudadas. D= direito; E= Esquerdo. Dados extremos, observados no “box plot”, foram excluídos da análise.  $p > 0,05$ .

Nota-se que não houve alteração de peso corporal e dos órgãos das ratas nos diferentes grupos experimentais.

Na TABELA 2 estão expressos os resultados dos hemogramas e das análises bioquímicas em ratas de todos os grupos experimentais 1-5.

TABELA 2 - Hemogramas e análises bioquímicas de ratas Wistar submetidas, durante os dias 1-5 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).

Variáveis analisadas	GRUPOS		
	USC	USP	USS
Hematócrito (%)	39,07 ± 2,70 (14)	37,47 ± 2,85 (15)	38,53 ± 2,77 (15)
Hemoglobina (g/dl)	12,21 ± 1,06 (14)	12,19 ± 0,71 (15)	11,86 ± 0,80 (15)
Leucócitos totais(cel/mm <sup>3</sup> )	4323 ± 1254 (14)	5306 ± 1351(15)	5426 ± 1555 (15)
T.G.O. (U/L)	83,64 ± 62,32 (14)	35,08 ± 19,12 (13)	47,14 ± 12,23 (14)
T.G.P. (U/L)	35,79 ± 12,88 (14)	33,50 ± 7,92 (16)	32,79 ± 7,56 (14)
Colesterol (mg/dl)	94,75 ± 25,37 (14)	100,02 ± 18,63 (16)	89,96 ± 6,45 (15)
Triglicerídeos (mg/dl)	236,64 ± 75,50 (14)*	248,22 ± 125,15 (16)*	141,73 ± 51,78 (15)
Creatinina (mg/dl)	0,54 ± 0,06 (13)	0,61 ± 0,11 (15)	0,53 ± 0,16 (14)

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. (N) número de mães estudadas. \*p< 0.05 em relação ao grupo USS.

Houve diferença significativa na concentração de triglicerídeos no grupo USC e USP, quando comparado ao USS.

Na TABELA 3 encontram-se os dados relativos à capacidade reprodutiva das ratas nos diferentes grupos experimentais 1 -5.

TABELA 3 - Capacidade reprodutiva das ratas submetidas, durante os dias 1-5 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).

Variáveis Analisadas	GRUPOS		
	USC	USP	USS
C.Lúteos D	6,36 ± 1,65 (14)	6,40 ± 2,06 (15)	5,83 ± 2,17 (12)
C.Lúteos E	4,79 ± 1,53 (14)	5,40 ± 2,20 (15)	6,09 ± 2,07 (12)
C. Lúteos D+E	156	177	137
C. Lúteos/ mãe	11,14 ± 1,17 (14)	11,80 ± 1,01 (14)	11,42 ± 1,62 (12)
Implantes Corno D	5,14 ± 2,21(14)	5,73 ± 1,87 (15)	4,92 ± 2,11 (12)
Implantes Corno E	4,15 ± 1.21 (13)	4,93 ± 2,20 (14)	5,60 ± 1,65 (10)
Implantes	126	155	115
Implantes/ mãe	9,00 ± 2,15 (14)	10,33 ± 1,80 (15)	9,58 ± 1,83 (12)
N <sup>o</sup> fetos vivos (% por grupo)	101 (80,2)	131 (84,5)	93 (69,4)
Fetos vivos /mãe	7,21 ± 2,12 (14)	8,73 ± 1,79 (15)	7,75 ± 2,34 (12)
N <sup>o</sup> Fetos mortos (% por grupo)	7 (6,48)	7 (5,07)	11 (10,6)
Fetos mortos / mãe	1,17 ± 0,41 (6)	1,00 ± 0,01 (7)	1,22 ± 0,44 (9)
N <sup>o</sup> Reabsorções (%por grupo)	17 (5,55)	17 (4,52)	11 (2,40)
Reabsorção/ Mãe	1,89 ± 0,78 (9)	1,89 ± 1,05 (9)	1,38 ± 0,51 (8)

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. (N) o número de mães estudadas. p>0.05. D= direito; E= Esquerdo. p> 0.05

Nota-se que não houve alteração em relação à capacidade reprodutiva das ratas nos diferentes grupos experimentais 1-5.

Os dados referentes ao peso corporal e ao de órgãos de fetos (média/ ninhadas) das ratas submetidas, durante os dias 1-5 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas, pulsadas e ao ultra-som simulado encontram-se na TABELA 4.

TABELA 4: Peso corporal e de órgãos dos fetos das ratas submetidas, durante os dias 1-5 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).

Variáveis Analisadas	Grupos		
	USC	USP	USS
Peso Corporal (mg)	1778,93 ± 228,59(14)	1792,93 ± 228,59(15)	1821 ± 227,41 (15)
Placenta (mg)	467,71 ± 69,63 (14)	461,27 ± 49,72 (15)	464,20 ± 118,25 (15)
Coração (mg)	12,85 ± 2,30 (13)	11,67 ± 1,11 (15)	11,77 ± 1,09 (13)
Fígado (mg)	178,92 ± 18,16 (13)	162,40 ± 18,61 (15)	163,54 ± 21,38 (13)
Rins (mg)	11,31 ± 2,01 (13)	9,27 ± 1,39 (15)	10,31 ± 1,49 (13)
Pulmão (mg)	69,38 ± 9,41 (13)	58,60 ± 8,27 (15)	62,77 ± 9,35 (13)
Cérebro (mg)	110,38 ± 7,74 (13)	103,40 ± 5,82 (15)	104,85 ± 11,98 (13)
Peso Rel coração	0,70 ± 0,08 (13)*	0,65 ± 0,04 (15)	0,63 ± 0,03 (13)
Peso Rel fígado	9,80 ± 0,84 (13)*	9,05 ± 0,68 (15)	8,76 ± 0,49 (13)
Peso Rel rins	6,17 ± 0,76 (13)*	5,15 ± 0,55 (15)	5,52 ± 0,45 (13)
Peso Rel pulmão	3,80 ± 0,44 (13)*	3,26 ± 0,34 (15)	3,36 ± 0,42 (13)

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. (N) o número de ninhadas estudadas. \* p<0.05 em relação ao grupo ultra-som simulado (USS). Rel = relativo.

Houve diferença significativa em relação ao peso relativo do coração, fígado, pulmão e dos rins e no grupo USC, quando comparado ao USS 1-5.

6.2 Experimento B: Tratamento do dia 5 a 7 pós - inseminação.

Não foram observados indícios clínicos de toxicidade materna em nenhum dos grupos analisados. A FIGURA 2 resume os dados sobre o peso corporal materno do experimento B.

