

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

VIVIANI DE MARQUE CARRER

**APLICAÇÃO DA TERAPIA ULTRASSÔNICA NO MODO CONTÍNUO NO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO POR PRIMEIRA INTENÇÃO EM PELE DE
RATOS**

CURITIBA

2009

VIVIANI DE MARQUE CARRER

**APLICAÇÃO DA TERAPIA ULTRASSÔNICA NO MODO CONTÍNUO NO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO POR PRIMEIRA INTENÇÃO EM PELE DE
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde.

Orientação: Prof. Dr. João Antonio Palma Setti

CURITIBA

2009

VIVIANI DE MARQUE CARRER

**APLICAÇÃO DA TERAPIA ULTRASSÔNICA NO MODO CONTÍNUO NO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO POR PRIMEIRA INTENÇÃO EM PELE DE
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Prof.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Prof.
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, ____ de _____ de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa a Deus, quem me proporcionou tudo.

“...Não desistas, não pare de crer, os sonhos de Deus jamais vão morrer...”

Ludimila Fender

AGRADECIMENTOS

À família a qual administrou da melhor maneira minha ausência.

Aos meus filhos, Mariah e João Régis, pelos sorrisos, beijos e abraços os quais me fortaleciam e instigavam a ânsia de vencer.

Ao marido, obrigada por toda colaboração, paciência e amor.

Aos meus pais, obrigada por acreditarem em mim, sempre.

Ao amigo e Prof. Dr. Herculano Salviano da Universidade Federal do Paraná o qual me recebeu de braços abertos, colaborando com seu extremo conhecimento.

À Eliane Regina Nascimento Mendes, técnica do Laboratório de Histotecnologia da Universidade Federal do Paraná.

À Prof. Dra. Thelma Alvim Veiga Ludwig do Laboratório de Ficologia, departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, a qual gentilmente, permitiu o uso do seu laboratório para as fotomicrografias.

Ao Professor Dr. Walder Rodriguez de Melo, o qual compartilhou conhecimentos e sabiamente mostrou o caminho.

À Professora Dra. Djanira A. da Luz Veronez, com sua paciência e sapiência, obrigada por tudo.

Ao Professor e orientador Dr. João Antonio Palma Setti por sua colaboração e palavras de conforto.

Ao colega e amigo Jaques, o qual executou o procedimento cirúrgico e não só isso, compartilhou conhecimentos.

À colega e Professora Maristela Palma, hoje amiga, muito obrigada.

À Professora Dra. Márcia Olandowski a qual contribuiu com a análise estatística.

À todos que contribuíram diretamente ou não para a realização desta pesquisa.

RESUMO

O ultrassom terapêutico é um dos principais equipamentos utilizados na fisioterapia para estimular a cicatrização por ser um recurso de fácil acesso, viabilidade econômica e pelos seus efeitos térmicos e mecânicos. O objetivo dessa pesquisa experimental foi analisar os efeitos provocados pela onda ultrassônica no modo contínuo na reparação cutânea por primeira intenção em ratos. Foram utilizados 90 ratos Wistar, adulto-jovens, com massa corporal média 230g, divididos em 3 grupos de 30: controle (tratado com ultrassom desligado), grupo 1 (tratado com ultrassom 0,5W/cm²) e grupo 2 (tratado com ultrassom 2,0W/cm²). Estes foram subdivididos em 3 grupos de acordo com as fases de cicatrização e número de sessões terapêuticas consecutivas (3, 7 e 21 dias). A terapia ultrassônica teve início após 24 horas do término do ato cirúrgico, em região dorsal, aplicando a frequência de 3MHz, nas intensidades 0,0W/cm², 0,5W/cm² e 2,0W/cm², no tempo de 5 minutos sob a técnica de deslizamento. Os animais foram sacrificados de acordo com as fases 3, 7 e 21 dias e submetidos à análise histológica. Os resultados dos colágenos obtidos pelas análises estatísticas quantitativa e qualitativa, além da morfologia, nos levaram a concluir que o ultrassom promoveu um melhor estímulo da área em regeneração no grupo 1 quando aplicado até 7 dias. O grupo 2 não foi terapêutico.

Palavras-chave: Ultrassom. Contínuo. Cicatrização.

ABSTRACT

The therapeutic ultrasound is one of main resources used in physical therapy to stimulate healing by its easy access and their mechanical and thermal effects. This experimental research examined the effects caused by the ultrasonic wave in continuous repair the skin by first intention in rats. We used 90 Wistar rats, adult-young, with meaning body weight 230g, were divided into 3 groups of 30: Control (treated with ultrasound off), Group 1 (treated with ultrasound 0.5W/cm²) and group 2 (treated with ultrasound 2.0W/cm²). These were divided into 3 groups according to the stages of healing and number of consecutive therapeutic sessions (3, 7 and 21 days). The ultrasound treatment began 24 hours after the and of surgery in the dorsal region, applying the frequency of 3MHz, the intensity 0.0W/cm², 0.5W/cm² and 2.0W/cm², for 5 minutes under the technique of sliding. The animals were sacrificed according to the phases 3, 7 and 21 days and subjected to histological analysis. The results of collagen obtained by quantitative and qualitative statistical analysis, in addition to morphology, led us to conclude that the ultrasound promoted a better stimulus for regeneration in the area in group 1 when applied up to 7 days. Group 2 was not therapeutic.

Keywords: Ultrasound. Continuous. Wound healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema das principais células do tecido conjuntivo	22
Figura 2 – Colágeno Tipo I e Colágeno Tipo III	25
Figura 3 – Cicatrização em ferida por primeira intenção	27
Figura 4 – Procedimento cirúrgico	51
Figura 5 – Aplicação dos protocolos	53
Figura 6 – Fotomicrografia do animal do grupo controle, intensidade 0,0W/cm ² , 3 dias de terapia ultrasônica de 3MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Estrato córneo espesso; B. Tecido de granulação em formação e alinhado; C. Anexos dérmicos organizados	56
Figura 7 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 0,5W/cm ² de intensidade, 3 dias de terapia ultrasônica. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Estrato córneo espesso; B. Tecido de granulação em formação e alinhado; C. Presença regular dos anexos da derme	57
Figura 8 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 2,0W/cm ² de intensidade, num período de 3 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Espessamento do estrato córneo; B. Presença de tecido de granulação; C. Tecido necrótico	58
Figura 9 – Fotomicrografia do animal do grupo controle, tratado com ultrassom 3MHz, 0,0W/cm ² de intensidade, durante 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Epiderme espessa; B. Concentração de tecido de granulação; C. Alinhamento do tecido de granulação	59
Figura 10 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 0,5W/cm ² de intensidade, durante 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Delgado estrato córneo; B. Concentração distal de tecido de granulação; C. Alinhamento de tecido de concentração	60

Figura 11 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 2,0W/cm² de intensidade, por um período de 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Ampla área de estrato córneo espesso; B. Concentração distal de tecido de granulação; C. Dispersão do tecido de granulação na derme

Figura 12 – Fotomicrografia de animal do grupo controle, tratado com ultrassom 3MHz, desligado, por um período de 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. A seta demonstra área de reparação tecidual

Figura 13 – Fotomicrografia do animal tratado do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 0,5W/cm² de intensidade, em 21 sessões consecutivas. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A seta indica área de reparação tecidual

Figura 14 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 2,0W/cm² de intensidade, por um período de 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Espessamento do estrato córneo; B. Ausência de papilas dérmicas; C. Ausência de anexos da derme; D. Intenso tecido de granulação; E. Tecido necrótico

Figura 15 – Fotomicrografia do animal do grupo controle tratado com ultrassom de 3MHz, intensidade 0,0W/cm², por 3 dias. Vista panorâmica, aumento 40x, coloração picrosírius, microscopia de polarização. Nota: A seta indica a incisão por primeira intenção com ausência dos colágenos tipos I e III no local da cicatriz

Figura 16 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 0,5W/cm² de intensidade, por um período de 3 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento de 40x, microscopia de polarização, coloração picrosírius. Nota: a seta indica área de incisão, com afastamento das bordas e sem presença de colágenos tipos I e III na cicatriz

Figura 17 – Fotomicrografia do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 2,0W/cm² de intensidade, modo contínuo, durante 3 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento 40x, microscopia de polarização, coloração sirius red. Nota: a seta indica crosta e local da incisão

Figura 18 – Fotomicrografia do animal do grupo controle, tratado com ultrassom de 3MHz, 0,0W/cm ² de intensidade, modo contínuo, por 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento 40x, microscopia de polarização, coloração picrosirius. Nota: a seta indica área da cicatriz	66
Figura 19 – Fotomicrografia do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 0,5w/cm ² de intensidade, modo contínuo, durante 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento 40x, microscopia de polarização, coloração picrosirius. Nota: A seta indica a linha da incisão e reparação	66
Figura 20 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, com 2,0 W/cm ² de intensidade, modo contínuo, por um período de 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento de 40x, microscopia óptica polarizada, coloração sirius red. Nota: A seta indica região da cicatriz	67
Figura 21 – Fotomicrografia do animal do grupo controle, tratado com ultrassom de 3Mhz, 0,0W/cm ² de intensidade, por 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento 40x, microscopia óptica polarizada, coloração picrosirius. Nota: A: indica região de cicatriz; B: anexos da derme. C. Camada muscular	67
Figura 22 – Fotomicrografia do animal tratado com ultrassom 3MHz, 0,5W/cm ² de intensidade, modo contínuo, durante 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento de 40x, microscopia de polarização, coloração picrosirius. Nota: A. Incisão regenerada; B. Anexos da derme; C. Camada muscular	68
Figura 23 – Fotomicrografia do animal tratado com ultrassom 3MHz, intensidade 2,0W/cm ² , modo contínuo, durante 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento de 40x, microscopia de polarização, coloração picrosirius. Nota; A. Região periférica da cicatriz; B. Ausência de anexos da derme; C. Ausência de camada muscular; D. Intenso tecido de reparação	69
Gráfico 1 – Colágeno tipo I	73
Gráfico 2 – Colágeno tipo III	77
Quadro 1 – Profundidade de penetração de meio valor em mm para 1MHz(a). Profundidade de penetração de meio valor em mm para 3MHz(b)	41
Quadro 2 – Conteúdo de proteína e absorção do ultrassom em vários tecidos	42
Tabela 1 – Tabela 1 – Colágeno tipo I	70

Tabela 2 – Colágeno tipo I	72
Tabela 3 – Colágeno tipo III	74
Tabela 4 – Colágeno tipo III	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	–	Adenosina difosfato
MEC	–	Matriz extracelular
MHz	–	Mega hertz
MMPs	–	Metaloproteinases
PDGF	–	Fator de crescimento derivado de plaqueta
SATA	–	Spatial Avarage Temporal Avarage
SFA	–	Substância fundamental amorfa
TGF- α	–	Fator de crescimento alfa
TGF- β	–	Fator de crescimento beta
UST	–	Ultrassom terapêutico
UTFPR	–	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
VGEF	–	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

Z	– Impedância acústica
A	– Alfa
B	– Beta
P	– Rô densidade do material
C	– Velocidade do som
r	– Raio
a	– Coeficiente de atenuação
f	– Frequência
%	– Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 PELE E ANEXOS	17
2.1.1 Epiderme	18
2.1.2 Derme	19
2.1.3 Tecido Conjuntivo	19
2.1.3.1 Células do tecido conjuntivo.....	20
2.1.3.2 Matriz extracelular	23
2.1.3.3 Fibras: colágenas, elásticas e reticulares.....	23
2.1.3.4 Proteínas de adesão celular.....	25
2.2 LESÃO, INFLAMAÇÃO E REPARO DA PELE.....	26
2.2.1 Fase inflamatória.....	27
2.2.2 Fase proliferativa ou fase fibroblástica e de deposição da MEC	29
2.2.3 Retração da ferida	31
2.2.4 Fase de remodelagem.....	31
2.3 ULTRASSOM TERAPÊUTICO (UST)	33
2.3.1 Fundamentos físicos do ultrassom	34
2.3.1.1 Gerador do ultrassom terapêutico	35
2.3.1.2 Transdutor	35
2.3.1.3 Efeito piezoelétrico	36
2.3.1.4 Campo acústico.....	37
2.3.2 Aspectos biofísicos.....	38
2.3.2.1 Propagação, reflexão e impedância acústica	38
2.3.2.2 Refração, absorção e atenuação	39
2.3.2.3 Cavitação e efeito tixotrópico	42
2.3.2.4 Frequência e modo de emissão	43
2.3.2.5 Intensidade (dose ou densidade de potência).....	43
2.4 EFEITOS FISIOLÓGICOS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO	46
2.4.1 Efeito mecânico.....	46
2.4.2 Efeito térmico	46
2.4.3 Efeito químico.....	47
2.5 EFEITOS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NAS FASES DE REPARO	47
3 METODOLOGIA	50
3.1 MATERIAL	50
3.1.1 Grupos experimentais.....	50
3.2 MÉTODOS	50
3.2.1 Procedimento cirúrgico	51
3.2.2 Aplicação do ultrassom.....	52
3.2.3 Técnica histológica	54
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4 RESULTADOS.....	57
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA EOSINA (HE).....	57
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS COLÁGENOS TIPOS I E III.....	65

4.3 RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PROGRAMA IMAGE PROPLUS	71
4.3.1 Variável: colágeno tipo I	72
4.3.2 Variável: colágeno tipo III	76
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE	100

1 INTRODUÇÃO

Imediatamente após um ato cirúrgico ocorre aplicação de recursos antiinflamatórios e antiinfeciosos com propósitos preventivo e terapêutico. Na seqüência, espera-se normalidade no processo de regeneração no local da incisão cirúrgica.

A preocupação com os padrões de normalidade e qualidade da formação da cicatriz não ocorre apenas com pacientes provenientes de cirurgias plásticas, mas com todos submetidos a lesões cirúrgicas em geral. Este fato fundamenta-se em dois fatores: aquisição permanente de uma cicatriz indesejável em qualquer área do território corporal e presença de retração da cicatriz, responsável pela diminuição da amplitude de movimento ou até mesmo a perda da função local.

A cicatrização é um processo anatomofuncional complexo composto por diferentes etapas. A ocorrência de disfunção e alteração celular em uma delas compromete o processo normal de reparação resultando em problemas funcionais, morfológicos e estéticos no local da cicatriz.

O processo de reparação tecidual demanda substituição do tecido lesado por um novo tecido acompanhado por uma neovascularização. Ocorre regeneração tissular através da plasticidade das células lábeis capacitadas em neoproliferação celular, formação de tecido de granulação e reconstrução do tecido. O resultado final do processo depende do tipo de tecido lesado e da extensão da lesão.

Abbas et al. (2006) relataram que a formação deficiente de uma cicatriz com ausência de infecção ocorre em função de um depósito inadequado do tecido de granulação e acúmulo exagerado de colágeno, podendo levar à deiscência, ulceração da ferida e formação de quelóide.

A alta incidência na procura por tratamentos que impeçam a formação de cicatrizes hipertróficas e queloideanas, estimula o desenvolvimento de pesquisas com recursos que possam prevenir ou auxiliar a qualidade da cicatriz. A fisioterapia apresenta vários equipamentos facilitadores da cicatrização como laser, corrente de baixa frequência, alta frequência e o ultrassom terapêutico.

Low e Reed (2001) fazendo uso do ultrassom terapêutico relataram melhora na qualidade da cicatriz e diminuição do tecido fibroso. Da mesma forma, constataram que a velocidade de fechamento da ferida cicatricial e suas taxas de

contração também foram alteradas significativamente com o uso do ultrassom terapêutico.

De acordo com Starkey (2001) a aplicação da terapia ultrassônica acelera a fase inflamatória do processo de cicatrização tecidual. A atividade fagocitária dos macrófagos é influenciada positivamente pela aplicação do modo contínuo.

Borges (2006) descreveu que o uso do ultrassom terapêutico possui maior eficácia quando aplicado na fase inflamatória e início da fase proliferativa do reparo até 15 dias após a situação lesional.

Na fase inflamatória o ultrassom possui efeito estimulante sobre mastócitos, plaquetas, leucócitos, macrófagos (WATSON, 2008). Segundo Leung et al. (2004) Nussbaum (1997), Mortimer e Dyson (1988) a aplicação do ultrassom induz a degradação dos mastócitos. Esse resultado melhora a qualidade e mantém os padrões de normalidade dos eventos inflamatórios.

Harvey et al. (1975) analisaram o uso do ultrassom contínuo de 3MHz, nas intensidades $0,5W/cm^2$ e $2,0W/cm^2$ durante 4 dias. Constataram um aumento significativo da síntese protéica e alteração na membrana da célula, além da quantidade de fibroblasto, o qual resultou em maior síntese de colágeno.

Estendendo o uso da terapia ultrassônica em todas as fases do processo de reparação, Ng e Fung (2007) em estudo experimental com ratos, analisaram o ultrassom terapêutico no modo contínuo nas intensidades $0,5W/cm^2$, $1,2W/cm^2$, $2,0W/cm^2$ e controle em 22 sessões terapêuticas com tempo de aplicação de 1 minuto constataram que a alta intensidade utilizada num curto período de tempo de aplicação estimula a regeneração do colágeno independentemente da dose.

Entretanto, diversos autores relatam que a aplicação da terapia ultrassônica de baixa intensidade apresenta-se como o método mais indicado no processo de cicatrização (AMANCIO, 2003; ENWEKA et al., 1989; FAGANELLO, 2003; GAN et al., 1995; KITCHEN; BAZIN, 1996; OLSSON et al., 2006; BORGES, 2006; DYSON, 1990 apud GUIRRO; FERREIRA; GUIRRO, 1995; GUIRRO; GUIRRO, 2002). Apesar disso, é consenso entre os autores a necessidade de um maior número de análises no referente à terapia ultrassônica, bem como é defeso à necessidade do desenvolvimento de novos protocolos sobre frequência, modo de emissão de onda, intensidade e tempo de aplicação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos das intensidades $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ e $2,0\text{W}/\text{cm}^2$ do ultrassom terapêutico de 3MHz de frequência, em modo contínuo, no processo de cicatrização em pele de ratos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar histomorfologicamente a presença de tecido de granulação no local da lesão incisional dorsal por primeira intenção em pele de ratos em seus determinados tempos (fase inflamatória, proliferativa e remodelagem) após a aplicação do ultrassom terapêutico;
- Analisar qualitativamente os aspectos da epiderme e da derme no processo de regeneração tecidual promovido pelo protocolo estabelecido;
- Analisar quantitativamente os colágenos tipos I e III utilizando microscopia de polarização e programa Image-Pro Plus, Cybernetics®, versão 4.5.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE E ANEXOS

A pele que recobre a superfície corporal é constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica e outra mesodérmica, porção conjuntiva ou derme. Abaixo, situa-se a hipoderme, tecido celular subcutâneo, panículo adiposo. A pele e tela subcutânea, juntamente com seus anexos constituem o sistema tegumentar. As funções desse sistema são: proteção, regulação da temperatura, excreção, sensibilidade tátil, produção de vitamina D. Devido à camada queratinizada da epiderme, há proteção do organismo contra atrito e desidratação. As terminações nervosas sensitivas enviam mensagens ao S.N.C. Suas glândulas sudoríparas

participam da termorregulação e excreção de compostos. Atuam contra penetração de microrganismos. A melanina da epiderme tem função fotoprotetora contra raios solares.

2.1.1 Epiderme

Constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Suas células são: melanócitos, células de Langerhans, corpúsculo de Merkel e queratinócitos em maior quantidade. Está subdividida em cinco camadas descritas a seguir.

A camada germinativa ou basal é a mais profunda, sendo constituída por células prismáticas ou cubóides que fazem a junção com a derme ou tecido conjuntivo. A mesma é responsável pela constante renovação da epiderme onde as células são deslocadas à superfície até camada córnea em cerca de 21 a 30 dias.

A camada espinhosa é formada por células cubóides e achatadas, possuindo grande quantidade de tonofilamentos que mantêm a coesão das células da epiderme na resistência ao atrito. Na camada granulosa, o citoplasma apresenta grânulos de querato-hialina. Essa camada é formada por células que já estão em degeneração com grânulos de queratina ou de melanina atrofiados em seus citoplasmas.

A camada lúcida é constituída por uma delgada camada de células achatadas mais proeminentes em áreas de pele espessa. Quando visível, tem aspecto de linha clara, brilhante e homogênea.

A camada córnea é a mais superficial da epiderme. Apresenta várias células mortas e interligadas. Seu citoplasma é repleto de queratina. Protege o organismo de invasão do meio externo.

Dentre os anexos cutâneos estão os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas e sebáceas. No córtex do pêlo há presença de cistina gerando reações gram-positivas. Na região da raiz do pêlo há presença de melanócitos os quais transferem grânulos de melanina para os pêlos.

As glândulas sebáceas encontram-se associadas aos folículos pilosos, as glândulas holócrinas, com característica aoveolar variável.

2.1.2 Derme

A derme constituída por tecido conjuntivo apresenta-se como uma camada espessa apoiada na epiderme e hipoderme. Apresenta espessura variável, constituída por duas camadas: papilar, mais superficial e reticular, profunda.

A camada papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo e forma as papilas dérmicas. As papilas aumentam o contato da epiderme com a derme. Há fibrilas de colágeno que prendem a derme à epiderme e os vasos sangüíneos aí presentes nutrem e oxigenam a epiderme.

A camada reticular é mais espessa e constituída por conjuntivo denso. As duas camadas possuem fibras elásticas, vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e outras estruturas derivadas da epiderme como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas.

2.1.3 Tecido Conjuntivo

O tecido conjuntivo pode ser descrito como o tecido responsável pelo arcabouço do organismo, tanto nas partes moles como nas partes duras. Não é uniforme e compreende vários tipos e várias funções diferentes.

Esse tecido é o principal componente dos tecidos moles, conectando os outros componentes. Serve como reserva para hormônios que controlam o crescimento e a diferenciação celular.

A grande variedade de moléculas do tecido conjuntivo desempenha importantes papéis biológicos como reserva de fatores de crescimento que controlam a proliferação e diferenciação celular.

O tecido conjuntivo possui as funções de dar forma e sustentação a vários órgãos, defesa do organismo a agentes infecciosos, energia, transporte, armazenamento e reparo.

2.1.3.1 Células do tecido conjuntivo

As principais células do tecido conjuntivo são: fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas, linfócitos e leucócitos.

O número de fibroblastos é estimulado pela presença de produtos de decomposição protéica. São os fibroblastos que sintetizam colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas multiadesivas as quais farão parte da matriz extracelular. São as células mais comuns do conjuntivo, capazes de modular sua atividade metabólica. Quando as células estão em intensa atividade de síntese são denominadas de fibroblastos, já as células metabolicamente quiescentes são chamadas de fibrócitos. Durante o processo de cicatrização, tornam-se especialmente ativos. Os fibroblastos possuem citoplasma abundante, basófilos, rico em retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvido.

Os miofibroblastos são similares aos fibroblastos, possuem em suas estruturas fibras de actina e miosina e fazem a função contrátil no reparo para a retração e encolhimento do colágeno primário.

Os plasmócitos são células grandes e ovóides com citoplasma basófilos e retículo endoplasmático rugoso. Apresentam núcleos esféricos e lembram roda de carroça. São pouco numerosos no tecido conjuntivo normal, exceto nos locais sujeitos à penetração de bactérias e proteínas estranhas. São abundantes nas inflamações crônicas, aonde predominam plasmócitos, linfócitos e macrófagos. São células derivadas dos linfócitos B e responsáveis pela síntese de anticorpo. Também chamadas de linfócitos ativados.

Os leucócitos ou glóbulos brancos são constituintes do tecido conjuntivo provenientes do sangue por diapedese, migração através da parede dos capilares e vênulas. Os leucócitos são células especializadas em defesa contra agentes agressores com grande atuação no processo inflamatório. Num processo de quimiotaxia, no qual células são atraídas por moléculas específicas, há migração de várias células para a região da inflamação dentre elas, os leucócitos. Esses cruzam as paredes dos vasos por diapedese.

Os leucócitos estão classificados em dois grupos: granulócitos e agranulócitos. Os granulócitos possuem núcleos irregulares, são os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. São azurófilos, coram em cor púrpura. Já os agranulócitos apresentam seus núcleos mais regulares: monócitos e linfócitos.

Os neutrófilos ou polimorfonucleares apresentam núcleos ligados por 3 lóbulos por pontes de cromatina. Na sua forma jovem é chamado de bastonete. Os neutrófilos fazem parte da defesa do organismo, fagocitando, digerindo bactérias e fungos. O aumento da quantidade de neutrófilos indica uma infecção bacteriana. Também são chamados de micrófagos. Após lesão tecidual os neutrófilos, monócitos e eosinófilos migram do sangue para o tecido conjuntivo representando a inflamação aguda.

Os eosinófilos são menos numerosos do que os neutrófilos. Apresentam granulações ovóides e coram-se com eosina em vermelho-alaranjado; fagocitam e digerem complexos de antígenos com anticorpos presentes nas alergias e também aparecem em fases inflamatórias subagudas. Os basófilos liberam histamina e participam em reações alérgicas.

Os monócitos apresentam núcleo em forma de rim ou ferradura. No sangue passam por uma fase de maturação e ao penetrar no tecido conjuntivo são denominados de macrófagos. O monócito faz parte do sistema mononuclear fagocitário ou histiocitário.

Os linfócitos são responsáveis pela defesa imunológica do organismo. Essas células codificam moléculas estranhas e agentes infecciosos através das respostas humoral, (imunoglobulina) e citotóxica mediadas por células. São separados em dois tipos principais: linfócitos B e T.

Os macrófagos apresentam um núcleo oval ou em forma de rim. Derivam de células da medula óssea e se dividem produzindo os monócitos do sangue. Em forma fixa, são os histiócitos. Numa segunda etapa, essas células penetram no tecido conjuntivo cruzando paredes de vênulas e capilares, são amadurecidas e chamadas de macrófagos. Estão distribuídos em vários órgãos e constituem o sistema fagocitário mononuclear. No fígado recebem o nome de células de Kupffer, micróglia no S.N.C. e células de Langerhans na pele. Atuam no sistema de defesa, fagocitando restos celulares, elementos anormais da matriz, células neoplásicas e bactérias. Também processam antígenos, destroem eritrócitos velhos, participam do metabolismo de gordura e ferro. Os macrófagos secretam collagenases, contribuindo muito ao reparo dos tecidos e processo inflamatório. Estão localizados principalmente no tecido conjuntivo e órgãos linfóides.

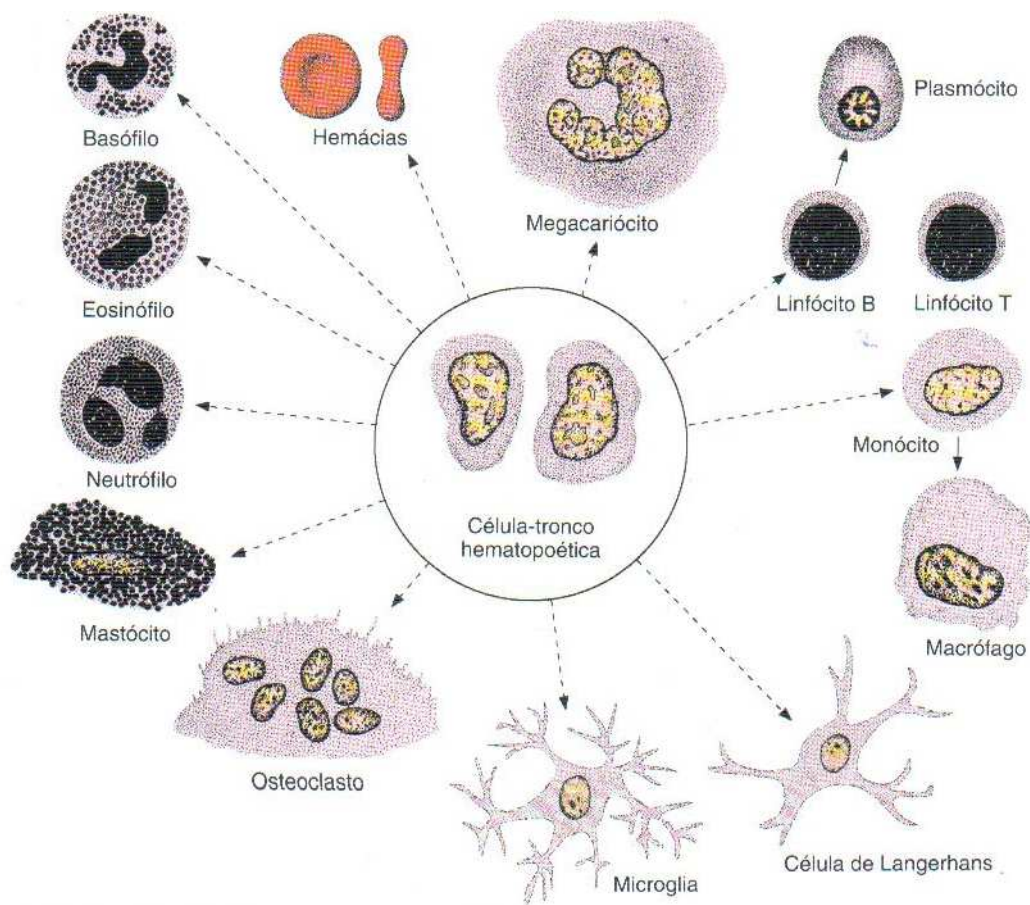


Figura 1 – Esquema das principais células do tecido conjuntivo

Fonte: Junqueira e Carneiro (2008, p. 92).

Os mastócitos possuem grânulos em seu citoplasma. Seus grânulos são eletrodensos e contêm mediadores químicos como histamina, heparina e glicosaminoglicanos. São abundantes principalmente no tecido conjuntivo de roedores. Existem pelo menos dois tipos de mastócitos, o do tecido conjuntivo, cujo grânulo contém uma substância anticoagulante, a heparina e o mastócito da mucosa, o qual apresenta grânulos condroitim sulfatados e estão presentes na mucosa intestinal e pulmões.

A liberação de mediadores químicos dos mastócitos promove reação alérgica denominada de reações de hipersensibilidade imediata e como exemplo prático o choque anafilático. A liberação de histamina liberada pelos grânulos dos mastócitos produz vasodilatação das arteríolas, aumenta a permeabilidade vascular e possibilita a passagem de proteínas do plasma para o interstício. Os mastócitos se localizam na periferia dos vasos e participam na maioria das reações inflamatórias. Os mastócitos da mucosa atuam em inflamações alérgicas.

2.1.3.2 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) influencia o crescimento e a função celular sendo constituída por compostos fibrosos como colágeno e glicoproteínas adesivadas envolvidas em um gel de proteoglicanos e ácido hialurônico. Essas macromoléculas estão agrupadas na matriz intersticial ou na membrana basal. Na interface entre o epitélio e tecido conjuntivo, a matriz forma a lâmina basal. Na maioria dos tecidos conjuntivos as macromoléculas da matriz são secretadas pelos fibroblastos. Nos tecidos especializados são chamados de condroblastos e osteoblastos. Duas principais classes de moléculas extracelulares produzem a matriz, as glicosaminoglicanas e as proteínas fibrosas tais como colágeno, elastina, fibronectina, laminina. Os componentes da matriz são degradados por enzimas proteolíticas extracelulares, as quais dependem da ligação do Ca e Zn. Essa matriz também serve como um meio nos quais os nutrientes e catabólitos são trocados entre células e sangue.

2.1.3.3 Fibras: colágenas, elásticas e reticulares

Quando as fibras se organizam em membranas ou tendões, formam o tecido fibroso; quando são espalhadas formam o tecido frouxo. As fibras do tecido conjuntivo são: colágenas, elásticas e reticulares.

A molécula de colágeno por si só é formada por 3 cadeias de polipeptídeos com uma seqüência de glicina X-Y (aminoácidos) que se entrelaçam. É uma proteína do tecido conjuntivo que promove força tênsil. Há mais de 27 tipos de colágeno os quais são fibrilares e mais abundantes os tipos I, II, III, V e XI. O colágeno tipo I é o maior componente de osso, pele, tendões e das cicatrizes maduras. O tipo II das cartilagens, e o tipo III no tecido embrionário, nos vasos sangüíneos, no útero e no trato intestinal. O colágeno tipo IV é o componente da matriz extracelular e é encontrado nas membranas basais. O tipo V é encontrado amplamente em vários tecidos, mas nunca como componente principal.

Os colágenos tipo IX e XII são chamados de colágenos associados às fibrilas, pois ligam as fibrilas umas as outras. Os tipos IV e VII são colágenos formadores de rede.

A família dos colágenos está envolvida na fase inflamatória, proliferativa e no remodelamento do reparo tecidual. O pró-colágeno é sintetizado de cadeias seguidas pela hidroxilação enzimática da prolina e lisina. Três cadeias de pró-colágenos alinham-se para formar a tripla hélice e o produto é secretado. No espaço extracelular há fragmentos C e N que são clivados e a lisina oxidase (dependente da vitamina C) oxida as lisinas e hidroxilisinas permitindo a estabilização das fibrilas e interligação das cadeias.

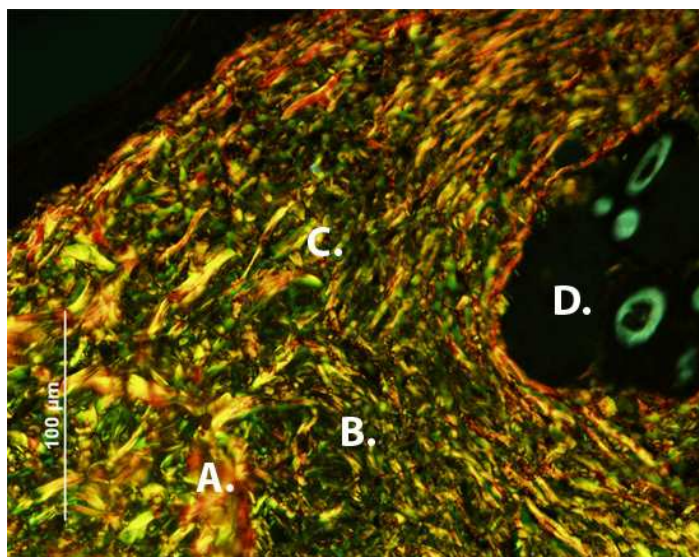


Figura 2 – Colágeno Tipo I e Colágeno Tipo III.

Fotomicrografia da incisão regenerada em 22 dias, do animal do grupo controle. Microscopia de Polarização, aumento 400x. Coloração Picrosírius. Nota: A. Colágeno Tipo I (amarelo, vermelho); B. Colágeno Tipo III (verde); C. Cicatriz regenerada; D. Anexos da derme.

As fibras reticulares são de predominantemente de colágeno tipo III associado a elevado teor de glicoproteínas e proteoglicanos. Possuem característica argirófila por terem afinidade aos sais de prata. Possuem polaridade positiva e no corante Sirius red coram-se em verde observadas à microscopia de polarização como mostra a figura 2.

A elastina confere à matriz extracelular a maleabilidade. As fibras elásticas contêm um núcleo central de elastina cercado por uma rede de fibrilina (glicoproteína). O sistema elástico é composto por três tipos de fibras: oxitalânica, elaunínica e elástica.

2.1.3.4 Proteínas de adesão celular

São as imunoglobulinas, caderinas, integrinas e selectinas. As caderinas e integrinas são proteínas transmembranas. Atuam como receptoras. As caderinas atuam com o cálcio fazendo inibição do contato celular e ligando-se a actina. As integrinas mediam a adesividade entre as células e a MEC e transmitem sinais ambientais para a célula, regulando sua proliferação, apoptose e diferenciação.

A fibronectina liga-se a muitas moléculas como colágeno. Seu mRNA produz a fibronectina tecidual formando as fibrilas nos locais da cicatrização das feridas; fibronectina plasmática que forma um coágulo sangüíneo provisório.

SPARC (osteonectina) é uma proteína ácida secretada e rica em cisteína, dentro das moléculas de adesão contribui para a remodelagem e inibe angiogênese. Osteopontina regula a calcificação e medeia a migração leucocitária. As Trombospondinas inibem a angiogênese.

Os proteoglicanos e ácido hialurônico têm uma proteína central na matriz extracelular ligada a um ou mais polissacarídeos (glicosaminoglicanos). São longos dissacarídeos. A hialuronan liga-se a uma grande quantidade de água, formando um gel hidratado viscoso (SFA). O ácido hialurônico ou hialuran é um glicosaminoglicano abundante em células mesenquimais. É o principal componente do tecido de granulação recente, aumenta logo após um traumatismo e em seguida diminui entre quinto e décimo dia. Já os glicosaminoglicanos sulfatados, sulfato 4 de condroitina e dermatan-sulfato aumentam entre quinto e sétimo dia.

2.2 LESÃO, INFLAMAÇÃO E REPARO DA PELE

Após lesão por primeira intenção, onde as bordas da ferida são encontradas aproximadas, dá-se início ao processo inflamatório. Nesta fase inicial, a epiderme contribui significativamente. Na seqüência, as epidermes das margens da lesão por primeira intenção tornam-se mais espessas e migra das margens profundas da lesão à parte superior (Figura 3). Em seguida, a epiderme une-se à derme superior, separando o tecido necrótico do epitélio e da derme necrótica, onde a cicatriz crostosa contém o coágulo sangüíneo seco, fragmentos de epiderme morta, fibras de colágeno e elastina. A atividade mitótica está restrita às células basais adjacentes das margens do ferimento (ANDERSON, 1982).

Com os ferimentos aproximados, uma camada contínua da epiderme se forma em 48h. No próximo dia ou mais, a nova epiderme pode invadir a fenda da derme formando um esporão para baixo (ANDERSON, 1982). A aparência da epiderme nova já é a similar da epiderme não lesada. Os esporões serão remodelados a partir da segunda semana.

“[...] Por volta do terceiro dia, a lesão dérmica contém fibroblastos e brotos capilares que migram das extremidades dos ferimentos”. No segundo dia já é percebida presença de reticulina. O colágeno novo aparece no quinto dia e na quarta semana os elementos celulares e vasculares estão diminuídos tanto em número quanto em concentração (ANDERSON, 1982).

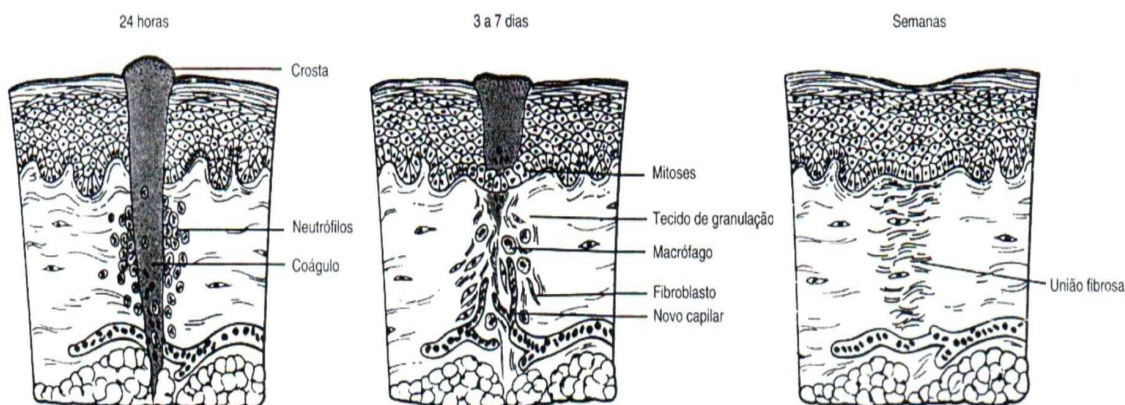


Figura 3 – Cicatrização por Primeira Intenção.

Fonte: Anderson (1982).

2.2.1 Fase inflamatória

A inflamação presente no processo de reparo tecidual é uma reação defensiva local, em geral, restrita à área sujeita a agressão mecânica e inflamação aguda. O processo inflamatório está intimamente ligado ao processo de reparo e à coagulação. A inflamação serve para destruir, diluir ou imobilizar o agente agressor, e com o tempo deflagrar uma série de acontecimentos que curam e reconstituem o tecido lesado.

Esse processo move tanto a regeneração da arquitetura tecidual quanto o retorno da função fisiológica ou tecido cicatricial. Borges (2006) relata que após 24 horas da lesão há início de proliferação dos fibroblastos e células endoteliais vasculares para formar o tecido de granulação. É o indicador da cicatrização. Esta possui aparência rósea, mole, granular na superfície das feridas. Há formação de pequenos novos vasos na matriz frouxa apresentando edema (angiogênese ou neovascularização).

Os sinais cardinais da inflamação são: rubor, tumor, calor, dor e alterações funcionais. O rubor se dá por uma hiperemia reativa e dilatação dos capilares. O tumor é o aumento do volume no local proveniente do edema. A dor, provocada pelos agentes físico-químicos da inflamação principalmente a bradicinina. A hiperemia promove um aumento no número de vasos e, conseqüentemente, aumento da temperatura local.