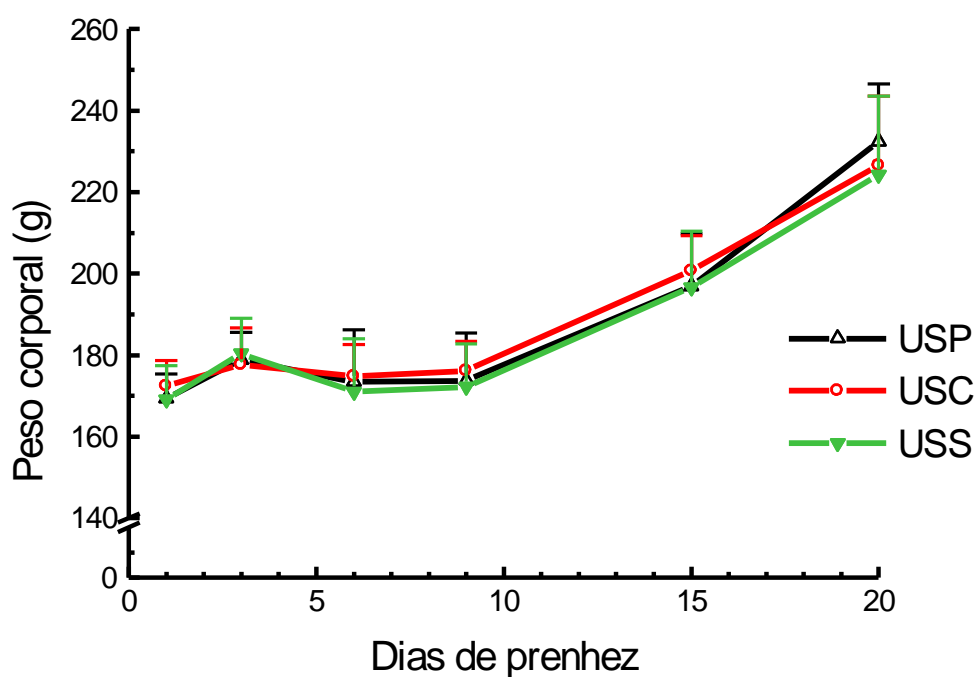


FIGURA 2. Peso corporal materno do experimento B.

Nota-se que o peso corporal das ratas foi semelhante em todos os grupos.

Na TABELA 5 são apresentados os dados referentes ao peso corporal e de órgãos maternos.

TABELA 5 - Peso corporal e de órgãos das ratas submetidas, durante os dias 5-7 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).

Variáveis Analisadas	GRUPOS		
	USC (n=15)	USP (n=15)	USS (n=13)
Peso corporal corrigido (g) <sup>1</sup>	191,7 ± 12,22 (15)	193,3 ± 8,28 (15)	189,0 ± 13,62 (13)
Ganho de peso (g)	19,29 ± 9,02 (15)	24,01 ± 7,25 (15)	20,15 ± 9,05 (13)
Fígado (g)	9,33 ± 1,00 (15)	9,44 ± 0,56 (15)	9,08 ± 0,98 (13)
Rim D (g)	0,68 ± 0,06 (15)	0,69 ± 0,04 (15)	0,70 ± 0,07 (14)
Rim E (g)	0,67 ± 0,07 (15)	0,68 ± 0,05 (15)	0,69 ± 0,07 (14)
Rins E + D (g)	1,35 ± 0,13 (15)	1,37 ± 0,08 (15)	1,40 ± 0,13 (14)
Peso relativo rins %	0,71 ± 0,07 (15)	0,71 ± 0,04 (15)	0,73 ± 0,05 (13)
Ovário D (mg)	38,71 ± 12,46 (14)	65,13 ± 10,41 (15)	44,50 ± 9,78 (14)
Ovário E (mg)	33,6 ± 12,43 (14)	36,57 ± 10,26 (14)	32,43 ± 6,17 (14)
Ovários E + D (mg)	72,36 ± 10,63 (14)	74,93 ± 10,56(15)	76,93 ± 11,86 (14)

<sup>1</sup>Peso corporal corrigido = peso corporal sem útero, ovários e tubas uterinas. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. (N) número de mães estudadas. D= direito; E= Esquerdo. Dados extremos, observados no "box plot", foram excluídos da análise.  $p > 0.05$

Nota-se que não houve alteração de peso corporal e de órgãos das ratas nos diferentes grupos experimentais 5-7.

Na TABELA 6 estão expressos os resultados de hemogramas e análises bioquímicas em ratas de todos os grupos experimentais 5-7.

TABELA 6 - Hemograma e análises bioquímicas das ratas submetidas, durante os dias 5-7 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).

Variáveis Analisadas	Grupos		
	USC	USP	USS
Hematócrito (%)	38,50 ± 4,41 (13)	37,33 ± 3,35 (15)	38,60 ± 1,96 (15)
Hemoglobina (g/dl)	11,41 ± 2,06 (13)*	11,51 ± 0,83 (15)	12,49 ± 1,04 (15)
Leucócitos (cel/mm <sup>3</sup> )	5615 ± 1690 (13)	6005 ± 1416 (15)	5823 ± 1111 (15)
Colesterol (mg/dl)	134,92 ± 66,31 (14)	125,04 ± 45,04 (15)	93,26 ± 7,86 (15)
Triglicerídeos (mg/dl)	276,93 ± 179,05 (14)	253,87 ± 158,71 (15)	151,93 ± 104,71 (15)
T.G.O. U/L	61,36 ± 48,19 (14)	35,07 ± 11,45 (15)	49,07 ± 23,52 (14)
T.G.P. U/L	36,71 ± 12,96 (14)	29,80 ± 6,99 (15)	37,93 ± 12,85 (15)
Creatinina (mg/dl)	0,59 ± 0,084 (14)	0,60 ± 0,109 (15)	0,53 ± 0,137 (15)

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. (N) número de mães estudadas. \*p < 0.05 em relação ao grupo USS.

Houve diferença significativa na concentração de hemoglobina no grupo USC, quando comparado ao USS 5-7.

Na TABELA 7 encontram-se os dados relativos à capacidade reprodutiva das ratas nos diferentes grupos experimentais 5-7.

TABELA. 7: Capacidade reprodutiva das ratas submetidas, durante os dias 5-7 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), ultra-som por ondas pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado (USS).