A angiogênese de vasos preexistentes ocorre conforme os estágios: óxido nítrico dilata os vasos preexistentes, o VEGF (fator de crescimento celular endotelial vascular) aumenta sua permeabilidade, há degradação da membrana basal, conseqüentemente o ativador do plasminogênio rompe o contato célula-célula. Com isso, as células endoteliais proliferam-se e migram em direção ao estímulo angiogênico. Ocorre então a maturação celular, inibição do crescimento e remodelação nos tubos capilares. Finalmente, há recrutamento das células endoteliais aonde os pericitos vão para pequenos capilares e células da musculatura lisa vascular vão para os grandes vasos. A migração direcionada das células endoteliais na angiogênese é controlada principalmente pelas integrinas, trombospondina, SPARC, proteases.

Após o rompimento dos vasos, a coagulação e seus componentes e agregação plaquetária formam um coágulo considerado como uma matriz provisória

para a migração celular. Na seqüência, a adesão das plaquetas ocorre pelas glicoproteínas presentes em suas membranas e estas apresentam sítios de ligação para fibrinogênio, fibronectina e trombospondina. As plaquetas secretam várias citocinas: fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fator transformador do crescimento alfa, o TGF- α e o fator transformador do crescimento beta, o TGF- β necessários à formação do novo tecido. Também libera substâncias vasoativas como serotonina, ADP, cálcio e tromboxane necessárias à constrição dos vasos sangüíneos e prevenção de hemorragia.

As plaquetas são fundamentais na cicatrização, formando um tampão. A participação da coagulação sangüínea na resposta inflamatória libera vários compostos dentre eles o fator de Hageman, anafilatoxinas C3a e C5a. Há um aumento na permeabilidade dos vasos, atração de neutrófilos e monócitos no local da lesão e estímulo de outros mediadores vasoativos como histamina, leucotrienos C4 e D4 e produtos derivados do oxigênio. As prostaciclina inibem a agregação plaquetária, a antitrombina III inibe a atividade da trombina, há lise do coágulo convertendo plasminogênio em plasmina.

Os neutrófilos e monócitos chegam ao tecido, atraídos pelos fatores quimiotáticos como fibrinopeptídeos da degradação da fibrina, C5a, leucotrienos, entre outros. Esses mesmos fatores estimulam a elastase e collagenase. Assim, os neutrófilos no sítio da lesão liberam enzimas e produtos tóxicos do oxigênio os quais destroem bactérias e alteram o tecido. Se não houver contaminação da ferida, em poucos dias cessa a infiltração de neutrófilos, ou serão fagocitados pelos macrófagos tissulares finalizando a inflamação.

As células envolvidas na inflamação podem ser agrupadas em: células presentes nos tecidos (endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos) e células que chegam a partir da corrente sangüínea (plaquetas e leucócitos). Os leucócitos são ativos e divididos em células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células mononucleares (monócitos e linfócitos).

Os mastócitos são células presentes no tecido lesado e secretam diversos mediadores químicos como a histamina, heparina, leucotrienos (RANG, 2001). A histamina liberada aumenta permeabilidade capilar, faz vasodilatação e facilita a passagem do fibrinogênio.

Os neutrófilos (PMN) fazem a fagocitose de microorganismos e são os primeiros leucócitos a aderir à lesão por quimiotaxia. Permanecem por um período

até 3 ou 5 dias (DIEGELMANN et al., 1981 apud MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Os PMN aparecem inicialmente na lesão e ocorre um aumento progressivo no número de Monócitos os quais saem dos vasos e se transformam em macrófagos. Os mediadores químicos produzidos pelos macrófagos intensificam a migração e ativação dos fibroblastos. Os macrófagos são considerados como as células mais importantes dessa fase, pois fagocitam bactérias, debridam corpos estranhos e direcionam o desenvolvimento do tecido de granulação, permanecem do 3º ao 10º dia.

Os linfócitos aparecem na ferida após a primeira semana. Suas linfocinas possuem influência sobre os macrófagos (PETROVA, 1992 apud MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

O edema inflamatório é influenciado pela ação da bradicinina sobre a histamina. Surge a dor. As prostaglandinas estão envolvidas no calor do processo inflamatório. São mediadoras da regulação térmica e ao estado febril nas reações inflamatórias.

2.2.2 Fase proliferativa ou fase fibroblástica e de deposição da MEC

Essa fase tem duração de 12 a 14 dias (HATANAKA; CURI, 2007) ou até 4 semanas (LOW; REED, 2001). Responsável pelo fechamento da lesão, subdividida em três fases: a reepitelização, fibroplasia e angiogênese (ADZICK, 1999; CLARK, 1985; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Na Reepitelização há migração de queratinócitos não lesados das margens da ferida os quais se proliferam, considerando os fatores de crescimento PPAR α e PPAR β , os responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio. O primeiro está mais envolvido na fase inicial da cicatrização e o segundo PPAR β no controle da proliferação dos queratinócitos desta fase (TAN et al., 2001 apud HATANAKA; CURI, 2007). Os queratinócitos têm seu citoesqueleto alterado para a produção de queratina. Seu plano de movimento está relacionado também ao conteúdo de água presente no leito da ferida onde feridas ressecadas reepitelizam mais lentamente (WINTER, 1962; HINMAN, 1963 apud MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Quando a reepitelização é estabelecida, forma-se uma nova

membrana basal, a partir das margens da ferida, fechando a nova epiderme sobre a matriz (LOW; REED, 2001).

Após o trauma tissular, os vasos se contraem imediatamente e as plaquetas se agregam e liberam seus grânulos. Os elementos tissulares são liberados, iniciando o processo de coagulação. Os mecanismos da coagulação transformam a protrombina em trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina, sendo sucessivamente polimerizada, transformando-se em coágulo estável.

À medida que se forma o trombo, consegue-se a hemostasia da ferida. Após uma vasoconstrição temporária surge uma dilatação secundária por ação das cininas. Há migração de leucócitos e proteínas plasmáticas para a ferida. Forma um tecido granular altamente vascularizado que preenche a ferida.

Devido ao aumento de fibrinogênio, fibronectina e proteínas plasmáticas, origina-se um estroma provisório para o crescimento de fibroblastos. A migração e proliferação dos fibroblastos são reguladas por TGF α , PDGF, VEGF, FGF, mediadores liberados pelos macrófagos e citocinas IL1 e TNF formadas no local da ferida.

A formação do tecido de granulação com origem no fibroblasto é a fibroplasia. O tecido de granulação é composto por macrófagos, fibroblastos, neomatriz, fibronectina, glicosaminoglicanas, colágeno e neovascularização (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a MEC começa a ser substituída por tecido conjuntivo mais forte e elástico (HATANAKA; CURI, 2007).

Na ferida, os fatores de crescimento produzem e depositam grandes quantidades de ácido hialurônico, fibronectina, colágenos tipo I, III e VI. Em seguida, os fibroblastos se ligam entre si e com a matriz extracelular tensionando em volta da ferida que se contrai. O novo tecido continua crescendo para dentro a partir das margens do tecido normal. Low e Reed (2001) relatam que forma-se rapidamente nova membrana basal entre os capilares endoteliais e o tecido de granulação neoformado, substituindo a matriz provisória. Sua eficiência depende da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, a angiogênese (HATANAKA; CURI, 2007). O tecido de granulação está suportado por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipo I. Apresenta edema e muitos espaços vazios devido à imaturidade dos vasos.

O VEGF-A é o principal regulador da angiogênese durante a cicatrização (HOWDIESHEL, 2001 apud HATANAKA; CURI, 2007). Breitbart et al. (2001) constataram que o aumento do VEGF nos fibroblastos acelera a cicatrização. A angiogênese é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatriz.

Ao final desta etapa o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação que lentamente é enriquecido com deposição de fibras colágenas promovendo uma massa fibrosa, a cicatriz (MONTESANO; ORCI, 1988).

2.2.3 Retração da ferida

É o movimento centrípeto das bordas da ferida. Uma ferida de espessura total retrai cerca de 20% em relação ao seu tamanho de origem (STEGMAN et al., 1982 apud MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Essa fase não é considerada por alguns autores. A velocidade da cicatrização depende da contração que tem início em poucos dias, após a lesão, e continua por um período de semanas (ANDERSON, 1982). Os responsáveis por esta contração são os miofibroblastos no tecido de granulação.

2.2.4 Fase de remodelagem

Com a evolução da cicatriz há um aumento dos elementos constitutivos extracelulares, principalmente colágeno, com uma diminuição do número de blastos ativos e vasos novos. O resultado final do tecido de granulação é uma cicatrização composta de fibroblastos de aspecto inativo e fusiforme, colágeno denso, fragmentos de tecido elástico e matriz extracelular. A substituição do tecido de granulação por uma cicatriz envolve modificações nos compostos da matriz extracelular.

Alguns fatores que estimulam o crescimento da síntese da matriz extracelular também estimulam a ativação das metaloproteinases MMPs da matriz, 20 enzimas que degradam seus compostos. São enzimas dependentes do íon zinco e inibidas rapidamente por inibidores teciduais TIMPs. Os efeitos das sínteses e degradação

resultam na remodelação dos locais lesionados, desbridamento. Colagenases intersticiais clivam o colágeno fibrilar dos tipos I, II e III. Gelatinases degradam o colágeno amorfo e fibronectina. Estromelisinases degradam proteoglicanos, colágenos amorfos, fibronectina e laminina.

Nessa fase há reorganização de colágeno e aumento da resistência da cicatriz. A remodelagem envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras colágenas (HATANAKA; CURI, 2007). A ordem da deposição está relacionada à fibronectina e são digeridas pela enzima colagenase.

Ao final desta etapa, a coloração da cicatriz apresenta-se pálida devido à diminuição de regeneração de melanócitos e ausência de neocapilares (CLARK, 1993; CLARK; HENSON, 1988). Tardamente, a cicatriz considera-se avascular podendo durar meses ou anos.

Nesta fase ocorre também, diminuição do número de fibroblastos e de macrófagos e aumento do conteúdo de colágeno, cujas fibras progressivamente se alinham na direção de maior tensão da ferida. O conteúdo fibroso da cicatriz relacionado à tensão que incide sobre suas bordas age como elemento estimulador. Em extensas feridas, a remodelação da matriz e a maturação da neoepiderme ocorrem nas bordas enquanto o tecido de granulação invade mais o espaço central da ferida diferindo qualitativa e quantitativamente a matriz extracelular central e periférica.

A composição e estrutura do tecido de granulação dependem do tempo decorrido da lesão desde a agressão, distância da margem da ferida, citocinas liberadas e microambiente da matriz.

As primeiras células que entram em apoptose são as endoteliais reduzindo o número de capilares, a seguir miofibroblastos e macrófagos. Dos compostos da matriz que desempenham funções importantes no reparo estão a fibronectina e o ácido hialurônico. A fibronectina auxilia a migração celular, na atividade dos miofibroblastos na contração da ferida e produção de colágeno. O ácido hialurônico favorece a penetração da matriz pelas células parenquimatosas (GALIT; RAF, 1996 apud KEDE; SABATOVICH, 2004). À medida que a matriz amadurece, a fibronectina e o ácido hialurônico desaparecem. Há aumento do tamanho dos feixes de colágeno e tensão da ferida. Os colágenos tipo I, III e V formam fibrilas tensas e os proteoglicanos são depositados aumentando a resistência da ferida (YAMADA; RAF, 1996 apud KEDE; SABATOVICH, 2004).

O coágulo de fibrina interage com as plaquetas através de receptores da membrana promovendo hemostasia através de regulação entre fatores de crescimento, proteases e inibidores de proteases (HAJJAR; DEORA, 2000). A fibrina da matriz combinada ou não com a fibronectina parece essencial para a expressão gênica da célula endotelial e do fibroblasto. Além disso, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais migram em direção ao coágulo de fibrina ocasionando sua lise. Xu e Raf (1996 apud KEDE; SABATOVICH, 2004). No tecido de reparo os fibroblastos produzem mais ácido hialurônico que na pele normal. Pela ação da hialuronidase tecidual, o ácido hialurônico diminui a partir do amadurecimento do tecido de granulação. Conseqüentemente, os fibroblastos depositam uma matriz de ácido hialurônico e fibronectina, permitindo assim a migração e proliferação celular. Posteriormente, uma matriz de colágeno e proteoglicanos aumentam a força tensora e elasticidade do tecido. Assim o processo continua até toda a área lesada ser remodelada.

2.3 ULTRASSOM TERAPÊUTICO (UST)

Na fisioterapia dermato-funcional, o ultrassom normalmente é utilizado em processos cicatriciais pós-cirurgia plástica, seguindo protocolos baseados nos relatos da literatura. Entretanto, alguns fatores devem ser observados como a qualidade da cicatriz da cirurgia, pois normalmente estão fechadas e permitem um bom acoplamento do cabeçote, permitindo uma aplicação direta sobre a cicatriz.

As intenções da utilização do ultrassom são de acelerar a cicatrização, alcançar força tênsil normal e até mesmo a prevenção de cicatrizes hipertróficas e quelóide. Embora Baker, Chandler e Levier (1981) tenham relatado que o entendimento dos efeitos fisiológicos das intervenções não justifique o uso do ultrassom terapêutico, supostas respostas fisiológicas do ultrassom são responsáveis pela difundida adoção desta forma de tratamento mesmo na ausência de estudos clínicos.

Segundo Low e Reed (2001) o uso clínico ainda está sob investigação devido ao grande número de resultados conflitantes. Apesar disso, estes mesmos autores indicam o uso do ultrassom terapêutico no modo contínuo com dose de baixa intensidade $0,1\text{W}/\text{cm}^2$. Embora estudos em animais sugiram a aceleração da

cicatrização, evidências tornam-se pessoais na prática clínica. Young e Dyson (1990) relataram que o uso do ultrassom proporciona significativo aumento no número de fibroblastos, alinhamento ideal para a retração da ferida e aceleração da fase inflamatória. Para a aceleração do processo de reparo tecidual da pele, Hoogland (1986) recomendou o uso do ultrassom no modo pulsado 20%, com frequência de 3MHz e intensidade abaixo de 0,5W/cm².

Borges (2006) relata a utilização do ultrassom até 15 dias após a situação lesional, pois teria maior eficácia sendo utilizado na fase inflamatória e início da fase proliferativa e reparo. A cavitação e a microcorrente acústica são capazes de acelerar o reparo tecidual através da alteração da permeabilidade da membrana celular para íons cálcio, que facilita o aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos, aumentando a resistência à tração da ferida.

Alguns achados da literatura relatam aumento da densidade e do arranjo do colágeno, onde o estresse mecânico promovido pelas ondas ultrassônicas modifica o arranjo do colágeno (MCKENZIE et al., 1993; NUSSBAUM, 1997). Desta forma ocorre melhora na síntese de colágeno, afetando a cicatrização em um curto período de tempo. Este fato contribui efetivamente para o tratamento de feridas recentes, sem infecção e sem comprometimento vascular.

Zhou et al. (2008) relataram que o uso do ultrassom de baixa intensidade acelera a fagocitose realizada pelos macrófagos em ratos e estimula os monócitos em humanos.

2.3.1 Fundamentos físicos do ultrassom

Soriano, Pérez e Baqués (2003) relatam serem as ondas sonoras produzidas pela vibração da matéria, e se propagam pelo movimento ondulatório a uma velocidade determinada a partir do gerador que as produz. Elas obedecem a um ritmo determinado chamado de frequência.

“O grau e o tom do som produzido é proporcional à frequência das vibrações por unidade de tempo (1s). Partindo desse princípio, pode-se concluir que os sons graves têm uma frequência menor e os agudos uma frequência maior” (SORIANO; PÉREZ; BAQUÉS, 2003).

Os limites da percepção do ouvido humano são individuais. Porém, estudos relatam os limites de 16Hz para sons graves e 16000Hz para sons agudos. Assim, pode-se definir os ultrassons como correspondendo às vibrações sonoras que apresentam uma frequência superior à 16000Hz embora a fins terapêuticos sejam utilizadas frequências entre 500000Hz a 3000000Hz ou 3MHz.

A frequência ideal para tratar tecidos superficiais como lesão em pele é de 3MHz (GOGIA, 2003). O ultrassom também pode ser usado para diagnosticar imagens com frequências mais altas que as utilizadas terapeuticamente, 20MHz, por exemplo. Esses equipamentos recebem as ondas refletidas e as processam.

2.3.1.1 Gerador do ultrassom terapêutico

O equipamento de ultrassom terapêutico consiste de um gerador elétrico de alta frequência conectado a um circuito oscilador e um transformador, através do cabo coaxial, a um transdutor contido em um tipo de aplicador isolado. O circuito oscilador produz um feixe de som em frequência específica, ajustada pelo fabricante de acordo com as necessidades de frequência do transdutor. Geralmente, um painel de controle do equipamento possui um cronômetro ajustável, um medidor de potência, um controle de intensidade, um interruptor de controle de ciclo, um seletor de modo contínuo ou pulsado (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004).

2.3.1.2 Transdutor

O transdutor, também chamado de fonte sonora ou aplicador, consiste de um cristal piezelétrico, como quartzo ou zircanato, titanato de chumbo, entre outros, de aproximadamente 2 mm a 3 mm de espessura. Esse cristal existente dentro do transdutor é o responsável pela converção de energia elétrica em energia acústica por meio da deformação mecânica do cristal (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004).

2.3.1.3 Efeito piezoelétrico

É um fenômeno natural encontrado em certos cristais minerais como germânio e quartzo podendo ser sintetizado. Este cristal é capaz de transformar energia mecânica em energia elétrica e vice-versa (BORGES, 2006). Quando o cristal é comprimido ou deformado por meio mecânico, uma pequena carga elétrica pode resultar no interior desse cristal. De modo inverso, uma carga elétrica imposta ao cristal, uma vibração de deformação mecânica da estrutura molecular do cristal pode ocorrer. Foi descoberto por Pierre e Jaques Curie em 1880. Há duas formas desse efeito: direto e indireto ou reverso.

Na forma direta, o efeito piezelétrico é a geração de uma tensão elétrica pelo cristal quando ele é comprimido ou expandido. No modo indireto, forma-se à medida que a corrente alternada se movimenta pelo cristal, produzindo compressão ou expansão. É esta mudança na polaridade que leva o cristal a se expandir e contrair e, assim, vibrar na frequência da oscilação elétrica criando um ultrassom na frequência desejada (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004; HOOGLAND, 1986).

Os efeitos piezelétricos no corpo humano são observados especialmente nos tecidos ósseos, fibras colágenas e proteínas corporais. É possível que estes efeitos influenciem os efeitos biológicos do ultrassom (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004).

Para aplicar as cargas elétricas no cristal, o mesmo é fixado através de uma de suas faces em uma superfície metálica no cabeçote do ultrassom. A face oposta fica no ar fazendo com que quase toda energia de vibração seja transmitida do cristal para a superfície metálica do cabeçote, daí para o meio de acoplamento e para os tecidos do corpo. Os cristais mais usuais são de titanato zirconato de chumbo (PZT), titanato de bário e níquel ferrito e cobalto devido ao menor preço, maior resistência à queda, maior estabilidade estrutural (LOW; REED, 2001).

O mecanismo de piezeletricidade está relacionado à proporção de colágeno. Supõe-se que a energia mecânica das ondas seja convertida em energia elétrica pelo tropocolágeno, criando um campo elétrico na superfície do osso fraturado o que estimularia a proliferação celular, Xavier e Duarte (1983 apud BASSOLI, 2001).

Silva (1987 apud CAMPANELLI, 2004) demonstrou teoricamente que a ação de um campo elétrico na membrana celular pode ser determinada pela aplicação de

um campo acústico supondo ser esse o efeito para todos os tecidos que contêm colágeno.

A radiação ultrassônica ou campo ultrassônico é gerado pela aplicação de um sinal elétrico com pulso de curta duração, ou salva de senóides, ou ondas retangulares, em um dispositivo transdutor com características piezoelétricas. Isto significa converter a energia elétrica em mecânica (vibrações) e vice-versa (WEBSTER, 1992; WELLS, 1977 apud COSTA, 2002). As ondas geradas pelo transdutor propagam-se para o interior do corpo e interagem com diferentes tecidos resultando em ondas ou ecos que são espalhados e propagam-se em todas as direções.

2.3.1.4 Campo acústico

Na propagação da onda produzida pelo transdutor, há formação de um campo, onde as ondas mais próximas ao transdutor são irregulares chamadas de zona de Fresnel. No campo mais distante do transdutor, as ondas são mais regulares, pois o comprimento diferente de onda torna-se insignificante quando à distância aumenta Zona de Fraunhofer (HAYMAN; WEIGHT, 1979 apud COSTA, 2002; LOW; REED, 2001). Portanto, a zona de Fresnel dependerá diretamente do quadrado do raio da face do transdutor e inversamente ao comprimento de onda.

$$\text{Zona de Fresnel} = r^2/\lambda.$$

Terapeuticamente o campo próximo é utilizado na aplicação do ultrassom, irregularmente. Há mais energia na média do centro do feixe, a média espacial do feixe ou pico espacial de intensidade. Se a saída for pulsada, a intensidade no tempo varia de modo que pode ser expressa como uma média temporal ou pico temporal. Nesse caso a intensidade pode ser descrita em quatro modos: média espacial, média temporal (SATA – *spatial average temporal average*), pico espacial, média temporal (SPTA – *spatial peak temporal average*), pico espacial, pico temporal (SPTP – *spatial peak temporal peak*) ou média espacial, pico temporal (SATP – *spatial average temporal peak*) (LOW; REED, 2001).

A área de radiação efetiva (ERA) é a porção da superfície do transdutor que realmente produz a onda sonora. Depende da área da superfície do cristal e em condições ideais está combinada ao diâmetro da placa frontal do transdutor (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004).

A ERA (*Efetive Radiation Área*) é determinada por meio do mapeamento do transdutor a uma distância de 5 mm da superfície de radiação. O tamanho ideal da área de aplicação do ultra-som terapêutico é de 2 a 3 vezes o tamanho da ERA do cristal (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004).

2.3.2 Aspectos biofísicos

2.3.2.1 Propagação, reflexão e impedância acústica

As ondas sonoras necessitam de um meio para se propagarem podendo ser líquido, sólido e gasoso (TIPLER, 1991; PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004; BORGES, 2006). A velocidade de propagação de onda ultra-sônica é maior onde há proximidade das moléculas, densidade de massa maior (HOOGLAND, 1986).

Nos tecidos, a velocidade de propagação varia de acordo com as características de absorção do meio e da reflexão da energia ultra-sônica (LEHMAN; LATEUR, 1994). O som se propaga mais rapidamente no tecido ósseo, músculo e gordura em ordem decrescente. A propagação da energia acústica depende da colisão molecular. As moléculas vibram em seu meio condutor e deslocam minimamente outras moléculas circunjacentes (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004).

Existem dois tipos de onda que se propagam em meio sólido: as Longitudinais e Transversas. As ondas Transversas se propagam somente em meio sólido e as Longitudinais em meios líquido e sólido. Em relação aos tecidos moles, sendo compostos principalmente de líquidos, o ultra-som se propaga primeiro de forma longitudinal, porém, quando chega ao osso se modifica em onda transversa. Na onda longitudinal o deslocamento ocorre na direção da propagação onde há regiões com alta densidade molecular (compressão), onde as moléculas são comprimidas

juntas e rarefação, de baixa densidade molecular onde as moléculas se espalham (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004; TIPLER, 1991).

A reflexão ocorre quando uma onda sonora emitida volta ao meio de origem. Isto é, o som choca-se em um anteparo e retorna (RODRIGUES, 1998). Se os meios possuírem a mesma impedância acústica, isso não ocorrerá. Então, quanto maior a diferença de impedância, maior a reflexão (HOOGLAND, 1986; LOW; REED, 2001; MACHADO, 2002).

Com o intuito de evitar esse fenômeno usa-se gel geralmente para maior contato do cabeçote com a pele. Casarotto et al. (2004 apud BORGES, 2006) relataram a água e o gel apresentarem menores coeficientes de reflexão e atenuação, maiores coeficientes de transmissão e impedância acústica próxima a da pele. Low e Reed (2001) relatam que a energia ultrassônica refletida pode causar aquecimento do cabeçote danificando o equipamento.

$$R = \frac{Z_2 \cos \theta_i - Z_1 \cos \theta_t}{Z_2 \cos \theta_i + Z_1 \cos \theta_t}$$

A impedância acústica é equivalente ao produto da densidade do meio pela velocidade de propagação do som (SORIANO et al., 2003; PRETINCE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004). Pode ser caracterizada pela resistência dos tecidos às passagens das ondas ultrassônicas (BORGES, 2006; HOOGLAND, 1986; LOW; REED, 2001). Quanto maior a impedância acústica maior será o aquecimento tecidual. Se a impedância acústica dos dois materiais for à mesma, todo o som é transmitido e não haverá reflexão. Quanto maior a diferença entre as impedâncias acústicas do meio, mais energia é refletida e menos penetra no segundo meio. $Z = \rho \cdot c$ onde Z é a impedância acústica (kgxm/lxs); ρ é a densidade do material (g/ml) e c é a velocidade do som no meio m/s (COSTA, 2002).

2.3.2.2 Refração, absorção e atenuação

A refração ocorre quando as interfaces da onda e do meio possuem impedâncias acústicas diferentes, desviando a direção da onda emitida. Se aplicar o ultra-som perpendicularmente ao local tratado, minimiza esse efeito (LOW; REED, 2001). A onda sonora produzida em um meio passa para outro meio onde a

velocidade e intensidade vão alterando, e a frequência não altera, modifica o comprimento de onda (RODRIGUES; GUIMARÃES, 1998).

A absorção está caracterizada por absorver parte da energia emitida pelo ultra-som, reduzindo a intensidade. Está inversamente relacionada à penetração (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004). Tecidos com maior número de água apresentam menor índice de absorção. As ondas são absorvidas pelos tecidos e transformadas em calor. As proteínas são as que mais absorvem a energia ultrasônica (YOUNG, 1998; LEHMANN; LATEUR, 1994).

O coeficiente de absorção de cada material indica o grau de conversão de energia no seu interior e está relacionado com a quantidade de colágeno e proteína (SORIANO; PÉREZ; BAQUÉS, 2003). Isto tende a gerar maior aquecimento no tecido (BORGES, 2006). A intensidade das ondas diminuirá na medida em que forem penetrando nos tecidos.

A frequência maior terá uma absorção mais superficial (3MHz) e a frequência menor terá uma absorção mais profunda (1MHz). Low e Reed (2001) utilizam dessa informação para justificar o uso do ultrassom de 1MHz com baixa intensidade produzir absorção similar em camada mais superficial comparado ao de 3MHz. Segundo Ter Haar (apud KITCHEN; BAZIN, 1996) representa de 60 a 80% da perda de energia do ultrassom.

No quadro abaixo (quadro 1), os autores comparam os resultados dos estudos de alguns pesquisadores do ultrassom terapêutico relacionando frequência e penetração da onda em milímetros em determinados tecidos humanos. Pode-se observar as divergências entre os resultados.

Tecido	Ter Haar (1978, 1996)	Hoogland (1986)	Ward (1986)	McDiarmid e Burns (1987)
a. Pele	40	11,1	—	—
Gordura	50	50	153	48
Músculo	10-20	9	28	9
Tendão	—	6,2	—	—
...Cartilagem	—	6	—	—
Osso	15	2,1	0,4	—
b. Pele	25	4	—	—
Gordura	16	16,5	26,4	16
Músculo	30-60	3	7,7	3
....Tendão	—	2	—	—
....Cartilagem	—	2	—	—
....Osso	5	—	0,04	—

Quadro 1 – Profundidade de penetração de meio valor em mm para 1MHz(a). Profundidade de penetração de meio valor em mm para 3MHz(b).

Fonte: Low e Reed (2001).

Atenuação é a redução da intensidade da energia conforme a onda vai penetrando nos tecidos. Deve-se à dispersão ou disseminação da onda. O Ultrassom penetra pelos tecidos ricos em água e é absorvido em tecidos mais densos nos quais terá maior aquecimento (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004).

Hoogland (1986) postulou um quadro (quadro 2) onde cada tecido teria atenuação diferente do feixe ultra-sônico. É um parâmetro importante, pois trata do decaimento exponencial da amplitude de uma onda acústica que se propaga através de um material. Dá-se por $\alpha = afb$ onde a é o coeficiente de atenuação para 1MHz e b é o parâmetro correspondente à dependência de atenuação com a frequência.

Sangue	Menor conteúdo de proteína	Menor absorção do U.S
Gordura	↓	↓
Nervo		
Músculo		
Pele		
Tendão		
Cartilagem		
Osso	Maior quantidade de proteína	Maior absorção do U.S

Quadro 2 – Conteúdo de proteína e absorção do ultrassom em vários tecidos

Fonte: Borges (2006).

2.3.2.3 Cavitação e efeito tixotrópico

A cavitação é uma oscilação de maneira unidirecional das células após a emissão das ondas ultrassônicas gerando bolhas de ar e gás e estão relacionadas à intensidade da emissão (LOW; REED, 2001; STARKEI, 2001; GUIRRO; GUIRRO, 2002; SHUNG; SMITH; TSUI, 1992).

A cavitação é um termo usado para descrever as atividades das microbolhas em um meio líquido quando estimuladas acusticamente (FRIZZEL; DUNN, 1984 apud CAMPANELLI, 2004). É apresentada sob duas formas, a cavitação estável e instável ou transiente.

A cavitação estável é quando as bolhas permanecem intactas mesmo oscilando em volume e motilidade. Age como um sinal celular atuando na permeabilidade da membrana.

Na cavitação instável ou transiente, há um aumento de volume e agitação bruscos implodindo a bolha podendo lesionar o tecido de forma irreversível (BORGES, 2006; GOGIA, 2003). Ao entrarem em colapso liberam grande quantidade de energia (WELLS, 1977). O colapso das microbolhas gasosas libera energia a qual rompe as ligações moleculares no local além de decomposição térmica da água, produzindo radicais livres H^+ e OH^- , altamente reativos. Com isso, causam alterações químicas indesejáveis na área de radiação (LEITE, 1989 apud CAMPANELLI, 2004). Os danos provocados podem ser evitados movimentando o cabeçote circularmente (LOW; REED, 2001; KITCHEN; BAZIN, 1996).

Esse fenômeno pode ser observado ao colocar um pouco de água no cabeçote e aumentar a intensidade, observando a agitação (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Efeito Tixotrópico é a propriedade que apresentam certos líquidos cuja viscosidade diminui quando são agitados mecanicamente, colóides gel em sol, (GUIRRO; GUIRRO, 2002; MACHADO, 1991).

2.3.2.4 Frequência e modo de emissão

Quanto maior a frequência, menor a penetração da onda. As mais usuais são as frequências de 1MHz, com penetração de 12cm e 3MHz, com 5cm de penetração. Kitchen e Bazin, (1996) afirmam que os tecidos com alta quantidade de proteína absorvem mais energia rapidamente que os tecidos com elevado teor de gordura ou água. Geralmente, usa-se em lesão superficial frequência de 3MHz e lesão muscular mais profunda 1MHz. (PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2004; COSTA, 2002) relatam serem as frequências usadas na área médica para obtenção de imagem e caracterização dos tecidos está na faixa entre 300kHz a 20MHz e baixa intensidade, 10mW/cm² e 1W/cm². O Ultrassom de alta intensidade de 10W/cm² e 50W/cm² e frequência entre 20kHz a 50kHz geralmente é usado para raspagem, corte, emulsificação (HADJICOSTIS et al., 1984; HEKKENBERG et al., 1994 apud COSTA, 2002). Também é utilizado por dentistas na remoção de tártaro Williams (1987 apud LOW; REED, 2001).

O modo de emissão de onda pode ser contínuo ou pulsado. Durante a emissão contínua, predomina o chamado efeito térmico. No modo pulsado, o breve intervalo facilita a dispersão do calor, efeito térmico menor e mecânico maior (BORGES, 2006; GUIRRO; GUIRRO, 2002; LOW; REED, 2001).

2.3.2.5 Intensidade (dose ou densidade de potência)

A unidade de intensidade do ultrassom é W/cm². A intensidade liberada pelo IEC (International Electrotechnical Commission) é de no máximo 2W/cm² no modo

contínuo e $3\text{W}/\text{cm}^2$ no modo pulsado Soriano, Pérez e Baques (2003). Kitchen e Bazin (1996) em sua literatura relatam não utilizar intensidade acima de $1\text{W}/\text{cm}^2$ (SATA) para promover efeito significativo em tecidos lesionados.

A maioria de autores prefere utilizar a intensidade de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ (SATA) e inferiores para acelerar o processo de cicatrização em tecidos como pele, tendões e ossos (KITCHEN; BAZIN, 1996). Os mesmos autores ainda dizem haver controvérsias nos efeitos provocados pela utilização do ultrassom com intensidade acima de $1,5\text{W}/\text{cm}^2$ (SATA) em processo de reparo tissular. “Efeitos térmicos significativos podem ser obtidos usando intensidades entre 0,5 e $1\text{W}/\text{cm}^2$ (SATA). Deve-se fazer tratamentos abaixo de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ (SATA) para que sejam postos em ação mecanismos basicamente atérmicos.”

Dyson (1990 apud KITCHEN; BAZIN, 1996) relata que intensidades elevadas podem ser lesivas e a intensidade utilizada para problemas agudos seria abaixo de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ (SATA) e em lesões crônicas não deve exceder $1\text{W}/\text{cm}^2$ (SATA). Há controvérsia. Mackenzie et al. (1993) observaram os efeitos das intensidades na cicatrização de ferida incisional em porcos. Usaram ultrassom de 1MHz no modo contínuo com $1,5\text{W}/\text{cm}^2$, tempo de aplicação de 5 minutos e ultrassom de 1MHz pulsátil 20% com intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ no mesmo intervalo de tempo num período de 5 e 10 dias. Observou-se maior resistência nas incisões com ambas as doses concluindo poderem ser as intensidades altas ou baixas na facilitação do depósito de colágeno.

Enweka (1989) concluiu em estudos realizados em coelhos, houve um aumento significativo na velocidade da cicatrização tendínea após o uso do ultrassom terapêutico de 1MHz no modo contínuo, intensidade $1\text{W}/\text{cm}^2$ por 5 minutos durante 9 dias. Obtiveram resultados negativos quando a aplicação foi continuada por várias semanas. Então, houve um aumento da força tênsil e cicatrização nos primeiros dez dias. Em novo estudo, Enweka, Rodriguez e Mendosa (1990) realizado com coelhos, utilizaram a intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ no modo contínuo a 1MHz de frequência. A aplicação durou 9 dias como no estudo anterior e também obteve resultados positivos sugerindo não ser necessária alta intensidade para promover reparo tendíneo.

Amancio (2003) promoveu estudo em 20 coelhos tratados com ultrassom de 3MHz, $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, 5 minutos por 7 dias. Foi realizada contagem de células em proliferação dos vasos neoformados e a morfometria das áreas da epiderme e

derme. Como resultado, obteve um significativo aumento no número de célula em proliferação na epiderme e vasos neoformados na camada reticular da derme.

Olsson et al. (2006) avaliaram a aplicação comparativa entre o emprego do ultra-som pulsado e contínuo em celiotomia de ratos concluindo ter maior proporção volumétrica de células polimorfonucleares no modo pulsado.

Faganello (2003) comparou no seu estudo as intensidades de 0,2 e 0,4 W/cm², modo contínuo de 1MHz com tempo de aplicação de 1 minuto uma vez ao dia. Após análise morfológica observou-se a fagocitose das fibras lesadas foi mais eficiente nos animais com o ultra-som, independentemente da intensidade utilizada. Assim como o surgimento de fibroblastos e mioblastos, obtendo resposta mais rápida e favorecendo a regeneração muscular.

Quanto antes se aplicar à terapia ultrassônica melhoras significativas do processo inflamatório são relatadas. Durante a fase inflamatória do processo de cicatrização, macrófagos e mastócitos ocupam o local lesionado, e foi demonstrado que essas células respondem a aplicação do ultrassom (FYFE; CHAHL, 1985; YOUNG; DYSON, 1990 apud KITCHEN; BAZIN, 1996). Os autores sugerem a aplicação uma vez ao dia, diariamente durante a fase inflamatória em uma semana. O tratamento durante a próxima fase (proliferativa) poderá ser realizado três vezes na semana (MCDIARMID; BURNS, 1987 apud KITCHEN; BAZIN, 1996) citam que em lesões crônicas se faz uso alternado das sessões ou diariamente.

Gan et al. (1995) utilizaram dois protocolos de tratamentos com o ultrassom terapêutico em galinhas lesionadas em tendão flexor. No primeiro grupo foi realizada terapia do 7º ao 17º dias após lesão e o segundo grupo após 42 dias. O reparo foi mais efetivo no primeiro grupo onde a terapia iniciou-se com antecedência. Oackley (1978) sugere o tempo de 1 a 2 minutos por área 1,5 vezes a ERA do cabeçote do equipamento ultra-sônico. Não mais que 3 minutos por tempo de aplicação, baseados nessa informação existem equipamentos aonde o tempo já vem delimitado a cada 3 minutos. Hoogland (1986 apud KITCHEN; BAZIN, 1996) recomenda utilizar o equipamento corporal no tempo máximo de 15 minutos totais, porém essa teoria já está em desuso devido a grandes relatos científicos sem tempo máximo de aplicação corpórea total.

A velocidade em que a vibração sonora se propaga pelo meio condutor está diretamente relacionada à sua densidade. Materiais mais densos possuem maior velocidade de transmissão. Com frequência de 1MHz, o som se propaga pelos

tecidos moles a uma velocidade de 1540m/s enquanto que no osso 4000m/s. Considerando as características plasmáticas salinas e sistema eletrolítico dos tecidos a velocidade de onda dos tecidos moles é em torno de 1500m/s (LOW; REED, 2001). A velocidade de propagação de onda sonora em um determinado meio é a função de seu comprimento de onda: $c = \lambda \cdot f$. Onde c é a velocidade do som no meio em m/s, λ é o comprimento de onda em metro e f a frequência da onda sonora em Hz (COSTA, 2002).

2.4 EFEITOS FISIOLÓGICOS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO

2.4.1 Efeito mecânico

As ondas sonoras causam movimentos de pressão e descompressão, produzindo um efeito de micromassagem. Quanto maior a frequência, maior o efeito mecânico. Há um aumento da permeabilidade da membrana, acelerando a troca metabólica, desagregando complexos celulares e macromoléculas, estimulando a liberação de aderências separando às fibras colágenas (SORIANO; PÉREZ; BAQUÉS, 2003). Nesse efeito também aparece a cavitação, fenômeno descrito anteriormente observado a intensidades superiores à 1W/cm² (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

2.4.2 Efeito térmico

A vibração promove um aquecimento do tecido. Este melhora o metabolismo celular, a circulação sanguínea, o aumento da extensibilidade das estruturas de colágeno elevando a temperatura local em até 45°C, sem causar lesão. Dyson (1980 apud GUIRRO; GUIRRO, 2002) também relata não existirem dados científicos que justifiquem a utilização do ultrassom terapêutico com intensidades acima de 1W/cm², visto que intensidades mais elevadas podem ser lesivas. Após estudos, os autores concluíram não haver aumento da temperatura com intensidade de 1W/cm² nas frequências de 3MHz e 1MHz *in vitro*. A prevalência do efeito térmico sobre o

mecânico ocorre nas intensidades superiores a $1\text{W}/\text{cm}^2$, no modo contínuo, nas frequências 1MHz ou 3MHz.

Johns (2002) foi um dos observadores da relação entre absorção da onda ultrassônica e quantidade de proteína do tecido. Quanto maior a concentração de proteína, maior absorção da onda e maior calor no local.

O efeito térmico está relacionado aos fenômenos de atenuação e absorção, onde a atenuação está vinculada à dissipação da energia sonora ao atravessar um meio e a absorção, à converção da energia acústica em calor (HSIEH, 2005; FISHER; HILLER; RENNIE, 2003).

2.4.3 Efeito químico

Os efeitos térmicos e mecânicos promovem reações químicas como liberação de histamina, substâncias vasodilatadoras que promovem a analgesia, estimula regeneração tecidual, aumenta reabsorção de edema, aumenta atividade dos capilares, aumenta a reabsorção de metabólitos (SORIANO; PÉREZ; BAQUÉS, 2003).

2.5 EFEITOS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NAS FASES DE REPARO

Segundo Guirro e Guirro (2002) há um consenso entre autores de que o ultrassom pode acelerar a resposta inflamatória, promovendo a liberação de histamina, macrófagos e monócitos além de melhorar a síntese de fibroblastos e colágenos.

De acordo com Starkey (2001) o ultrassom acelera a fase Inflamatória do processo de cicatrização tissular. A atividade dos macrófagos é influenciada positivamente pela aplicação do modo contínuo.

Fyfe e Chahl (1982) demonstraram em experimento *in vivo* que o ultrassom estimula a liberação de grânulos pelos mastócitos sendo que esses grânulos contêm os agentes quimiotáticos, os quais atraem os leucócitos para a lesão.