Variáveis Analisadas	GRUPOS		
	USC	USP	USS
C.Lúteos D	5,79 ± 2,04 (14)*	6,07 ± 1,83 (15)	7,50 ± 1,99 (14)
C.Lúteos E	5,07 ± 2,02 (14)	5,60 ± 1,80 (15)	4,79 ± 0,97 (14)
Corpos lúteos D + E	152	175	172
Corpos lúteos/ mãe	10,86 ± 1,66 (14)	11,67 ± 1,05 (15)	12,29 ± 1,49 (14)
Implantes Corno D	5,64 ± 1,78 (14)	5,47 ± 1,88 (15)	6,00 ± 1,92 (14)
Implantes Corno E	4,64 ± 1,95 (14)	5,29 ± 1,82 (14)	4,31 ± 1,03 (13)
Total de implantes	144	156	140
Implantes/ mãe Nº de fetos vivos (% por grupo)	10,29 ± 1,77 (14) 104 (72,2)	10,40 ± 2,06 (15) 118 (75,6)	10,00 ± 2,11 (14) 84 (60,0)
Fetos vivos / Mãe Nº fetos mortos (% por grupo)	7,43 ± 2,93 (14) 6 (5,4)	7,87 ± 2,87 (15) 3 (2,3)	6,00 ± 3,09 (14) 8 (8,7)
Fetos mortos/mãe Nº de reabsorções (% por grupo)	0,40 ± 0,51 (15) 34 (23,6)	0,20 ± 0,41 (15) 35 (22,4)	0,57 ± 0,51 (14) 48 (34,3)
Reabsorção total / Mãe	3,78 ± 2,59 (9)	2,69 ± 1,60 (13)	4,00 ± 2,76 (12)
% de perdas pré- implantação	13,72 ± 7,10 (6)	20,07 ± 14,00 (9)	20,63 ± 18,26 (12)
Perdas pré- implantação /mãe	1,50 ± 0,84 (6)	2,33 ± 1,50 (9)	2,67 ± 2,50 (12)
% de perdas pós- implantação	32,94 ± 27,06 (12)	29,87 ± 16,12 (13)	42,40 ± 26,53 (13)
Perdas pós- implantação / mãe	3,33 ± 2,46 (12)	2,92 ± 1,55 (13)	4,31 ± 2,69 (13)

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. (N) o número de mães estudadas. \*p<0.05. D= direito; E= Esquerdo.

Nota-se que não houve alteração em relação à capacidade reprodutiva das ratas nos diferentes grupos experimentais 1-5.



Os dados referentes ao peso corporal e de órgãos de fetos (média/ninhadas) das ratas submetidas, durante os dias 5-7 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas, pulsadas e ao ultra-som simulado encontram-se na TABELA 8.

TABELA 8 - Peso corporal e de órgãos dos fetos das ratas submetidas, durante os dias 5-7 pós-inseminação, ao ultra-som por ondas contínuas (USC), pulsadas (USP) e ao ultra-som simulado(USS).

Variáveis Analisadas	Grupos		
	USC	USP	USS
Peso Corporal (mg)	1989,78 ± 176,70 (14)	1902,80 ± 185,78 (15)	1851,07 ± 206,75 (14)
Peso Placenta (mg)	455,23 ± 60,23 (14)	415,33 ± 37,93 (15)*	478,21 ± 89,56(14)
Peso Coração (mg)	14,58 ± 2,06 (12)*	11,73 ± 1,91 (15)	12,55 ± 1,13 (9)
Peso Fígado (mg)	190,25 ± 19,21 (12)	174,93 ± 26,48 (15)	173,22 ± 8,79 (9)
Peso Rins (mg)	12,18 ± 2,86 (12)	10,87 ± 1,81 (15)	10,44 ± 0,88 (9)
Peso Pulmão (mg)	71,42 ± 9,46 (12)	65,7 ± 12,35 (15)	66,11 ± 3,44 (9)
Peso Cérebro (mg)	121,75 ± 14,60 (12)*	110,33± 14,27 (15)	103,44 ± 9,15 (9)
Peso Rel rins	0,61 ± 0,14 (11)	0,57 ± 0,07 (15)	0,55 ± 0,06 (9)
Peso Rel coração	0,72 ± 0,08 (12)	0,62 ± 0,09 (15)	0,66 ± 0,05 (9)
Peso Rel fígado	9,44 ± 0,64 (12)	9,16 ± 0,84 (15)	9,14 ± 0,69 (9)
Peso Rel pulmão	3,55 ± 0,43 (12)	3,41 ± 0,46 (15)	3,49 ± 0,26 (9)

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. (N) o número de ninhadas estudadas. \* p<0.05 em relação ao grupo ultra-som simulado (USS). Rel = relativo.

Houve diferença significativa em relação ao peso do coração e do cérebro no grupo USC e peso de placenta no grupo USP, quando comparado ao USS 5-7.

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo procurou-se um modelo experimental que se assemelhasse ao procedimento terapêutico para reabilitação de disfunções dermato-funcionais. As regiões do abdome da rata, aproximadamente correspondentes à posição dos cornos uterinos, foram expostas à mesma intensidade e tempo previstos para uma aplicação de ultra-som terapêutico: 3MHz, onda pulsada ou contínua, intensidade de  $0,6 \text{ W/cm}^2$  por 5 minutos.

Com o propósito de distinguir efeitos nocivos das ondas ultra-sônicas sobre o organismo materno, que causando alguma alteração pudesse interferir com o desenvolvimento embrionário (KHERA, 1985, 1987), procedeu-se à análise dos indicativos clínicos de toxicidade, estresse ou sofrimento materno (CHAHOUUD et al., 1999; HOOD; MILLER, 2006). Nenhum de tais indicativos foi evidente entre os grupos experimentais, o que sugere ausência de efeitos lesivos das ondas, pulsadas ou contínuas, concordando com trabalhos de Vorhess et al., 1991, que também não encontraram efeitos tóxicos maternos em ratas não anestesiadas expostas ao ultra-som (3.0 MHz, intensidade 0.1, 0.2 ou 30.0  $\text{W/cm}^2$ , onda contínua), desde o quarto até o 19<sup>o</sup> dia pós-inseminação por 15 minutos/dia, e Kimel et al., (1989), que expuseram camundongos fêmeas ao ultra-som( 1 MHz, intensidade de 0-1.0  $\text{W/cm}^2$ , onda pulsada) no 8<sup>o</sup> dia de prenhez, por 10 min.

Os exames laboratoriais e hematológicos do presente estudo corroboram a hipótese de ausência ou baixa toxicidade, pois a única alteração observada referiu-se aos triglicérides, aumentados nos grupos expostos ao ultra-som (experimento A) e redução na concentração de hemoglobina (experimento B). Nenhum dos dois dados é acompanhado de outras alterações que sugerissem comprometimento importante do organismo materno, capaz de interferir com o desenvolvimento do embrião ou feto.