Mendonça et al. (2006) após estudo realizado em cicatriz por segunda intenção em pele de ratos concluíram que o ultrassom estimulou a neoangiogênese em 3 dias, maior concentração e qualidade do colágeno e melhora na reepitelização em 7 dias, melhor apresentação do colágeno e maior presença de anexos cutâneos em 14 dias, quando comparados ao grupo não estimulado.

Após estudo realizado por McKenzie et al. (1993), foi observado que quando comparados, o ultrassom pulsado e contínuo nas intensidades $1,5\text{W}/\text{cm}^2$ e $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ durante 7 dias em 5 minutos de terapia, ambos melhoraram o reparo da incisão em porcos. Entretanto, para melhor deposição de colágeno é aconselhável a aplicação do ultrassom de a baixa intensidade.

Olsson et al. (2006) verificaram que o ultrassom pulsado obteve melhor resposta que o ultrassom contínuo na aceleração da cicatrização em feridas cirúrgicas por celiotomia, na frequência de 1MHz e $1,0\text{W}/\text{cm}^2$, por 5 minutos de radiação.

Em estudo experimental realizado por Faganello (2003), observou-se que o ultrassom contínuo de 1MHz e de baixa intensidade ($0,2\text{W}/\text{cm}^2$ e $0,4\text{W}/\text{cm}^2$), favoreceu a regeneração do músculo tibial anterior em ratos. Verificou ainda que a terapia ultrassônica estimulou a fagocitose do tecido necrótico, maior presença de fibroblastos e miofibroblastos no local da lesão, maior angiogênese, independente das intensidades.

Demir et al. (2004) estimularam os fibroblastos com a terapia ultrassônica e observaram aceleração da cicatrização na fase inflamatória. Oliveira et al. (2008) observaram em estudo experimental em culturas fibroblásticas que as baixas intensidades do ultrassom terapêutico, $0,2\text{W}/\text{cm}^2$ e $0,6\text{W}/\text{cm}^2$, durante 2 minutos, mantiveram a integridade celular e morfologia alongada na fase inflamatória.

Durante a fase proliferativa, o ultrassom terapêutico estimula os fibroblastos, células endoteliais e miofibroblastos (NUSSBAUM, 1997; MAXWELL, 1992).

O ultrassom terapêutico pode influenciar a fase de remodelagem, pois estimula a deposição do colágeno de forma orientada, aumentando a quantidade dos colágenos tipos I e III, conseqüentemente, maior resistência à tração (NUSSBAUM, 1998).

A aplicação do ultrassom terapêutico durante as fases do reparo não seria em função das alterações promovidas nesse período e sim, pelo aumento ou estímulo

dos eventos normais e, assim, aumentar a eficiência das fases do reparo (WATSON, 2006; TER HAAR, 1999).

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL

O experimento utilizou como amostragem 90 ratos machos Wistar, adultos jovens com idade de 100 dias e peso entre 220g a 270g. Os animais foram mantidos em gaiolas com as mesmas condições ambientais, ciclo claro/escuro de 12h, alimentares, recebendo água e ração *ad libidum*, durante 22 dias. O projeto seguiu orientação da Lei 6638 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

3.1.1 Grupos experimentais

Foram divididos 3 grupos de 30 ratos randomicamente, os quais foram denominados de acordo com as intensidades grupo controle= 0,0W/cm²; grupo 1= 0,5W/cm² e grupo 2= 2,0W/cm². Esses foram divididos em 3 subgrupos com 10 ratos de acordo com as fases de cicatrização: 1. fase inflamatória (3 dias); 2. fase proliferativa (7 dias); 3. fase de remodelagem (21 dias). Portanto, 30 ratos foram expostos à terapia ultrassônica com frequência 3MHz, no modo contínuo, intensidade de 0,5W/cm² em 3, 7 e 21 dias consecutivos com início da terapia ultrassônica após 24 horas da lesão. Os outros 30 ratos foram expostos à terapia ultrassônica de 3MHz, no modo contínuo e intensidade de 2,0W/cm². Utilizaram as mesmas fases de reparo como os grupos anteriores, 3 dias, 7 dias e 21 dias. O grupo controle realizou a terapia com o aparelho desligado, totalizando 30 amostras, 10 ratos para cada fase da cicatrização. O tempo de aplicação do equipamento ultrassônico foi de 5 minutos com deslizamento sobre a ferida. Total de amostra n=90.

3.2 MÉTODOS

A pesquisa do tipo experimental induzida, randomizada, simples cego, foi desenvolvida no Laboratório de Técnica Operatória e Cirúrgica Experimental e

Laboratório de Patologia Experimental no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, programa de pós-graduação em Tecnologia da Saúde (PPGTS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

Para a realização da terapia ultrassônica nas amostras foram utilizados: um equipamento modelo Sonacel dual, da empresa Bioset, Industria de Tecnologia Eletrônica Ltda, com frequência de modulação contínua até 96Hz disponibilizado pela Clínica de Fisioterapia da Instituição. Gel à base de água e carbopol da empresa KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda, para acoplamento cabeçote-pele.

A análise histomorfométrica foi realizada com auxílio do material disponibilizado pelo Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Biologia Celular e Laboratório de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2.1 Procedimento cirúrgico

No Laboratório da Técnica Cirúrgica Experimental, os animais foram anestesiados com a dissociação dos fármacos Cetamina (60mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) administrando-se 0,2ml para cada 100g de peso do animal, via intramuscular, no músculo semitendíneo, em região posterior da coxa. Em seguida, o animal foi posicionado em decúbito ventral fixando os membros inferiores e superiores em suportes de madeira para realização de tricotomia dorsal. A incisão de 4cm foi medida com paquímetro, obtendo exposição da pele e tela subcutânea, suturada com fio de nylon 2.0 simples. Utilizou-se PVPI como anti-séptico (WARREN; ERNEST; SENNA, 2005).

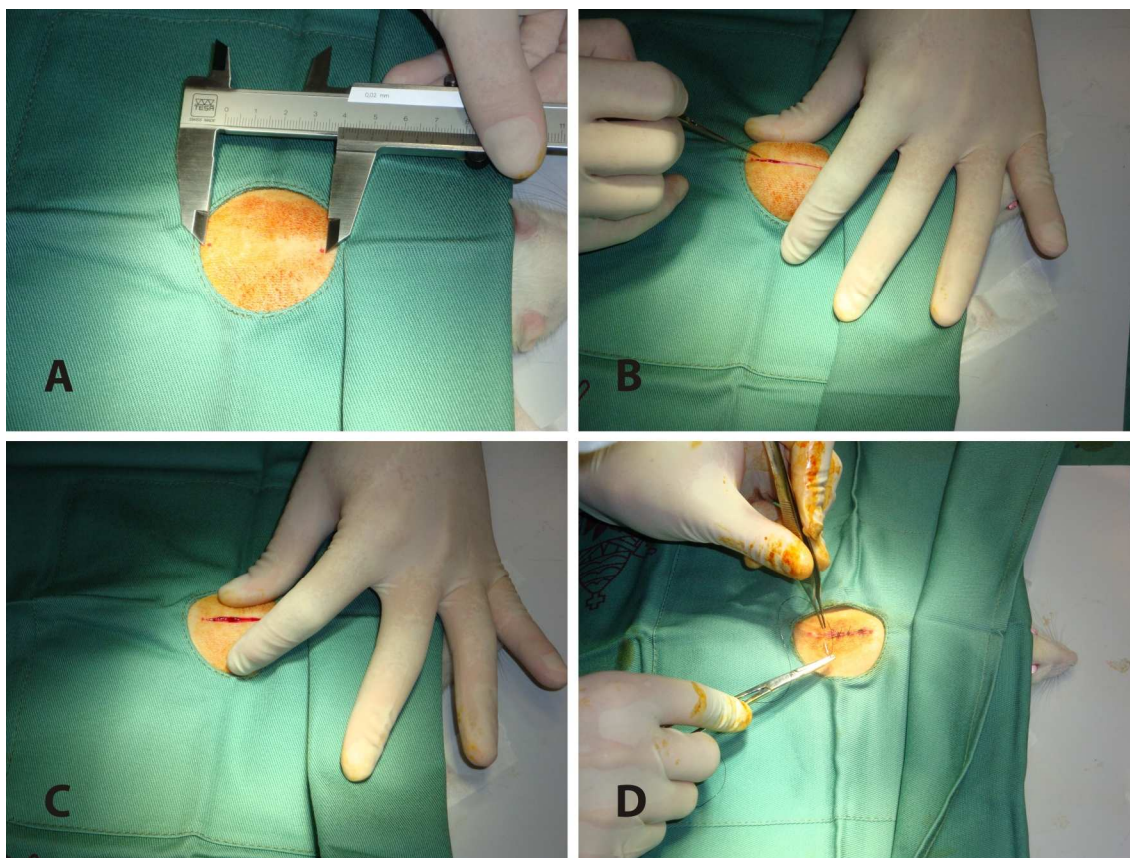


Figura 4 – Procedimento cirúrgico

Após o término do ato cirúrgico os animais receberam Cefalexina (Cefalexim) na concentração de 15mg/Kg, via subcutânea, uma vez ao dia durante 5 dias, com efeito antibiótico (BIRCHARD; SHERDING, 2004). O equipamento de ultrassom faz efeito analgésico (DRAPER; PRENTICE, 2002; HOOGLAND, 1986; LEHMANN; LATEUR, 1994) e antiinflamatório (MCDIARMID et al., 1996).

3.2.2 Aplicação do ultrassom

Antes do início do experimento o equipamento de ultrassom terapêutico (UST) foi aferido através de um dosímetro de precisão (*Ultra Sonic Power Meter®*, modelo UPM-DT-1) na UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) para certificar se a intensidade de saída do transdutor obteve um desvio máximo de 20%, sendo este o valor tolerável pela norma NBR 60601-2-5.

A estimulação foi num mesmo período do dia com os animais anestesiados com xilazina e cetamina nas proporções acima citadas, região posterior de coxa, permanecendo o tempo de tratamento de 5 minutos sob o efeito anestésico.

Foram colocados numa superfície plana e após a assepsia com álcool 70% da área tratada foi aplicado o hidrogel (gel de carbopol à base de água) para facilitar o acoplamento e deslizamento do transdutor.

A técnica de aplicação realizada foi a de deslizamento. Para a retirada do gel utilizou-se gaze esterilizada.

Após o terceiro, sétimo e vigésimo primeiro dias de tratamento, contendo 3 grupos com 10 ratos cada, totalizando 30 amostras para cada dia, os animais sofreram eutanásia por dose letal de tiopental sódico intra peritoneal (120mg/Kg). Esse é o método de eutanásia recomendado para roedores e outros pequenos mamíferos, contido na Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de junho de 2002.



Figura 5 – Aplicação dos protocolos.

3.2.3 Técnica histológica

Após a eutanásia, houve a retirada de um segmento do dorso no qual a cicatriz estava contida. Os segmentos destinados à histologia foram fixados em solução de formol a 10% durante 72h e álcool 70% até início de desidratação.

A cicatriz foi seccionada em partes de 5mm e 1cm para cada lado da incisão. Foram selecionados 4 cortes de cada amostragem provenientes de extremidades e centro da cicatriz. Após a inclusão em blocos de parafina, foram submetidos a cortes de 4 micrômetros, preparando-se as lâminas com 4 cortes em cada lâmina.

Os cortes histológicos foram corados por Hematoxilina Eosina (HE) para avaliar as estruturas básicas da célula como as inclusões e alterações no citoplasma, e pelo corante Picrosirius, utilizado para promover um aumento da birrefringência específica para a estrutura do colágeno I e III para análise de suas fibras no microscópio com polarização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja e vermelho e representam o colágeno tipo I, enquanto que as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringente, apresentam-se coradas em verde, representando o colágeno tipo III.

O microscópio utilizado foi da marca Olympus BX50 com câmeras de captura 3CCD pró-séries e o programa de captura de imagens foi o *Image-Pro Plus* versão 4.5 da Cybermetics®.

As imagens foram capturadas por uma câmera Olympus® DP71, enviadas a um monitor Sony Trinitron® colorido, congeladas e digitalizadas por uma placa digitadora Oculus TCX® (coreco), foram analisadas pelo aplicativo *ImageProPlus* 4.5 para Windows em computador Pentium III.

Para cada lâmina foi realizada leitura em três campos seguindo o trajeto da cicatriz, com ampliação de 400x, para a quantificação dos colágenos tipos I e III corados em Picrosirius com luz polarizada. No grupo tratado com ultrassom 3MHz e 2,0W/cm² foram quantificados os colágenos das bordas da cicatriz, pois houve necrose no centro da lesão impossibilitando qualquer análise qualitativa ou quantitativa no local propriamente dito.

Além disso, foram utilizadas leituras em objetiva de 40x e 400x para a qualificação da derme, epiderme, tecido de granulação e reparação.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as lâminas coradas por hematoxilinaeosina (HE) utilizamos análise qualitativa por descrição histológica da epiderme, derme e tela subcutânea.

Os resultados obtidos pela leitura dos colágenos tipos I e III com o programa *Image ProPlus* 4.5, foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões.

Para a comparação dos grupos e dos momentos de sacrifício usamos o modelo de análise de variância e o teste LSD para comparações múltiplas.

A variável colágeno III sofreu uma transformação logarítmica. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

3.4 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Núcleo de Bioética e Comitê de Ética no uso de Animais

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA EOSINA (HE)

As lâminas coradas com HE foram avaliadas qualitativamente com microscopia óptica utilizando aumentos de 40 e 400x. A descrição da lâmina verifica o espessamento da epiderme, anexos preservados, ausência ou presença de proliferação celular envolvidas no reparo e cicatrização propriamente dita.

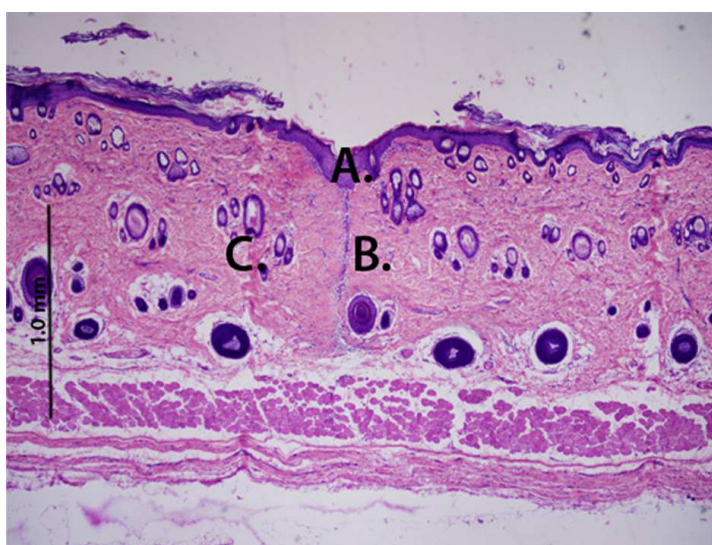


Figura 6 – Fotomicrografia do animal do grupo Controle, intensidade 0,0W/cm², 3 dias de terapia ultrassônica de 3MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração HematoxilinaEosina. Nota: A. Estrato córneo espesso; B. Tecido de granulação em formação e alinhado; C. Anexos dérmicos organizados.

Conforme demonstra a figura 6 foi possível observar um espessamento da epiderme com maior número de células em necrose. Identificamos um alinhamento do tecido de granulação na área da incisão. Ainda, observamos uma reorganização e presença dos anexos da derme, proximidade entre as bordas da lesão durante a fase de regeneração tecidual.

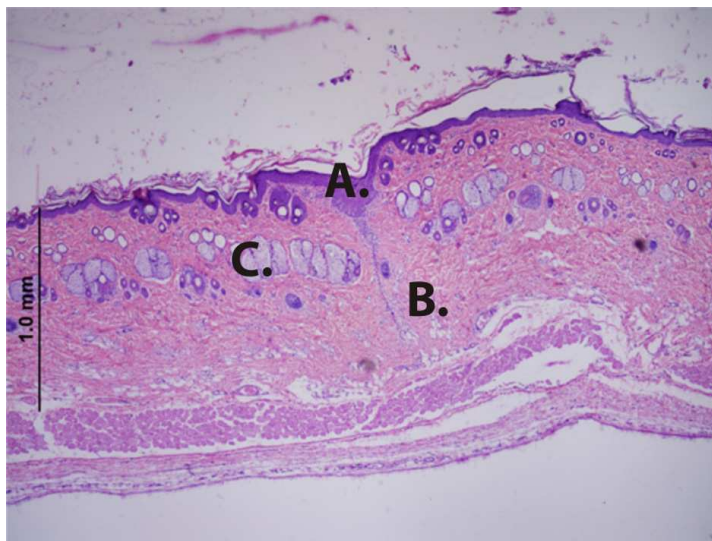


Figura 7 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 0,5W/cm² de intensidade, 3 dias de terapia ultrassônica. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Estrato córneo espesso; B. Tecido de granulação em formação e alinhado; C. Presença regular dos anexos da derme.

Em todos os animais do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 0,5W/cm² de intensidade, por 3 dias consecutivos, foi possível identificar um espessamento da epiderme com grande quantidade de células em necrose e descamação. O grupo apresentou maior concentração de tecido de granulação na região distal da incisão conforme a figura 7. Observamos também, alinhamento do tecido de granulação na região proximal da incisão. Identificamos a presença regular dos anexos da derme com distribuição normal próximo a área de reparação tecidual.

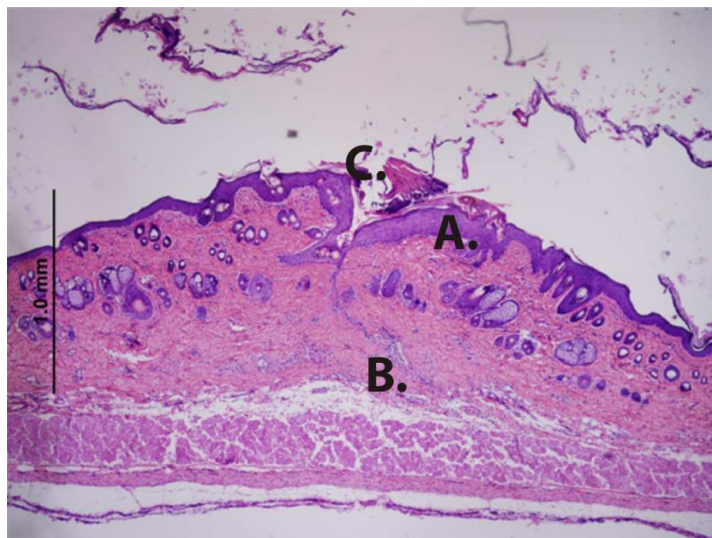


Figura 8 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 2,0W/cm² de intensidade, num período de 3 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Espessamento do estrato córneo; B. Presença de tecido de granulação; C. Tecido necrótico.

Conforme a figura 8 identificamos uma desorganização e espessamento da epiderme. Constatamos a formação de tecido de granulação nas bordas da incisão em todos os animais deste grupo. Identificamos também, alterações morfológicas dos anexos da derme. Em região proximal da incisão houve uma desorganização intensa da derme com desarranjo e desalinhamento de suas camadas mais profundas.

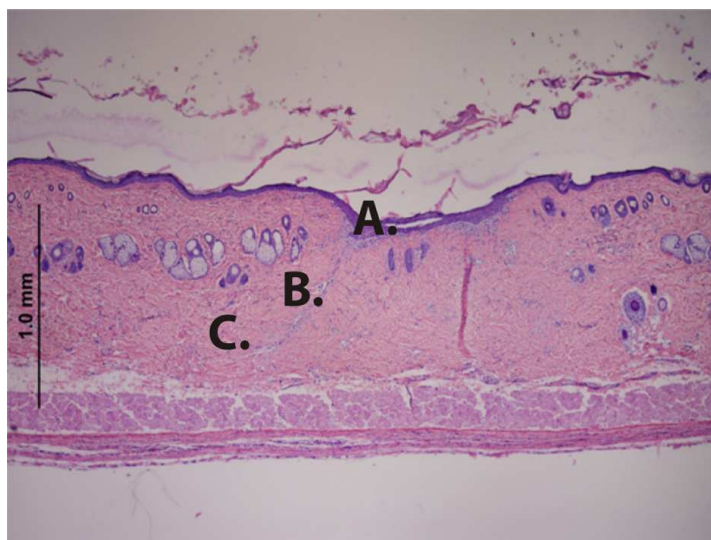


Figura 9 – Fotomicrografia do animal do grupo Controle, tratado com ultrassom 3MHz, 0,0W/cm² de intensidade, durante 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x.

Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Epiderme espessa; B. Concentração de tecido de granulação; C. Alinhamento do tecido de granulação.

Podemos observar em todos os animais do grupo controle, apresentação espessa do estrato córneo, grande concentração de tecido de granulação na região das papilas dérmicas. Houve presença de alinhamento do tecido de granulação ao longo da região de incisão na derme. Constatamos nesta fase, ausência dos anexos da derme próximos às bordas da incisão. Houve uma organização nas camadas mais profundas da derme (Figura 9).

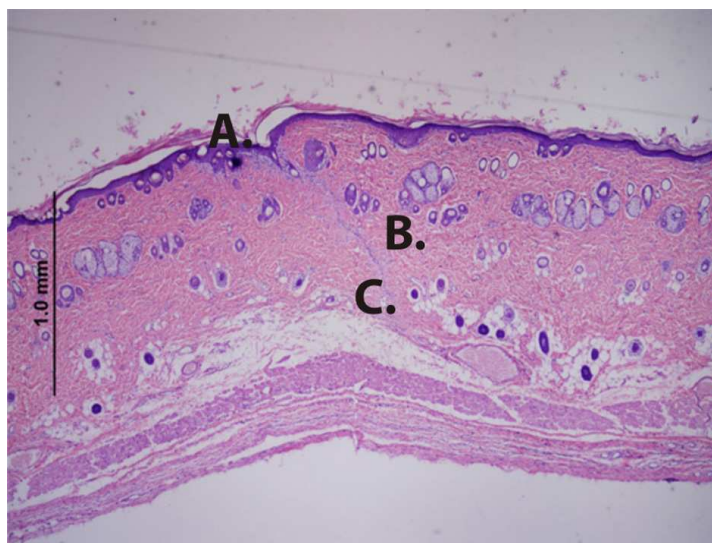


Figura 10 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 0,5W/cm² de intensidade, durante 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Delgado estrato córneo; B. Concentração distal de tecido de granulação; C. Alinhamento de tecido de concentração.

Conforme a figura 10 observamos a reparação da epiderme com ausência de solução de continuidade e apresentação delgada do estrato córneo. Constatamos alinhamento de tecido de granulação ao longo da região de incisão na derme. Identificamos também, a presença dos anexos da derme nas proximidades do local da regeneração tecidual.

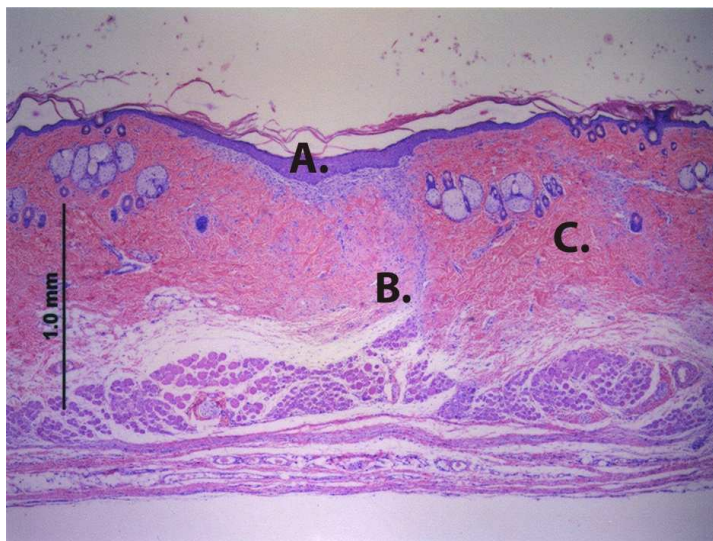


Figura 11 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 2,0W/cm² de intensidade, por um período de 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Ampla área de estrato córneo espesso; B. Concentração distal de tecido de granulação; C. Dispersão do tecido de granulação na derme.

Em todos os animais do grupo estudado (Figura 11), podemos constatar uma grande área de espessamento da epiderme, bilateralmente ao local da incisão cirúrgica. Observamos ausência de papilas dérmicas ao longo da camada epidérmica no local da lesão. Frequentemente, identificamos neste local a concentração de tecido de granulação disperso entre as camadas da derme e epiderme. No local da incisão cirúrgica houve presença de tecido de granulação e sua dispersão em todas as camadas da derme. Observamos neste local, ampla área com ausência de anexos da derme além de desorganização da derme com comprometimento da hipoderme e camada muscular.

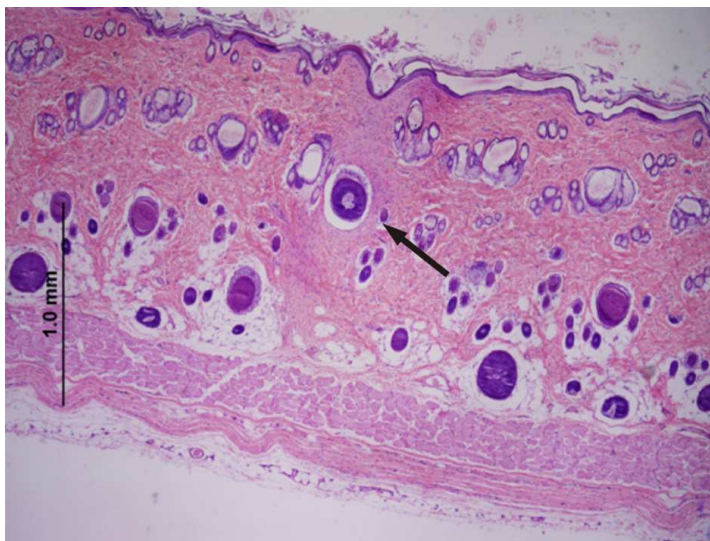


Figura 12 – Fotomicrografia de animal do grupo controle, tratado com ultrassom 3MHz, desligado, por um período de 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A seta demonstra área de reparação tecidual.

Todos os animais do grupo controle, após a incisão cirúrgica de 21 dias, apresentaram o mesmo padrão de reparação tecidual. Foi possível observar conforme a figura 12 uma reorganização da epiderme e da derme, redistribuição dos anexos do tegumento com tecido de granulação disperso.

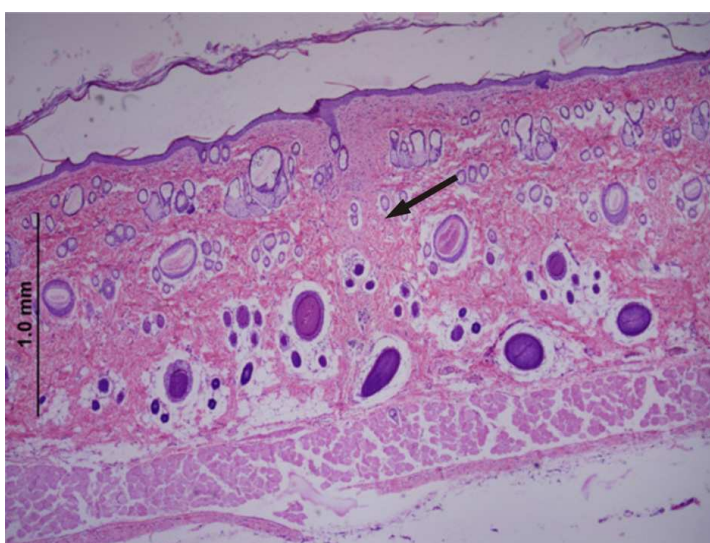


Figura 13 – Fotomicrografia do animal tratado do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 0,5W/cm² de intensidade, em 21 sessões consecutivas. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A seta indica área de reparação tecidual.

Foi possível observar de acordo com a figura 13 que houve um padrão de reparação tecidual semelhante em todos os animais do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 0,5W/cm² de intensidade, com tratamento diário por 21 dias.

Constatamos menor área com tecido de granulação demonstrando maior processo de reorganização da derme e também da epiderme na regeneração da área de incisão. Observamos também, grande quantidade de anexos da derme na área regenerada.

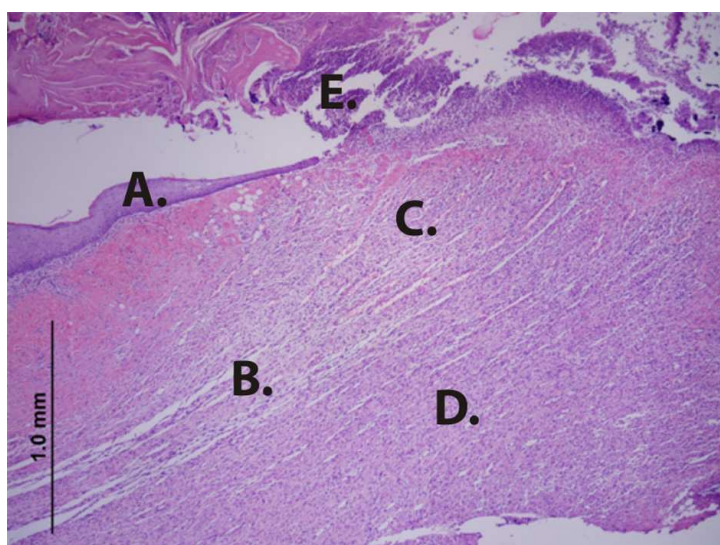


Figura 14 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom 3MHz, 2,0W/cm² de intensidade, por um período de 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração hematoxilina-eosina. Nota: A. Espessamento do estrato córneo; B. Ausência de papilas dérmicas; C. Ausência de anexos da derme; D. Intenso tecido de granulação; E. Tecido necrótico.

Em todos os animais do grupo tratado com ultrassom 3MHz, contínuo, 2,0W/cm² de intensidade, por 21 dias consecutivos com início 24h após o ato cirúrgico, apresetaram intensa desorganização da derme com grande área de distribuição de tecido de granulação. Além disso, houve perda intensa dos anexos da derme e ausência do padrão normal de reparação tecidual.

Conforme a figura 14 foi possível observar em todos os animais deste grupo um espessamento do estrato córneo, formação de crosta e tecido necrótico. Perda da camada hipodérmica e perda da camada muscular.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS COLÁGENOS TIPOS I E III

Ao observar a fotomicrografia abaixo (Figura 15) com luz polarizada, comparamos a mesma figura em coloração de Hematoxilina Eosina e identificamos nitidamente o afastamento das bordas incisoriais as quais foram quantificadas em três campos. A coloração amarelo-laranja mostra o colágeno tipo I já existente e o colágeno tipo III em coloração verde.

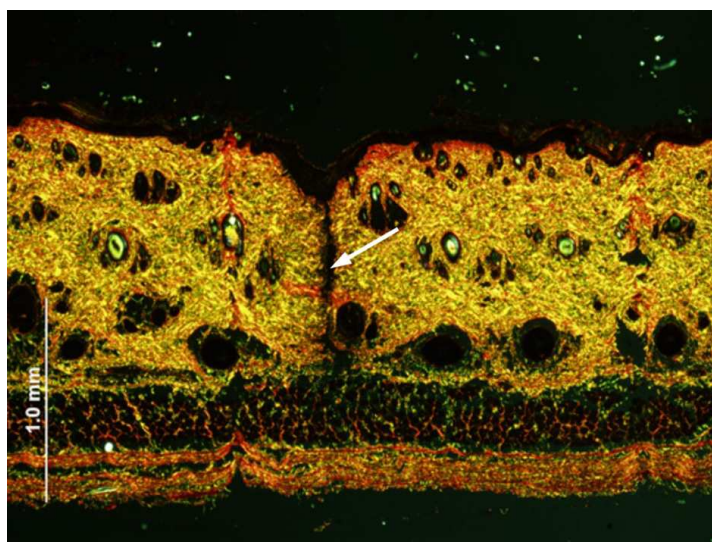


Figura 15 – Fotomicrografia do animal do grupo controle tratado com ultrassom de 3MHz, intensidade 0,0W/cm², por 3 dias. Vista panorâmica, aumento 40x, coloração picrosirius, microscopia de polarização. Nota: A seta indica a incisão por primeira intenção com ausência dos colágenos tipos I e III no local da cicatriz.

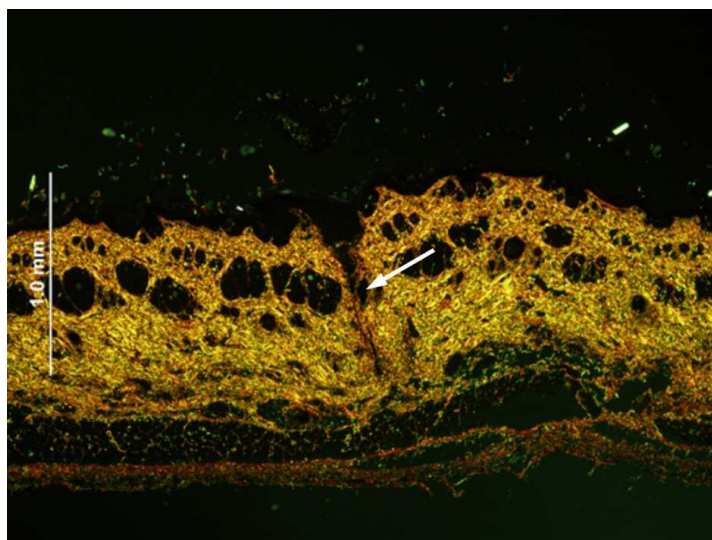


Figura 16 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 0,5W/cm² de intensidade, por um período de 3 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento de 40x, microscopia de polarização, coloração picrosirius. Nota: a seta indica área de incisão, com afastamento das bordas e sem presença de colágenos tipos I e III na cicatriz.

A figura 16 demonstra área de incisão, num período de 3 sessões de tratamento com ultrassom de 3MHz e intensidade 0,5W/cm², modo contínuo. Há presença de colágenos tipos I e III nas bordas da cicatriz já existentes, não apresentando reparo.

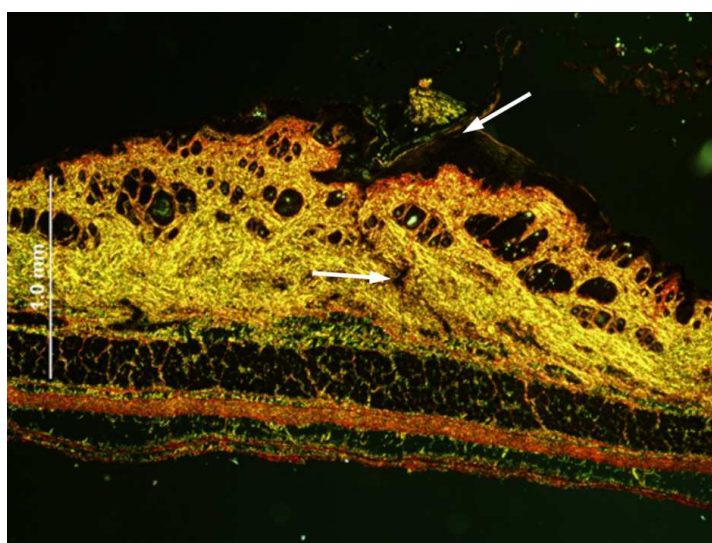


Figura 17 – Fotomicrografia do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 2,0W/cm² de intensidade, modo contínuo, durante 3 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento 40x, microscopia de polarização, coloração sirius red. Nota: as setas indicam crosta e local da incisão.

A figura 17 representa o grupo experimento 2, tratado com ultrassom de intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$, por um período de 3 dias consecutivos não apresentando regeneração local. Podem-se observar um afastamento das bordas da cicatriz com ausência dos colágenos tipos I e III no local.

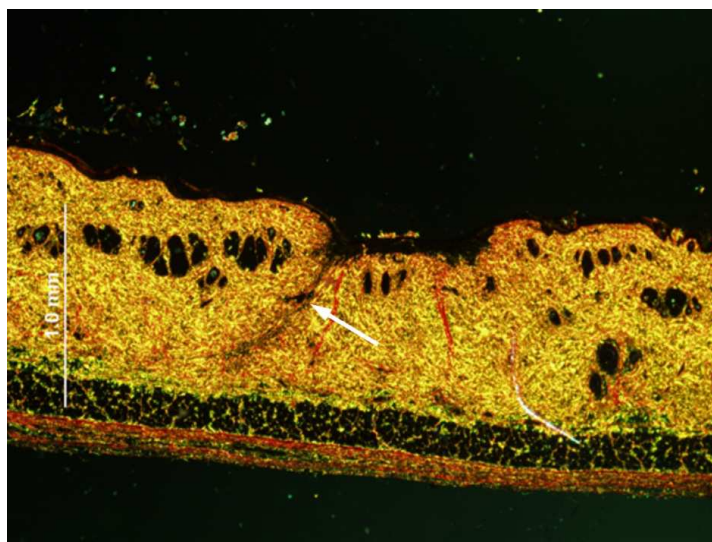


Figura 18 – Fotomicrografia do animal do grupo controle, tratado com ultrassom de 3MHz, $0,0\text{W}/\text{cm}^2$ de intensidade, modo contínuo, por 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento 40x, microscopia de polarização, coloração picrosirius. Nota: a seta indica área da cicatriz.

A figura 18 demonstra a área da cicatriz com presença dos colágenos tipos I e III, porém não totalmente preenchida.

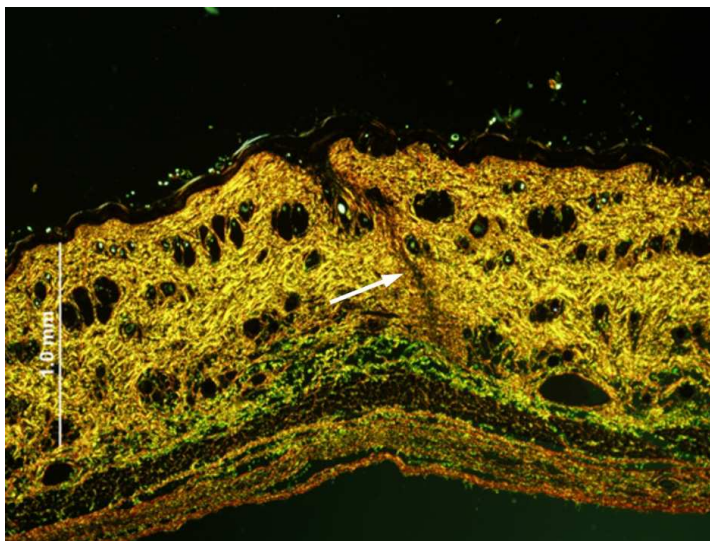


Figura 19 – Fotomicrografia do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, 0,5w/cm² de intensidade, modo contínuo, durante 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento 40x, microscopia de polarização, coloração picrosirius. Nota: A seta indica a linha da incisão e reparação.

Conforme figura 19, podemos observar a presença de colágenos tipos I e III no local da incisão, indicando presença de cicatrização. Entretanto, a seta demonstra a ferida não preenchida totalmente, correspondendo à fase de fibroplasia.

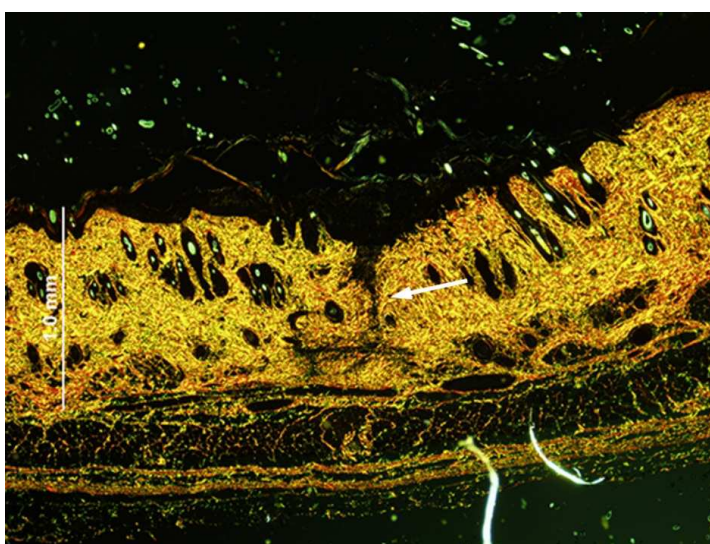


Figura 20 – Fotomicrografia do animal do grupo tratado com ultrassom de 3MHz, com 2,0 W/cm² de intensidade, modo contínuo, por um período de 7 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento de 40x, microscopia óptica polarizada, coloração sirius red. Nota: A seta indica região da cicatriz.

De acordo com a figura 20, identificamos a presença dos colágenos tipos I e III no local da incisão, porém não está totalmente preenchida.