As condições hormonais maternas são muito importantes para o desenvolvimento embrionário. Embora as fases iniciais da prenhez da rata sejam prolactino-dependentes, níveis sanguíneos de progesterona, ou de estrogênio, inadequados, interferem na viabilidade do embrião, por alterarem o trânsito tubário (CARSON; NAFTOLIN, 1982; FORCELEDO; CROXATTO, 1988; VINIJISAMUN, 1990; CROXATTO et al.,1991; PARIA; SONG; DEY, 2001).

Diferentemente do que acontece em humanos, na gestação da rata os corpos lúteos mantêm-se ativos durante todo o período gestacional e são necessários ao seu êxito (KELLER, 2006). Eles aumentam de volume ao longo da prenhez e demonstrou-se também que seu crescimento está intimamente correlacionado ao aumento de secreção de progesterona e 20-hidroxi-progesterona, hormônios também indispensáveis à manutenção da prenhez na rata (UCHID et al., 1970).

Por serem as estruturas mais volumosas do ovário, os corpos lúteos contribuem bastante para o peso do ovário do animal prenhe (WAYNFORTH, 1971) e, dessa forma, o peso do ovário e o número de corpos lúteos permitem uma avaliação indireta dos progestágenos maternos. Nos dois grupos experimentais, foram encontrados pesos de ovários e número de corpos lúteos semelhantes, o que pode ser tomado como indício de que o ambiente hormonal materno não diferiu entre eles.

Pode-se, portanto, concluir que a exposição de ratas desde o primeiro até o sétimo dia pós-inseminação, ao ultra-som terapêutico, não causou alterações maternas capazes de interferir no desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento animal pode ser basicamente dividido em três períodos com relação à sua susceptibilidade à lesão: *[a] pré-diferenciação* – compreendendo as primeiras divisões celulares e a formação do blastocisto – quando um toxicante produz, com poucas exceções, o “efeito tudo ou nada” -; *[b] diferenciação precoce* correspondendo à fase de organogênese – período em que os esboços embrionários de órgãos e sistemas estão em desenvolvimento e *[c] diferenciação avançada*, quando ocorre a histogênese e a maturação funcional dos órgãos (HOOD, 2006).

A fase de pré-diferenciação é feita no interior da tuba uterina, em um ambiente líquido. Em ratas, o dia 1 pós-inseminação corresponde à fertilização e ao início da primeira divisão da clivagem; no segundo dia permanecem em

fase de dois blastômeros. Ao longo do terceiro dia encontram-se fases de duas a quatro células. No quarto dia observa-se a fase de mórula e, ocasionalmente, alguns blastocistos em fase inicial de desenvolvimento (SOUZA; GUERRA; PETERS, 1997; ALBERTS et al.,1997; MOLEY, 1999; MOORE; PERSAUD, 2000). Entre o terceiro e o quarto dias após a inseminação, inicia-se a blastogênese e, no quinto dia, os blastocistos já migraram para o útero, onde iniciam a implantação, que se completa no sétimo dia pós-inseminação (MASON; KANG, 1994; MOLEY, 1999).

A exposição das ratas ao ultra-som durante os dias 1 a 7 pós-inseminação, envolve, portanto, o período em que todas as células do conceito estão em atividade mitótica elevada, logo susceptíveis a alterações na divisão celular. Lesões na fase de pré-diferenciação podem ser graves, causando a morte do conceito, ou alterações moderadas a leves, que retardam seu crescimento e desenvolvimento. O transporte pelo trato reprodutor pode ser acelerado ou retardado, o que leva à dissincronia entre a fase de desenvolvimento e a janela de implantação, impedindo ou interrompendo o processo de implantação, o que também resulta em morte do conceito.

A morte durante a fase precoce do desenvolvimento pode ser inferida pelo aumento do índice de perdas pré – embrionárias (estimado tomando cada corpo lúteo como indicativo de um ovócito que, sendo fecundado, geraria um zigoto ) (KELLER, 2006); pelo aumento de reabsorções

precoces ou tardias, que mostram mortes de embriões implantados e pelo menor número de implantes ou fetos no útero.

A diferença entre corpos lúteos e implantes nos cornos uterinos indica, aproximadamente, o número de conceptos “perdidos” (TYL; MARR, 2006). Os dados obtidos no trabalho mostram que a média de implantes por mãe e o índice de perdas embrionárias pré-implantação foram semelhantes em todos os grupos estudados; portanto, é possível supor que nem as ondas emitidas no modo pulsado nem contínuo interferiram no desenvolvimento das fases pré-diferenciadas.

Outro fator que pode influir no desenvolvimento e na sobrevivência do embrião em sua fase inicial de desenvolvimento diz respeito ao transporte tubário.

O tempo de transporte do embrião pela tuba uterina dura quatro a cinco dias (SINGH et al., 1993; SOUZA; GUERRA; PETERS, 1997). Hormônios como o estrogênio e a progesterona modificam as contrações tubárias; o primeiro acelera o trânsito tubário, já a progesterona o retarda (CARSON; NAFTOLIN, 1982; FORCELEDO; CROXATTO, 1988; VINIJISAMUN, 1990; CROXATTO et al., 1991). Por outro lado, produtos secretados pelo embrião e pelas células tubárias e estruturas do citoesqueleto, necessárias às modificações morfogênicas do embrião (CATALA, 2000), também não parecem ter sido influenciados pelas ondas ultra-sônicas uma vez que o número de implantes / mãe e o índice de implantação estariam reduzidos o que não se

observou. É possível, assim, sugerir que ondas pulsadas ou contínuas do ultra-som não altera o trânsito tubário nem o “diálogo” entre embrião e células tubárias.

Como já foi citado, os efeitos do ultra-som terapêutico envolvem mecanismos que aumentam a permeabilidade da membrana celular, alteram a difusão de íons, promovem vasodilatação, modificam a posição de partículas intra ou extracelulares, ou mesmo a configuração normal da célula, levando à alteração de suas atividades (HILL, 1972; GUIRRO; GUIRRO, 2004). Além disso, estudos “in vitro” mostraram ruptura de membranas e de macromoléculas e desnaturação de enzimas em cultivos celulares submetidos ao ultra-som terapêutico (LEITE, 1989). Tais alterações poderiam interferir nos mecanismos iniciais das divisões celulares e processos de difusão de informações intercelulares, levando a mortes ou malformações. De fato, Shoji, Murakami, Shimizu (1975), relatam que a intensidade do ultra-som, dentro da escala terapêutica, pode estar associado a anomalias congênitas em camundongos. McLEOD e FOWLOW (1989), relataram agenesias sacrais, microcefalia e atraso no desenvolvimento, deficiência no crescimento intrauterino e pós-natal em recém-nascido de uma mulher submetida a 18 aplicações de ultra-som terapêutico para tratar uma bursite no íleo esquerdo do 6<sup>o</sup> ao 29<sup>o</sup> dia de gestação; foram constatadas malformações na criança.