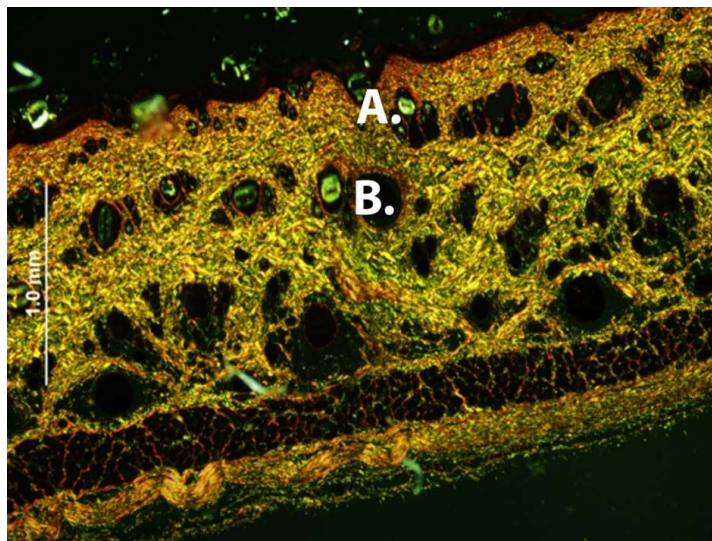


Figura 21 – Fotomicrografia do animal do grupo controle, tratado com ultrassom de 3Mhz, 0,0W/cm² de intensidade, por 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento 40x, microscopia óptica polarizada, coloração picrosirius. Nota: A: indica região de cicatriz; B: anexos da derme. C. Camada muscular.

Conforme a figura 21, observamos regeneração total da linha incisional. Presença de colágenos Tipos I e III, anexos preservados e na linha da cicatriz, demonstrando ser um tecido praticamente normal. Camada muscular preservada.

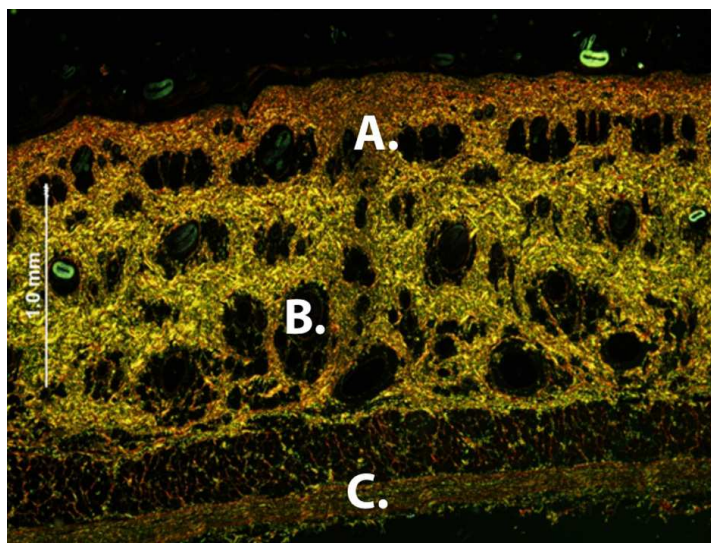


Figura 22 – Fotomicrografia do animal tratado com ultrassom 3MHz, 0,5W/cm² de intensidade, modo contínuo, durante 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento de 40x, microscopia de polarização, coloração picrosirius. Nota: A. Incisão regenerada; B. Anexos da derme; C. Camada muscular.

Conforme a figura 22, foi possível observar uma total regeneração da epiderme e derme e preservação da camada muscular. Constatamos também, a presença dos anexos da derme na região da cicatriz além de sua preservação neste tecido. Apresentação do colágeno tipo I amarelo-laranja ou vermelho e colágeno tipo III com coloração verde na área incisional indicando o reparo.

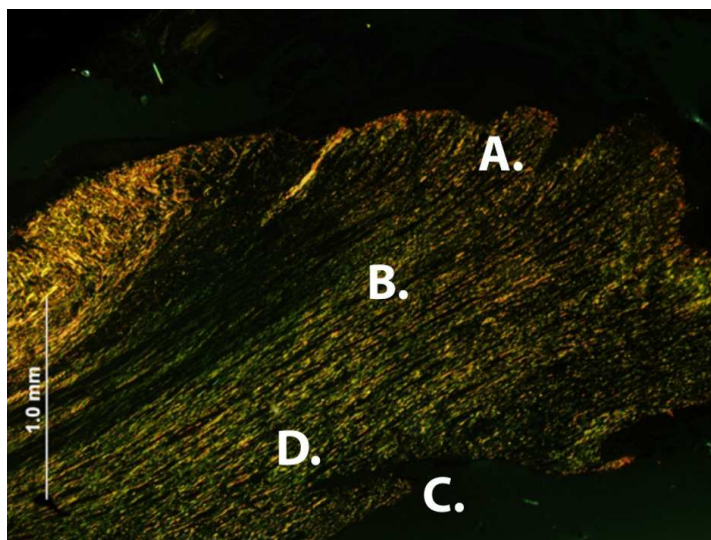


Figura 23 – Fotomicrografia do animal tratado com ultrassom 3MHz, intensidade 2,0W/cm², modo contínuo, durante 21 dias consecutivos. Vista panorâmica, aumento de 40x, microscopia de polarização, coloração picrosirius. Nota; A. Região periférica da cicatriz; B. Ausência de anexos da derme; C. Ausência de camada muscular; D. Intenso tecido de reparação.

Ao analisar qualitativamente a cicatrização do grupo tratado com ultrassom 3MHz, modo contínuo, intensidade 2,0W/cm², na figura 23, observamos em todos os animais uma intensa área de tentativas de regeneração a qual intensificou a presença do colágeno tipo III, na coloração verde.

Nas bordas da incisão houve necrose com perda dos tecidos no local da incisão promovidos pelo tratamento, impossibilitando qualquer análise local.

Observamos, também, uma perda total dos anexos da derme e da camada muscular acompanhadas de intensa fibrose.

4.3 RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PROGRAMA IMAGE PROPLUS

Inicialmente, tanto para colágeno tipo I como para colágeno tipo III, testou-se a hipótese nula de inexistência de interação entre os grupos (controle, grupo 1, tratado com ultrassom de 3MHz, contínuo, 0,5W/cm² de intensidade e grupo 2, tratado com ultrassom de 3MHz, modo contínuo, 2,0W/cm² de intensidade) e momento de sacrifício (3, 7 e 21 dias), versus a hipótese alternativa de existência de interação. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula ($p < 0,001$). Sendo

assim, não foi possível avaliar simultaneamente os dois fatores (grupo e momento) e a análise prosseguiu comparando-se os grupos em cada momento de sacrifício e comparando momento de sacrifício dentro de cada grupo.

4.3.1 Variável: colágeno tipo I

Considerando cada momento de sacrifício, testou-se a hipótese nula de que a média de colágeno I foi igual para os três grupos do estudo, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um grupo tem média diferente dos demais. Na tabela 1 foram apresentadas estatísticas descritivas de colágeno tipo I de acordo com os grupos e os valores de p dos testes estatísticos.

Para a comparação em que houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), foram feitas as comparações dos grupos dois a dois.

Tabela 1 – Colágeno tipo I

Momento	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
3 dias	Controle	10	11,97	13,10	3,62	16,80	4,23	0,089
	0,5 w/cm ²	9	17,32	17,24	6,46	24,78	5,54	
	2 w/cm ²	10	13,64	12,63	5,86	21,94	5,58	
7 dias	Controle	10	26,53	26,11	16,90	33,74	5,34	0,175
	0,5 w/cm ²	10	26,71	27,37	17,43	36,22	6,21	
	2 w/cm ²	10	21,18	21,21	7,72	38,38	9,58	
21 dias	Controle	10	34,48	35,67	19,82	48,34	8,83	<0,001*
	0,5 w/cm ²	10	38,94	37,26	25,68	65,95	12,33	
	2 w/cm ²	10	7,10	7,10	1,82	11,24	3,50	

Quando comparadas as intensidades dos grupos em 3 dias, com a quantificação da área da variável colágeno tipo I, suas médias e desvios padrões, não obtivemos resultados significativos ($p = 0,089$). O mesmo aconteceu para a variável colágeno tipo I para o tempo de 7 dias de aplicação do ultrassom

terapêutico apresentando $p=0,175$ não havendo diferença significativa entre a área quantificada relacionada às diferentes intensidades dos protocolos.

Em 21 dias a diferença das médias das áreas de colágeno tipo I entre as intensidades apresentou respostas significativas com $p<0,001$. Pareadamente comparadas, a intensidade zero do grupo controle 21 dias versus a intensidade $0,5W/cm^2$ do grupo 1 em 21 dias, temos $p=0,277$ não havendo significância entre eles onde controle apresentou 34,48% da área média da cicatriz para a variável colágeno tipo I ($\pm 8,83$) e o grupo 1 apresentou média de 38,94% para a variável colágeno tipo I ($\pm 12,33$).

Ao compararmos nesse mesmo grupo de 21 dias de terapia, houve significância entre grupo controle e grupo 2, tratado com ultrassom 3MHz, modo contínuo e intensidade $2,0W/cm^2$ ($p<0,001$) para a variável colágeno tipo I e área quantificada. O grupo controle apresentou maior média da quantidade de colágeno tipo I na área de cicatriz (34,48% e $\pm 8,83$) que o grupo 2 (7,10% e $\pm 3,50$).

No mesmo tempo de 21 dias, comparamos as duas intensidades utilizadas nos tratamentos grupos 1 e 2 e observamos significância entre elas e variável colágeno tipo I ($p<0,001$). Há maior quantidade média de colágeno tipo I no grupo tratado com a intensidade $0,5W/cm^2$ (38,94% e $\pm 12,33$) que no grupo tratado com a intensidade $2,0W/cm^2$ (7,10% e $\pm 3,50$). Vale ressaltar que os dados mensurados do colágeno tipo I no grupo tratado com intensidade $2,0W/cm^2$ foram quantificados nas bordas da linha incisional pois na linha central seria zero.

Considerando cada grupo, testamos a hipótese nula de que a média de colágeno tipo I é igual para os três momentos de sacrifício, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um momento tem média diferente dos demais. Na tabela 2 são apresentadas estatísticas descritivas de colágeno tipo I de acordo com os momentos e os valores de p dos testes estatísticos. Para as comparações em que houve diferença significativa entre os momentos ($p<0,05$), foram feitas as comparações dos momentos dois a dois.

Tabela 2 – Colágeno tipo I

Grupo	Momento	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
Controle	3 dias	10	11,97	13,10	3,62	16,80	4,23	<0,001*
	7 dias	10	26,53	26,11	16,90	33,74	5,34	
	21 dias	10	34,48	35,67	19,82	48,34	8,83	
0,5 W/cm ²	3 dias	9	17,32	17,24	6,46	24,78	5,54	<0,001**
	7 dias	10	26,71	27,37	17,43	36,22	6,21	
	21 dias	10	38,94	37,26	25,68	65,95	12,33	
2 W/cm ²	3 dias	10	13,64	12,63	5,86	21,94	5,58	<0,001***
	7 dias	10	21,18	21,21	7,72	38,38	9,58	
	21 dias	10	7,10	7,10	1,82	11,24	3,50	

Ao compararmos a quantidade média da área de colágeno tipo I referentes aos tempos de terapia ultrassônica 3 e 7 dias, observamos diferença significativa ($p < 0,001$) onde houve um aumento da variável colágeno tipo I no grupo controle com média 11,97% e $\pm 4,23$ em 3 dias para a média 26,53% e $\pm 5,34$ em 7 dias. Num mesmo contexto, há significância na variável quantificada de colágeno tipo I de 3 dias versus 21 dias de terapia para o grupo controle ($p < 0,001$). Observamos um aumento da média de colágeno tipo I de 11,97% e $\pm 4,23$ em 3 dias para 34,48% e $\pm 8,83$ em 21 dias. Ainda no grupo controle, há significância na quantidade de colágeno tipo I quando comparamos 7 e 21 dias de tratamento ($p = 0,010$). Temos um aumento relevante na quantidade média de colágeno tipo I entre 7 dias (26,53% e $\pm 5,34$) e 21 dias (34,48% e $\pm 8,83$).

Observando o quadro acima, comparamos os momentos de sacrifício na intensidade 0,5W/cm² e significância em todos eles relacionados à quantificação de colágeno tipo I. Quando comparamos 3 e 7 dias nesse grupo, temos $p = 0,026$. Com isso, observamos um aumento na média de colágeno tipo I na área da incisão de 17,32% e $\pm 5,54$ (3 dias) para 26,71% e $\pm 6,21$ (7 dias). Ainda na intensidade 0,5W/cm², verificamos um aumento da média do colágeno tipo I em 3 dias significativamente para 21 dias ($p < 0,001$). Os dados nos fornecem que a variável aumentou de 17,32% e $\pm 5,54$ em 3 dias para 38,94% e $\pm 12,33$ em 21 dias. Quando comparamos a quantidade média de colágeno tipo I desse grupo entre 7 e 21 dias,

temos $p=0,004$. Observamos um aumento significativo de 26,71% e $\pm 6,21$ em 7 dias para 38,94% e 12,33 em 21 dias.

Ao analisarmos os momentos de sacrifício na intensidade ultrassônica de 2,0W/cm² observamos significância ($p=0,018$) entre as médias da quantidade de colágeno tipo I em 3 e 7 dias. Em 3 dias temos 13,64% de colágeno tipo I na área de cicatriz para $\pm 5,58$ e 21,18% e $\pm 9,58$ em 7 dias. Quando comparados os tempos de sacrifício 3 dias com 21 dias nesse grupo temos uma diminuição significativa da variável colágeno tipo I ($p=0,038$). Houve um decréscimo na quantidade de colágeno tipo I de 13,64% e $\pm 5,58$ em 3 dias para 7,10% e $\pm 3,50$ para 21 dias. Nesse mesmo grupo, comparamos a quantidade média de colágeno tipo I na área das bordas da incisão entre 7 e 21 dias. Observamos uma diminuição significativa ($p<0,001$) da quantidade desse colágeno de 21,18% para 7,10% e desvio padrão de $\pm 9,58$ para $\pm 3,50$.

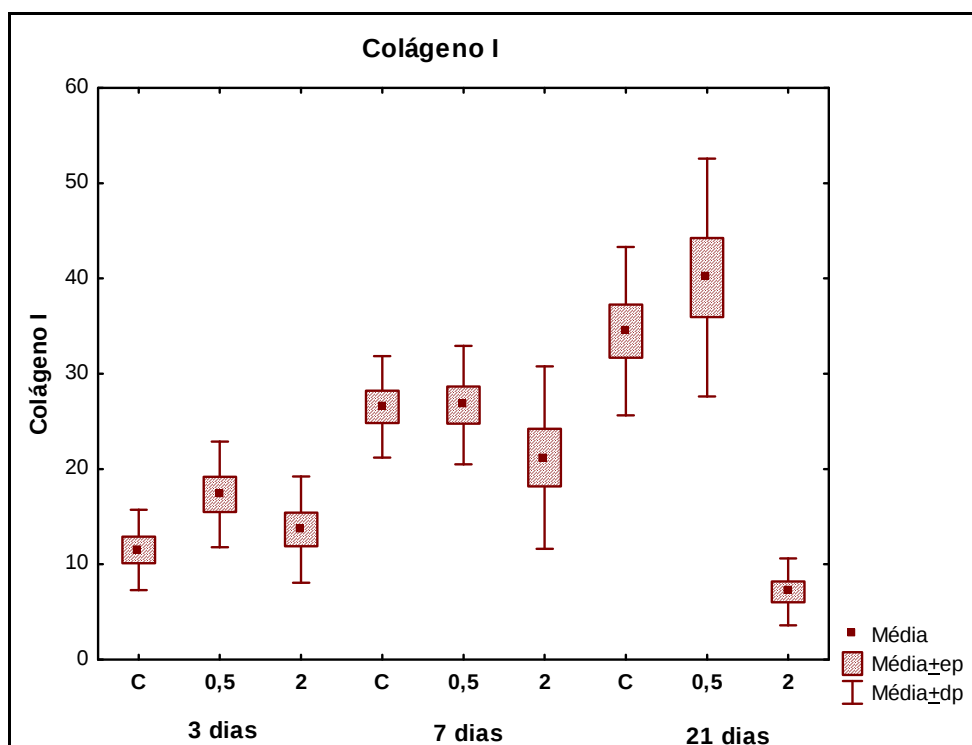


Gráfico 1 – Colágeno tipo I

O gráfico 1 representa o tempo total da terapia ultrassônica e a variação da área quantificada em porcentagem da variável colágeno tipo I.

Podemos observar que o estímulo ultrassônico apresentou-se superior na intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ quando comparado entre grupo controle e tratado com ultrassom $2,0\text{W}/\text{cm}^2$ em 3 dias, porém, não significativamente ($p=0,089$). Também nesse mesmo período de terapia, o grupo tratado com a intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$ obteve maior média de colágeno tipo I quando comparado ao grupo controle.

No período de 7 dias de terapia ultrassônica, o grupo tratado com ultrassom na intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$ apresentou insucesso quando comparado aos demais grupos, sendo que o grupo controle e o grupo tratado com ultrassom $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ obtiveram respostas similares na variável colágeno tipo I. O valor de p não foi significativo $p=0,175$.

Em 21 dias de terapia ultrassônica, o gráfico 1 demonstra, notoriamente, a menor quantidade de colágeno tipo I no grupo tratado com a intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$. Há maior quantidade desse colágeno no grupo tratado com ultrassom terapêutico com intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, atingindo resposta significativa ($p<0,001$) onde a média desse grupo foi de $38,94\%$ e $\pm 12,33$ para $34,48\%$ do grupo controle e $7,10\%$ do grupo tratado com intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$.

4.3.2 Variável: colágeno tipo III

Considerando-se cada momento de sacrifício, testou-se a hipótese nula de que a média de colágeno tipo III é igual para os três grupos do estudo, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um grupo tem média diferente dos demais. Na tabela abaixo são apresentadas estatísticas descritivas de colágeno tipo III de acordo com os grupos e os valores de p dos testes estatísticos. Para a comparação em que houve diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$), foram feitas as comparações dos grupos dois a dois.

Tabela 3 – Colágeno tipo III

Momento	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
3 dias	Controle	10	2,61	2,30	0,15	5,11	1,52	0,006*
	0,5 w/cm ²	9	4,26	4,07	2,93	5,70	0,98	
	2 w/cm ²	10	2,06	1,96	0,78	3,73	1,10	
7 dias	Controle	10	3,76	2,98	1,24	12,80	3,38	0,101
	0,5 w/cm ²	10	6,15	4,85	1,85	13,80	3,73	
	2 w/cm ²	10	3,76	3,12	1,28	8,33	2,29	
21 dias	Controle	10	9,81	9,95	6,05	11,91	1,62	0,341
	0,5 w/cm ²	10	11,46	10,62	6,64	19,62	3,82	
	2 w/cm ²	10	14,64	11,42	5,63	44,62	11,04	

*Controle x 0,5 W/cm²: p=0,013

Controle x 2 W/cm²: p=0,435

0,5 w/cm² x 2 W/cm²: p=0,002

Ao compararmos as intensidades e grupo controle em 3 dias, podemos observar diferença significativa entre eles para a variável colágeno tipo III ($p < 0,006$). Houve um aumento significativo da quantidade de colágeno tipo III na área da incisão na intensidade 0,5W/cm² quando comparado ao grupo controle ($p = 0,013$) onde as médias são: 4,26% e 2,61% respectivamente, e desvios padrões de $\pm 0,98$ e $\pm 1,52$ respectivamente.

Não apresentou significância ($p = 0,435$) quando comparados os grupos controle e tratado com intensidade 2,0W/cm². Entretanto, ao comparar as intensidades dos grupos tratado com ultrassom 0,5W/cm² e tratado com ultrassom 2,0W/cm² observamos um aumento significativo ($p = 0,002$) da variável colágeno tipo III na intensidade menor com média 4,26% e $Dp \pm 0,98$ para 2,06% e $\pm 1,10$ da intensidade maior em 3 dias.

Em 7 dias de terapia ultrassônica não houve diferença significativa ($p = 0,101$) da variável colágeno tipo III entre os grupos, apesar do grupo 1 ter apresentado melhor estímulo.

Podemos observar, na tabela 3, que a comparação entre a variável colágeno tipo III e as intensidades, no período de 21 dias de terapia ultrassônica, não

apresentou resposta significativa ($p=0,341$). Vale ressaltar que a quantificação da variável colágeno tipo III no grupo tratado com intensidade $2,0W/cm^2$ foi nas bordas da cicatriz, diferentes das demais as quais foram quantificadas na linha da incisão.