No presente trabalho, não foram observadas malformações externas e as mortes fetais ocorreram na mesma proporção em todos os grupos experimentais, concordando com o reportado por Fisher et al. (1994), que

expuseram ratas anestesiadas e imersas num tanque de água, do quarto ao 19<sup>o</sup> de prenhes, ao ultra-som (3MHz, onda pulsada, com intensidades de até 30 W/cm<sup>2</sup> (SPTA)), durante 10 minutos, e McClain, Hoar, Saltzman (1972), que expuseram ratas prenhas no período da organogênese ao ultra-som de 2MHz, onda contínua, por períodos de até 2 horas por dia.

Não foram observadas alterações no peso corporal, concordando com Child, Carstensen e Davis (1984); Vorhess et al.(1991) e Norton et al. (1991). Entretanto, Hande e Davi (1992) relataram redução do peso e diminuição do comprimento dos fetos de camundongos, cujas mães foram expostas ao ultra-som pulso contínuo (3,5 MHz, intensidade 65mW/cm<sup>2</sup>), em um único dia - 3,5 ou 6,5 pós-inseminação, por 10 minutos. Os autores sugerem que o ultra-som pode promover efeitos adversos em embriões de camundongos, dependendo do estágio de desenvolvimento a que forem expostos.

A ausência de efeito teratogênico, observada no presente trabalho, também foi constatada por Kimel et al. (1983) em fêmeas de camundongo expostas no 8<sup>o</sup> dia de prenhez; por Vorhess et al.,1991, quando expuseram ratas do 4<sup>o</sup> ao 19<sup>o</sup> dia de prenhez; por Margulies et al. (1991). Shoji, Murakami, Shimizu (1975) e McLeod, Fowlow (1989) discordam destes resultados.

Fetos de mães irradiadas entre os dias 1 a 5 pós-inseminação tiveram peso relativo de coração, fígado e rins superiores aos de ultra-som



simulado, já os de mães expostas entre os dias 5 a 7 apresentaram peso do cérebro e do coração maior que os de ultra-som simulado, indicando maior crescimento desses órgãos. Estes resultados discordam dos apresentados por Akamatsu (1981), que relatou retardo no desenvolvimento embrionário de ratas expostas, “in vitro”, na fase de mórula tardia e no início da formação do blastocisto, ao ultra-som (onda contínua, com intensidade de 0.65, 1, 1.8, 2 ou 3 W/cm<sup>2</sup>). Notou-se que, com a intensidade de 2 ou 3 W/cm<sup>2</sup>, também foram observadas alterações morfológicas.

Barnet, Walsh e Angles (1990) expuseram embriões no dia 9,5<sup>o</sup> de prenhez, *in vitro* ao ultra-som de 3,14MHz e analisaram sua morfologia após 48 horas de cultivo. Os embriões expostos ao ultra-som durante 5 a 15 minutos, a 38,5<sup>o</sup> C, não apresentaram alterações, mas com 30 minutos mostravam pequena diminuição do mesoblasto. Quando expostos por 15 minutos, à temperatura de 40<sup>o</sup> C exposição, foi observada redução significativa na proporção cabeça / corpo.

Conforme foi mencionado, é muito difícil realizar comparações entre os resultados encontrados pelos diferentes autores que estudaram o efeito do ultra-som sobre o desenvolvimento embrionário. Os experimentos observados na literatura são, na maioria das vezes, incompatíveis com a realidade clínica. Além disso, tempos de exposição, tipo de pulso, intensidade e frequência são diferentes conforme os autores. No presente trabalho, procurou-se um modelo experimental mais próximo do que acontece nos tratamentos das

dermatopatias funcionais, e outros estudos estão em desenvolvimento, visando comprovar e ampliar os resultados encontrados até o momento.

Em conclusão, no modelo experimental usado, não foram observados efeitos tóxicos do ultra-som sobre o organismo materno. Também no ultra-som pulsado não houve efeito sobre os fetos no período de pré-implantação, mas as ondas contínuas induziram aumento do peso relativo do coração, fígado, pulmão e dos rins. No período de implantação do blastocisto, o ultra-som pulsado causou diminuição do peso da placenta, e as ondas contínuas acarretaram aumento do peso absoluto do cérebro e do coração.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, V.; ZISKIN, M. C.; HEYNER, S. Temperature elevation in the rat fetus due to ultrasound exposure. *Ultrasound Med Biol*, v. 15, n. 5, p. 443-9, 1989.

ACOSTA, A. A. Implantación humana del pre-embrión: aspectos básicos clínicos e investigación futura. *Rev Lat Amer Esteril Fertil*, v. 8, n. 1, p. 4-20, 1994.

AKAMATSU, N. Ultrasound irradiation effects on pre-implantation embryos. *Acta Obstet Gynaecol*, v. 33, n. 7, p. 969-78, 1981.

ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap. 20, p. 1030-5.

ARAÚJO, M. et al. Efeitos do Ultra-som de Baixa Intensidade na Veia Auricular de Coelhos. *Acta Cir Brás*, v. 8, p. 25-31, 2003.

ATKINSON, D. E.; SIBLEY, C. P.; WILLIAMS, A. R. Effects of ultrasound on placental transfer during the last third of gestation in the rat. *Ultrasonics*. v. 28, p. 171-5, 1990.

BARNETT, S. B.; WALSH, D. A.; ANGLES, J. A. Novel approach to evaluate the interaction of pulsed ultrasound with embryonic development. *Ultrasonics*. v. 28, p. 166-70, 1990.

BASS, H. E.; SHIELDS, F. D. Ultrasonic Relaxation Processes. In: CROCKER, M. C.; WILEY, S.; SONS. *Handbook of Acoustics*. 1998, cap. 421, p. 495-503.

BAZER, F. N.; ROBERTS, R. M. Biochemical aspects of conceptus – endometrial interactions. *J Exp Zool*, v. 228, p. 373-82, 1983.

BERNARDES, R. et al. Evaluation of apical cavity preparation with a new type of ultrasonic diamond tip. *J Endod*, v. 33, p. 484-7, 2007.

**BORGES, F.** Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas. São Paulo: Phorte, 2006.

**BYL, N.N. et al.** Low- dose ultrasound effects on wound healing: a controlled study with yucatan pigs. Arch Phys Med Rehabil v. 73, p. 656-64, 1992.

**BYL, N.N. et al.** Incisional wound healing: a controlled study of low and high dose ultrasound. J Orthop Sports Phys Ther v. 18, p. 619-628, 1993.

**CARSON, G-D.; NAFTOLIN, F.** Fertilization and pre-implantation development. Vie Med Can Fr v. 11, p. 375-81, 1982.

**CATALA, M.** Embriologia. Desenvolvimento humano inicial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. 189p.

**CHAHOUD, I. et al.** Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. Reprod Toxicol v. 13, p. 375-81, 1999.

**CHILD, S. Z.; CARSTENSEN, E. L.; DAVIS, H.** A test for the effects of low-temporal-avarege-intensity pulsed ultrasound on the rats. Expl Cell Biol. v. 52, p. 207-10, 1984.

**CHRISTIAN, M. S.** Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. p. 1301-1381. In: W. HAYES. Principles and Methods of Toxicology. 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.

**CLARK, R. A. F.** Cutaneous Wound Repair. In: GOLDSMITH, L.E. Biochemistry and Physiology of the Skin. Oxford: Oxford University Press, 1990, p. 576-601.

**CLEMETSON, C. A. B.; MOSHFEGHI, M. M.; MALLIKARJUNESWARA, V. R.** The surface charge on the five- day rat blastocyst. In: BLANDAU, R. J. The biology of the blastocyst. Chicago: The University of Chicago Press. 1971, p. 193-205.

**CROXATTO, H. B. et al.** Hormonal control of ovum transport through the rat oviduct. Arch Biol Med Grap, v. 24, p. 403-10, 1991.

DELISA, J. A; GANS, B. Medicina de Reabilitação: princípios e prática. 3. ed, São Paulo: Manole, v. 1, 2002.

DUMM, G. C. Embriologia humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 422 p.

DYSON, M. The effect of ultrasound on the rat of wound healing and the quality of scar tissue. In: MORTIMER, A. J.; LEE, N. Proceedings of the international Symposium on Therapeutic Ultrasound, Manitoba. Canadian Physiotherapy association, Winnipeg, 1981. p. 110-23.

DYSON, M. Non-Thermal cellular effects of ultrasound. Br J Cancer, v. 45, p. 165 –71. 1982.

DYSON, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. Physiotherapy. v. 73, p. 116-20, 1987.

DYSON, M. Role of ultrasound in wound healing. In: KLOTH, L. C.; McCULLOCH, J. M.; FEEDAR. J. A. Wound healing: Alternatives in Management. DAVIS, F. A. Philadelphia, 1990. p. 259-85.

ENDERS, A. C. Mechanisms of implantation of the blastocyst. In: VELARDO, J. T., KASPROW, B. A. Biology of reproduction: basic and clinical studies. New Orleans: Pan American Association of Anatomy. 1972. p. 313-33.

ENDERS, A. C.; SCHLAFKES, S. Surface coats of the mouse blastocyst and uterus during the pre implantation period. Anat. Rec. v. 180, p. 31-46, 1974 apud WEITLAUF, H. M. Biology Implantation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. The physiology of reproduction. 2. ed. New York: Review Press, 1994. p. 391-440.

EVANS, P. The healing process at cellular level: a review. Physiotherapy, v. 66, p. 256-9, 1980.

FANG, J. Y. et al. Effect of low frequency ultrasound on the vitro percutaneous absorption of clobetasol 17- propionate. Int J Pharm v. 9, p. 33-42, 1999.

FAZLEABAS, A. T.; VERHAGE, H. G. Embryos maternal dialogue in the primate: regulation of insulin-growth binding protein (IGFBP-1). Arch Biol Med Exp, v. 24, p. 311-15, 1991.

FINN, C. A. The implantation reaction. In: WYNN, R. M. Biology of the uterus. New York: Plenum Press, 1977. p. 245-308.

FISHER, J. E. et al. Teratologic evaluation of rats prenatally exposed to pulsed-wave ultrasound. *Teratology*, v. 49, p. 150-5, 1994.

FLINT, E. B.; SUSLICK, K. S. The temperature of cavitation. *Science*. v. 253, p. 1397, 1991.

FORCELLEDO, M. L.; CROXATTO, H. B. Effects of 4-hydroxyandrostenedione and exogenous testosterone on blood concentration of oestradiol and oviductal embryo transport in the rat. *J Endocrinol*, v. 118, p. 93-100, 1988.

FRIZZEL, L. A.; DUNN F. Biophysics of ultrasound. In: LEHMANN J. F. *Therapeutic Heat and Cold*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.

GAGIOTI, S.; SACAVONE, C.; BEVILACQUA, E. Participation of the mouse implanting trophoblastic in nitric oxide production during pregnancy. *Biol Reprod*, v. 62, p. 260-8, 2000.

GONÇALVES, W. L. et al.; Utilização da terapia ultra-sônica de baixa intensidade na redução da lipodistrofia ginecólica: uma terapia segura ou risco cardiovascular transitório? Um estudo pré-clínico *An Bras Dermatol*, v.80, p. 356-9, 2005.

GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Como um mamífero se desenvolve desde a fertilização até a implantação do blastocisto. *Bol Centr Biol Reprod*, v. 18, p. 15-32, 1999.

GUIRRO, E., GUIRRO, R. *Fisioterapia Dermato- Funcional*. 3. ed., Barueri: Manole, 2004. 559 p.

GUIRRO, E. C. O.; FERREIRA, A. L.; GUIRRO, R. R. J. Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial em ratos. *Ciência e Tecnologia*. v. 83, p. 37-47, 1995.

HALLOW, D. et al. Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects. *Ultrasound Med Biol*, v. 32, n. 7, p. 1111-22, 2006.

HANDE, M. P.; DEVI, P. U. Effect of prenatal exposure to diagnostic ultrasound on the development of mice. *Radiat Res*, v. 130, p. 125-8, 1992.

HARPER, M. J. K.; NORRIS, C. J.; RAJKUMAR, K. Prostaglandin release by zygotes and endometria of pregnant rabbits. *Biol Reprod*, v. 28, p. 350-62, 1983.

HARPER, M. J. K. Gamete and zygote transport. In: KBOBIL, E.; NEILL, J. D. *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 123-87.

HARVEY, M. B.; KAYPE, P. L. Insulin-like growth factor-I stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. *Mol Reprod Dev*, v. 31, p. 195-9, 1992.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER, H. M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod* v. 59, p. 1302-10, 1998.

HILL, C. R. Ultrasonic Exposure Threshold for Changes in Cell and Tissues. *J Acoust Soc Am*, v. 52, p. 667-72, 1972.

HOOD, RD; MILLER, DB. cap. 4 Maternally mediated effects on development. P. 93-124 In: HOOD, RD (ed) *Developmental and reproductive toxicology - a practical approach*. 2ed. Londres: Taylor & Francis, 2006.

HOOGLAND, R. *Ultrasound Therapy*. Delft: Enraf Nonius, Holland, 1986.

ILLINGWORTH, I. M. et al. Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the preimplantation period of pregnancy: a mechanism for facilitation of implantation. *Biol Reprod*, v. 62, p. 1764-73, 2000.

IWABE, T. Effect of Pulsed Ultrasound Exposure on Development of Early Embryos. *Nippon Sanka Funjinka Gakkai Zasshi*. v. 45, p. 113-8, 1993.

JENSH, R. P. et al. Effects of prenatal ultrasound exposure on adult offspring behavior in the wistar rat. *Proc Soc Exp Biol Med* v. 210, p. 171-9, 1995.

KANAJANAPOTHI, D. et al. Post coital anti-fertility effect of *Mentha arvensis*. *Contraception*. v. 51, p. 141-146, 1981.

KELLER, K.A Development and reproductive toxicology. Cap. 2 p. 305 –55. In: KELLER, K.A ; Jacobson – Kram, D. *Toxicological testing handbook*. 2ed. Informa healthcare: New York, 2006.

Khera KS Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology* v. 31, p. 129-53, 1985.

\_\_\_\_\_ Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. *CRC Crit Rev Toxicol* v.17, p. 345-75, 1987.

KIMMEL, C. A. et al. The embryotoxic effects of ultrasound exposure in pregnant ICR mice. *Teratology*. v. 27, p. 245-51, 1983.

KIMMEL, C. A. et al. Developmental exposure of mice to pulsed ultrasound. *Teratology*. v. 4, p. 387-93, 1989.

KINOSHITA, K. et al. Involvement of prostaglandins in the pregnant mouse. In: HAYAISHI, O.; YAMAMOTO, S. *Advances in prostaglandins, tromboxane and leukotriene research*. New York: Raven Press, 1985. v. 15.

KITCHEN, S; BAZIN, S. *Eletroterapia de Clayton*. Tradução: Fernando Gomes do Nascimento. São Paulo: Manole, 1998. Original inglês.

Kitchen SS, Partridge J. A review of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* v. 76, p. 593-0,1990.

KOBAYASHI, M. et al. Rat hepatoma reuber H-35 cells produce factors that promote the hatching of mouse embryos cultured in vitro. *Biol Reprod*, v. 56, p. 1041-9, 1997.

LAURINCK, J. et al. Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. *Biol Reprod*, v. 62, p. 1024-32, 2000.



LEE KEVIN Y; DEMAYO FRANCESCO J Animal models of implantation  
Reproduction, v.128, p. 679–95, 2004.

LEITE, A. J. Quantificação da ruptura celular produzida por Ultra-som em eritrócitos do sangue humano. Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado) – Faculdades de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, 1989.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. Am J Pathol, v. 78, p. 71-92, 1975.

LIM, K. J. H; ODUKOYA O. O. A.; AJJAN, R. A. et al. The role of T- helper cytokines in human reproduction. Fertil Steril, v. 73, p.136-42, 2000.

LOW, J.; REED, A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. 3. ed. Barueri: Manole, 2001. 472 p.

MANSON, J. M.; KANG, Y. J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology, In: HAYVES, A.W. Principles and Methods of Toxicology 3. ed. 1994. cap.28, p. 989-1037.

MARGULIES, N. et al. Reversible biochemical changes in the developing rat central nervous system following ultrasound exposure. Ultrasound Med Biol, v. 17, p. 383-90, 1991.

McCLAIN, R. M.; HOAR, R. M.; SALTZMAN, M, B. Am J Obstet Gynecol, v. 11, p. 39-42, 1972.

McDIARMID T., BURNS P. N. Clinical applications of therapeutic ultrasound. Physiotherapy. v. 73, p. 155- 62, 1987.

McLEOD, D. R.; FOWLOW, S. B. Multiple malformations and exposure to therapeutic ultrasound during organogenesis. Am J Med Genet. v. 34, p. 317-9, 1989.

MOLEY, K. H. Diabetes and preimplantation events of embryogenesis. Semin Reprod Endocrinol. v. 17, p. 137-51, 1999.

MORTIMER, A. J.; DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts . *Ultrasound Med Biol.* v. 14, p. 499-506, 1988.

MOORE, G. D.; CROXATTO, H. B. Effects of delayed treatment with estrogen on the transport of microspheres by the rat oviduct. *J Reprod Fertil*, v. 83, p. 795-802, 1988.

MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N. *Embriologia clínica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2000. 543p.

MUMMERY, C. L. The effect of ultrasound in fibroblasts in vitro. (PhD Thesis), University of London, 1987 apud Dyson, M. Mechanisms involved i therapeutic ultrasound. *Physioterapia*. 203

NORTON, S. et al. Acute response of fetal rat telencephalon to ultrasound exposure in utero. *Exp Neurol*, v. 107, p. 154-63, 1990.

NORTON, S. et al. Prenatal and postnatal consequences in the brain and behavior of rats exposed to ultrasound in utero. *J Ultrasound Med*, v. 10, p. 69-75, 1991.

O'BRIEN, W.D.J; STRATMEYER, M. E. Ultrasonically induced weight reduction in mice. *Congen Animal*, v. 15, p. 260, 1975.

O'RAHILLY, R.; MULLER, F. *Embriologia e teratologia humana*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2001 Cap. 9 Teratologia p. 102-18.

PAKRASI, P. L.; DEY, S. K. Blastocyst is the source of prostaglandins in the implantation site in the rabbit. *Prostaglandis*, v. 24, p. 73-7, 1982. .

PARIA, B. C.; SONG; H., DEY; S. K. Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. *Int J Dev Biol*, v. 45, p. 597-605, 2001.

PARR, M. B.; PARR, E. L. The implantation reaction. In: WYNN, R. M. & JOLLIE, W. P. *Biology of the uterus*, 2 ed. New York: Plenum Medical Book Company, 1989. p. 233-77.

PINTO, R. M. et al. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. *Reprod Toxicol*, v. 23 p. 480–5, 2007.

PSYCHOYOS, A. Recent research on egg implantation. In: WOLSTENHOLME, G. E. W.; O'CONNOR, M. *Egg implantation*; Boston: Little, Brown and Company. 1966. p. 4-15.

RAMIREZ, A. et al. The effect of ultrasound on collage synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc*, v.29, p. 326, 1997.

RONDEROS, J. R. Cap. 3 Fecundação In: Dumm, César Gómez. *Embriologia Humana. Atlas e texto*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. p. 45-54.

ROSSI-FERRAGUT, L. M., et al. Entendendo o processo de fertilização...(da capacitação espermática até a fusão entre as membranas plasmáticas) Parte I. *J. Brasileiro Reprod. Assist.*, v. 5, p. 30-4, 2001.

SARTOR, P.; DULUC, A. J. *Physiologie animale. Déroulement dès premiers stades de l' oviimplantation chez des rattes castrées le 5<sup>eme</sup> jour de la gésation avant midi*. *C R Acad Sc Paris*, v. 290, p. 481-4, 1980.

SCIALLY, A. R. *A clinical guide to reproductive and developmental toxicology*. CRC Press, Boca Raton, 1992, p. 284.

SCHLAFKE, S.; ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biology Reproduction*, v. 12, p. 41-64, 1975 apud FINN, C. A. *The implantation reaction*. In: WYNN, R. M. *Biology of the uterus*. New York: Plenum Press, 1977. p. 245-308.

SENGUPTA, J.; ROY, S. K.; MANCHANDA, S. K. Effect of an anti-oestrogen on implantation of mouse blastocysts. *J Reprod Fertil*, v. 62, p. 433-6, 1981.

SINGH, M. M. et al. Antigestagenic activity of *Ixora finlaysoniana* in rat. *Contraception*, v. 48, p. 179-89, 1993.

SHOJI, R; MURAKAMI, U.; SHIMIZU, T. Influence of low- intensity ultrasonic irradiation on prenatal development of two inbred mouse strains. *Teratology*. v.12, p. 227-32, 1975.

SKAUEN, D. M.; ZENTNER, G. M. Phonophoresis. *Int J Pharm*, v. 20, p. 235-45, 1984.

SOUZA, E. R.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M.. Desenvolvimento de pré – embriões de ratas Wistar da colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução. *Bol Cent Biol Reprod*, v.16, p. 62- 70, 1997.

SPANOS, S. et al. Apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human implantation embryo development. *Biol Reprod*, v. 62, p. 1413-20, 2000.

STARKEY, C. Recursos Terapêuticos em Fisioterapia. 2. ed., Barueri: Manole, 2001. 421 p.

STEWART, C. L. et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature*, v. 39, p. 76-7, 1992.

STRAUSS III, J.; COUTIFARIS, C. The endometrium and myometrium: regulation and dysfunction. In: YEN, S. S. C; JAFFE, R. B.; BARBIERI, R. L. *Reproductive Endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management*. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. cap. 8.

TER HAAR , G. Basic physics of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v. 73, n. 3, p. 110-20, 1987.

TONG, T. Y. Y. et al. Direct effects of varying doses of oestradiol on early embryonic development in vitro culture of rats two-cell embryos. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 78, p. 453-6, 2000.

TSAI, H-D. et al. Recombinant human leukemia inhibitory factor enhances the development of preimplantation mouse embryo in vitro. *Fertil Steril*, v. 71, p. 722-5, 1999.

TYL, RW ; MARR,MC Development toxicity testing – Methodology. Cap. T. p. 201-61 37, 2007. In: Hood, RD (ed) *Developmental and reproductive toxicology - a practical approach*. 2ed. Taylor & Francis: Londres, 2006.

TYLE, P.; AGRAWALA, P. Drug delivery by phonophoresis. *Pharm Res*, v. 6, p. 355-61,1989.

UCHID, K. et al. Relationship between ovarian progesterin secretion and corpora lutea function in pregnant rat. *Endocri Jpn*, v. 17, p. 499-507, 1970.

ULLMANN, D.; REIS, T. M.; STEIBEL, V. *Princípios Básicos da Medicina Estética*. Rio de Janeiro: Letra Capital, 2004. 279 p.

VIGGIANO, M. et al. Probable influence of ova and embryo prostaglandins in the differential transport in pregnant and cycling rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid*, v. 45, p. 211-5, 1992.

VIGGIANO, M.; CEBRAL, E.; GIMENO, M. F. Influence of ova within rat oviducts on spontaneous motility and on prostaglandin production. *Prostaglandins Leukot Essent. Fatty Acid*. v. 41, p. 13-17, 1990. apud HARPER, M. J. K. Gamete and zygote transport. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994. p.123-127.

VINIJSAMUN, A. et al. Effects of monoclonal antibody against progesterone on embryo transport, development and implantation in laboratory mice. *Reprod Fertil Develop*, v. 2, p. 395-405, 1990.

VORHESS, C. V. et al. A teratologic evaluation of continuous-wave, daily ultrasound exposure in unanesthetized pregnant rats. *Teratology*. v. 44, p. 667-74, 1991.

VORHESS, C. V. et al. Behavioral teratologic effects of prenatal exposure to continuous-wave ultrasound in unanesthetized rats. *Teratology*, v. 50, p. 238-49, 1994.

WADSWORTH, H., CHANMUGAN, A. P. P. *Eletrophysical Agents in Phsiotherapy*. Marrickville, NSW, Australia: Science Press, 1980.

WAYNFORTH H. B. Changes in the volume of rats corpus luteum during pregnancy and after surgical interference with the uterus and placenta. *Acta Endocrinol*, v. 66, p. 296-302, 1971.

WEBSTER, D. F. *The effect of ultrasound on wound healing*. PhD Thesis, University of London, 1980 apud KITCHEN, S. *Eletroterapia prática baseada em evidências*. 11. ed. Barueri: Manole, 2003.

WEITLAUF, H. M. Biology implantation In. KNOBIL, E. & NEILL, J. D. The physiology of reproduction. 2 ed. New York: Review Press, 1994. p. 391-440.

YOUNG, S. Ultra-som. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. Eletroterapia prática baseada em evidências. 11 ed. Barueri: Manole, 2003. p. 211-229.

YOUNG, S.; DYSON, M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. Ultrasonics, v. 28, p. 175-80, 1989.

ZISKIN, C. M.; McDJARMID, T.; MICHLOVITZ, S. L. Therapeutic Ultrasound. In: MICHLOVITZ, S. L. Thermal Agents in Rehabilitation. 3 ed. Philadelphia: F. A. Davis company, 1999. p. 169-207.