Considerando-se cada grupo, testou-se a hipótese nula de que a média de colágeno III é igual para os três momentos de sacrifício, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um momento tem média diferente dos demais. Na tabela 4 foram apresentadas estatísticas descritivas de colágeno III de acordo com os momentos e os valores de p dos testes estatísticos. Para as comparações em que houve diferença significativa entre os momentos ($p<0,05$), foram feitas as comparações dos momentos dois a dois.

Tabela 4 – Colágeno tipo III

Grupo	Momento	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
Controle 0,5 w/cm ²	3 dias	10	2,61	2,30	0,15	5,11	1,52	<0,001*
	7 dias	10	3,76	2,98	1,24	12,80	3,38	
	21 dias	10	9,81	9,95	6,05	11,91	1,62	
	3 dias	9	4,26	4,07	2,93	5,70	0,98	<0,001**
	7 dias	10	6,15	4,85	1,85	13,80	3,73	
	21 dias	10	11,46	10,62	6,64	19,62	3,82	
2 w/cm ²	3 dias	10	2,06	1,96	0,78	3,73	1,10	<0,001***
	7 dias	10	3,76	3,12	1,28	8,33	2,29	
	21 dias	10	14,64	11,42	5,63	44,62	11,04	

Quando comparados a quantidade de colágeno tipo III e os dias do sacrifício observamos um aumento significativo na quantidade de colágeno do grupo controle entre 7 e 21 dias ($p<0,001$) e também na quantidade inicial de colágeno e final equivalendo a 3 e 21 dias ($p<0,001$).

Entre 7 e 21 dias, temos quase 3 vezes mais quantidade de colágeno onde a média de 3,76% passou para 9,81%. Ao quantificarmos 3 e 21 dias temos 2,61% de colágeno tipo III de média inicial para 9,81% de média final.

Entre 3 e 7 dias não observamos aumento significativo na quantidade de colágeno tipo III ($p=0,265$).

Ao analisar o grupo tratado com ultrassom de intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ e os dias de terapia, constatamos um aumento significativo na variável colágeno tipo III entre 3 e 21 dias ($p<0,001$), e 7 e 21 dias ($p<0,001$). O mesmo não observamos entre 3 e 7 dias não apresentando aumento significativo para $p=0,199$.

Para 7 dias temos 6,15% de média de colágeno tipo III e $\pm 3,73$. Em 21 dias observamos quase o dobro de colágeno tipo III (11,46%) para $\pm 3,82$.

No grupo tratado com intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$, também foi possível observar significância estatística para a variável colágeno tipo III entre 3 e 21 dias ($p<0,001$) e entre 7 e 21 dias ($p<0,001$). Não observamos significância estatística para a variável colágeno tipo III entre 3 e 7 dias ($p=0,051$).

As médias para os colágenos 3, 7 e 21 dias foram: 2,06%, 3,76% e 14,64% e seus desvios padrões, respectivamente: $\pm 1,10$, $\pm 2,29$ e $\pm 11,04$.

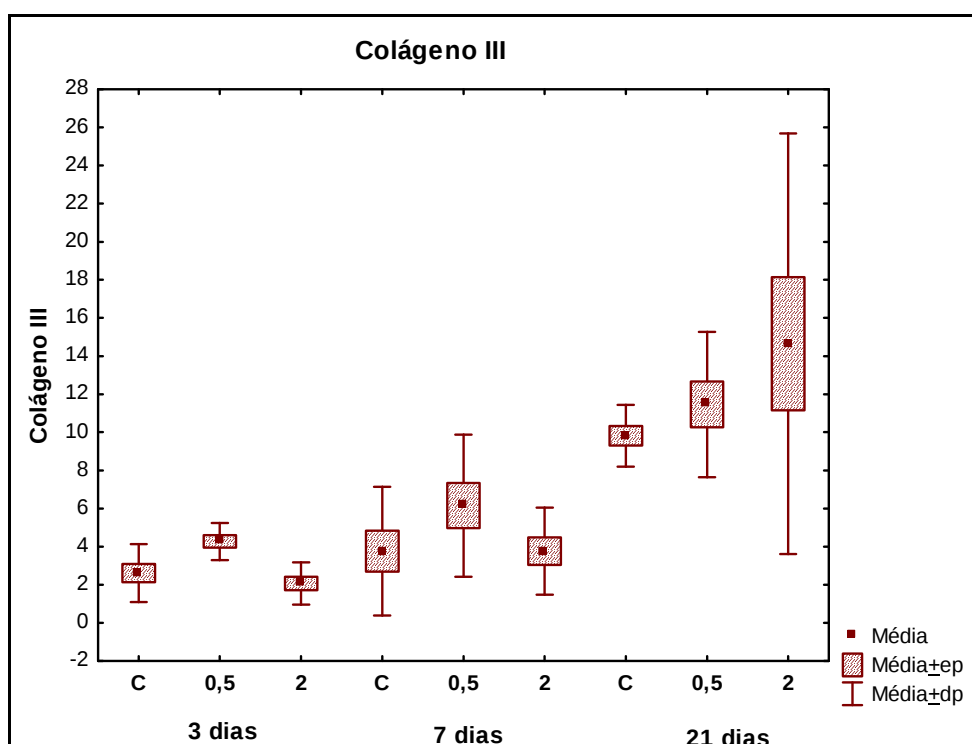


Gráfico 2 – Colágeno tipo III

O gráfico 2 representa a variável colágeno tipo III em seus tempos e intensidades. Foi possível observar a ineficiência da terapia ultrassônica na

intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$. Em todos os grupos tratados nessa intensidade notamos resultados não reprodutíveis quando comparamos o grupo controle e as demais intensidades. O aumento, não significativo da variável colágeno tipo III, em 21 dias, nas intensidades $2,0\text{W}/\text{cm}^2$ e $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, indicou o retardo do processo de cicatrização.

5 DISCUSSÃO

Pelos achados, notadamente, a eficácia do ultrassom do modo contínuo foi comprovada em vários protocolos de reparo de diferentes tecidos que compõem ossos, tendões, músculos (GARAVELLO et al., 1997; FERNANDES; ALVES; SOUZA, 2003; KARNES; BURTON, 2002). Poucos são os trabalhos que validam esse modo de emissão de onda quando aplicado sob lesão de pele. Atualmente, o ultrassom pulsado é mais utilizado que o ultrassom contínuo nas fases do reparo da pele devido aos seus efeitos não térmicos ou microtérmicos conforme relato de Watson (2008).

Sob essa perspectiva, Byl et al. (1993) compararam o modo contínuo com o modo pulsado concluindo haver maior deposição de colágeno em lesão de pele de porcos na intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, modo pulsado, durante 5 minutos de exposição de onda. Em contrapartida, Cambier e Vandestraeten (1997) não observaram diferença significativa entre os modos na cicatrização de queimaduras em ratos.

Em protocolo de comparação semelhante desenvolvido no processo de regeneração de tendões, Cunha, Parizotto e Vidal (2001) constataram que o ultrassom pulsado na intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, contribuiu com uma melhor organização do colágeno que o modo contínuo. Neste último observaram também, diminuição da aceleração no reparo.

De acordo com Boucaud et al. (2001) a partir da exposição de segmentos de pele humana e de ratos glabra, *in vivo* e *in vitro*, ao ultrassom terapêutico de frequência 20kHz e intensidade de $0,25\text{W}/\text{cm}^2$ a $7,0\text{W}/\text{cm}^2$, no modo pulsado e contínuo, observaram eritema após exposição em intensidade acima de $2,5\text{W}/\text{cm}^2$, lesão dérmica e necrose muscular após 24h.

Neste mesmo contexto, Ter Haar (2007) relata que a maioria das pesquisas desenvolvidas com o modo pulsado indica possuir mais benefícios no reparo de tecidos moles que o modo contínuo em intensidades não excedentes a $0,5\text{W}/\text{cm}^2$. O mesmo autor ressalta ainda, sobre indícios de que o ultrassom, nos modos contínuo e pulsado, com frequência $1,5\text{W}/\text{cm}^2$ seja mais eficaz que o ultrassom de frequência 3MHz.

Como na literatura, os achados da pesquisa mostraram haver maior número de trabalhos defendendo o uso do modo pulsado por facilitar a dispersão do calor, efeito térmico menor e mecânico maior, parece ser este o método mais eficaz. É

necessário salientar que nessas pesquisas, quase por unanimidade, os autores sugerem um número maior de análises no equipamento de ultrassom e principalmente, defendem a necessidade do desenvolvimento de novos protocolos sobre a frequência, modo de emissão de onda escolhido, intensidade e tempo de aplicação.

Na literatura identificamos haver escassez de análise do modo contínuo no tratamento de reparação da pele. Essa ocorrência não exclui o modo contínuo para fins terapêuticos. Notamos que não há consenso na discriminação do modo contínuo como ineficiente no processo de regeneração tecidual. Desta forma, neste trabalho procuramos avaliar apenas a eficácia do modo contínuo nas diferentes fases da regeneração sem compará-las com outros modos e métodos de pesquisa. De forma oculta objetivamos, também, contribuir com a construção do protocolo de tratamento efetuado com o ultrassom no modo contínuo em reparo de pele.

O rato Wistar foi escolhido como material experimental por ser um animal de fácil obtenção e manuseio no biotério. A região dorsal foi selecionada para o procedimento cirúrgico por encontrar-se relativamente menos exposta às contaminações, pelo menor contato com urina, fezes e saliva do animal, diminuindo os riscos de infecção. No referente ao processo de regeneração esse animal experimental apresenta tanto a composição da pele quanto a capacidade de regeneração tecidual semelhante aos humanos.

A padronização do tempo, da frequência de estimulação, da intensidade e dos tecidos regenerados pelos procedimentos utilizados na terapia ultrassônica no modo contínuo apresentam grande variação na literatura consultada (POLACOW et al., 2005).

A escolha desse método de pesquisa baseou-se no protocolo descrito por Harvey, Dyson e Pond (1975) onde foi aplicado o ultrassom contínuo 3MHz, nas intensidades 0,5W/cm² e 2,0W/cm², durante 4 dias. Os mesmos autores observaram maior síntese de colágeno nos resultados apresentados. Este fato influenciou a elaboração desse protocolo de pesquisa. Assim, optamos por aplicar o ultrassom no modo contínuo na frequência de 3MHz, nas intensidades 0,5W/cm² e 2,0W/cm² conforme autor supracitado, porém a escala de tempo foi inspirada nas diferentes fases do processo de reparação.

Aplicamos a terapia ultrassônica por 5 minutos de radiação diária. Efetuamos a seqüência de aplicações durante os próximos 3 dias (fase inflamatória), 7 dias (fase proliferativa) e 21 dias (fase de remodelagem).

É necessário salientar que por precaução e prevenção, iniciamos a terapia ultrassônica 24 horas após a cirurgia. Este fato justifica-se por não ser indicado o uso do ultrassom durante o sangramento, pois o mesmo, no modo contínuo, aumenta o fluxo sanguíneo.

É notório que na fase inflamatória (3 dias) o ultrassom possui efeito estimulante sobre mastócitos, plaquetas, leucócitos, macrófagos (WATSON, 2008). Segundo Leung, Ng e Yip (2004), Nussbaum (1997); Mortimer e Dyson (1988) a aplicação do ultrassom induz a degradação dos mastócitos. Esse resultado melhora a qualidade e normalidade dos eventos inflamatórios. Apesar de não focarmos análise nas alterações celulares na fase inflamatória, identificamos nesta fase espessamento da epiderme e início de formação de tecido de granulação no local da incisão.

É sabido, também, que na fase proliferativa (7 dias), o efeito estimulante se dá principalmente em fibroblastos, miofiblastos e células endoteliais. Analisando os nossos resultados nessa fase identificamos intensa presença de tecido de granulação o qual foi melhor observado no grupo Experimento 1, grupo este formado por animais tratados com terapia ultrassônica $0,5\text{W}/\text{cm}^2$. Da mesma maneira, este efeito estimulante resultou na formação significativa ($p < 0,05$) de colágeno tipo III comparado ao controle e intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$.

No período correspondente a fase de remodelagem (21 dias) conforme Nussbaum (1997), Huys et al. (1993) e Byl et al. (1996) a terapia ultrassônica influencia tanto a orientação das fibras colágenas recém formadas como a maturação do colágeno tipo III causando assim, aumento da capacidade de regeneração. Comparando com os resultados obtidos nos grupos 1 e 2 formados, respectivamente, por grupo tratado com ultrassom 3MHz, contínuo, intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ e grupo tratado com ultrassom de 3MHz, contínuo, intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$ o uso prolongado até 21 dias não demonstrou resultados favoráveis que pudessem ser aplicados clinicamente em reparo de pele. Os resultados obtidos no grupo 1 e analisados por polarização demonstraram aumento na quantidade de colágeno tipo I e III, sugerindo reverberação e intensificação do processo de regeneração. De forma semelhante podemos observar, por análise da coloração com HematoxilinaEosina, a

formação do tecido de granulação no local da incisão. Em todos os animais do grupo 2 observamos intensa desorganização da derme com grande área de distribuição de tecido de granulação. Além disso, identificamos perda intensa dos anexos da derme e ausência do padrão normal de reparação tecidual. Observamos ainda espessamento do estrato córneo, formação de crosta e tecido necrótico, perda da camada hipodérmica e perda da camada muscular do músculo cutâneo do tronco. Baseados nesses fatos, relatamos a inviabilidade do uso do ultrassom terapêutico 3MHz, modo contínuo, na intensidade 2,0W/cm² num prolongado período de tempo.

Conforme o protocolo estabelecido por Dyson (1987) e adotado neste experimento, o tempo de aplicação de 5 minutos foi suficiente para gerar os efeitos térmicos e atérmicos. Outros autores como Matheus et al. (2008), seguiram semelhantes protocolos de tempo, porém com diferentes metodologias nos seus experimentos.

Karnes e Burton (2002) estudando o ultrassom contínuo 1MHz, 0,5W/cm² de intensidade, tempo de 1 minuto, em músculo esquelético lesado, observaram que entre 3 e 5 dias o estímulo ultrassônico não obteve resposta significativa quando comparado ao controle, entretanto, em 7 dias acelerou o reparo do músculo. Apesar de não ter sido o foco desta pesquisa, analisar a regeneração do músculo cutâneo do tronco, constatamos, quando comparamos os nossos resultados com os autores supracitados, a existência de fibras musculares regeneradas, com núcleo central, dessa camada muscular no mesmo período de 7 dias.

Harvey, Dyson e Pond (1975) verificaram o ultrassom contínuo 3MHz, nas intensidades 0,5W/cm² e 2,0W/cm² durante 4 dias. Identificaram aumento significativo da síntese protéica e alteração na membrana da célula, além da quantidade de fibroblasto o qual resultou em maior síntese de colágeno. Da mesma forma, ao compararmos a quantidade de colágeno tipo III do grupo controle com o grupo 1, tratado com terapia ultrassônica 0,5W/cm², observamos um aumento significativo deste componente. Novamente, fazendo a comparação entre o grupo controle e o grupo 2, tratado com terapia ultrassônica, 2,0W/cm² de intensidade, identificamos neste último grupo, menor quantidade de colágeno tipo III no mesmo intervalo de tempo.

Lobato e Nazzer (2002) em trabalho experimental em coelhos, concluíram que o ultrassom de baixa intensidade 0,2W/cm² e 0,4W/cm², 5 minutos por 7 dias consecutivos mostraram-se mais efetivos para uma menor formação de aderências

tendinosas e a baixa intensidade proporcionou melhor resultado. Como trabalhamos com diferente material e escolha de tecido estes dados invalidam qualquer forma de comparação, porém analisando a baixa intensidade e período de tempo, adquirimos qualitativamente resultados similares. Constatamos nos nossos resultados que, em todos os animais estudados do grupo 1, tratado com ultrassom $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, melhor capacidade de regeneração, maior quantidade de tecido de granulação dentro do período de tempo até 7 dias.

Ng e Fung (2007) em estudo experimental com ratos, analisaram o ultrassom terapêutico modo contínuo nas intensidades $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, $1,2\text{W}/\text{cm}^2$, $2,0\text{W}/\text{cm}^2$ e controle em 22 sessões terapêuticas com tempo de aplicação de 1 minuto. Observaram que as três intensidades foram melhores quando comparadas ao controle e não obtiveram diferença significativa entre elas na densidade das fibras de colágeno do tendão calcâneo. Justificando que a alta intensidade utilizada num curto período de tempo de aplicação estimula a regeneração do colágeno independente da dose.

Na mesma linha de raciocínio, Robertson (2002) contestou os efeitos terapêuticos ultrassônicos por não serem dependentes das intensidades. Os resultados do nosso trabalho contribuíram para firmar o malefício ocasionado pela terapia ultrassônica do grupo 2, tratado com intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$, por período prolongado (21 dias) no intervalo de tempo de 5 minutos.

O ultrassom terapêutico apesar de ser utilizado com frequência, ainda não tem seus protocolos de aplicação terapêutica padronizados e cientificamente validados. Nessa forma de análise a frequência mais utilizada nos tecidos superficiais como a pele, segundo Hoogland (1986), é de 3MHz. Da mesma forma, diversos autores reproduziram a intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ nos seus experimentos com propósito de reparo (ALFREDO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2007; Dyson et al., 1968 apud GONÇALVES et al., 2007).

Apesar de haver reprodutibilidade na frequência e intensidade nos métodos aplicados na terapia ultrassônica, parece não existir parâmetros estabelecidos de dosimetrias e discrepância na análise da profundidade de penetração da emissão ultrassônica e grau de absorção pelos tecidos, (TER HAAR, 1998; HOOGLAND, 1986; WARD, 1980; MCDIARMID; BURNS, 1987 apud LOW; REED, 2001).

Da mesma forma, Sá et al. (2006) relataram haver escassas evidências científicas dos efeitos do ultrassom sobre os tecidos biológicos, relacionando esse

fato às inúmeras falhas metodológicas, incluindo relação do tamanho da área de radiação efetiva com a extensão da lesão e principalmente informações sobre a calibração dos aparelhos.

Cabe ressaltar que efetuamos a calibração do equipamento ultrassônico por meio de aferição com dosímetro de precisão para certificar a intensidade de saída do transdutor com a premissa de preparar o aparelho de forma eficiente para gerar os efeitos biofísicos esperados no tecido em regeneração.

Segundo International Electrotechnical Commission (IEC) sobre o equipamento de ultrassom terapêutico, comumente utilizado na fisioterapia, destacam-se limites para a proteção do paciente. Um desses limites é a temperatura do transdutor em sua face frontal, não podendo exceder a temperatura de $41,1^{\circ}\text{C}$ quando operados sob água (DUCK, 2007). Neste contexto ao realizarmos o experimento, observamos um aquecimento do cabeçote na intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$, contudo o mesmo não foi mensurado. Da mesma forma desconhecemos a temperatura atingida pelo tecido irradiado promovido pela emissão da onda ultrassônica. Identificamos nos resultados do grupo 2, má cicatrização representada por tecido necrótico com destruição no local da incisão decorrente, provavelmente, por aquecimento. Isso notadamente contribuiu para a má cicatrização obtida nos resultados desse grupo experimental.

Contrariamente, Allen (2006) e Ter Haar (1999) relataram que o aquecimento do ultrassom contínuo aumenta a extensibilidade do colágeno, podendo trabalhar aderências, redução do limiar nociceptivo e relaxamento muscular.

Analisando os resultados obtidos a partir da quantificação do colágeno tipo I em 3 dias, não constatamos dados significativos ($p=0,089$) entre as diferentes intensidades dos grupos tratados e também do grupo controle. Não identificamos benefícios nem malefícios relevantes que pudessem sugerir indicação terapêutica ou condenação do procedimento nos protocolos.

Neste contexto, na análise da apresentação do colágeno pela aplicação do modo contínuo não foi possível identificar a extensibilidade do colágeno devido à metodologia adotada. Porém, podemos observar a partir da análise quantitativa um aumento do colágeno tipo I na área da incisão cirúrgica indicando a organização do tecido neoformado após 21 dias de terapia ultrassônica nos grupos controle e grupo 1, controle e tratado com intensidade $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, respectivamente. Entretanto, ao analisarmos o grupo 2, tratado com intensidade $2,0\text{W}/\text{cm}^2$, identificamos uma diminuição significativa ($p<0,001$) do colágeno tipo I quando comparado aos demais

grupos experimentais. Observamos, também, ausência de colágeno tipo I no local da lesão sugerindo ineficácia do processo de regeneração. Nas mesmas condições, ao analisarmos a terapia aplicada por 7 dias, observamos diferença na quantificação da área de colágeno tipo I. A mesma não apresentou ser significativa ($p=1,75$) entre os grupos controle, grupo 1 e grupo 2. Constatamos que as médias dos resultados apresentaram-se similares entre a baixa intensidade ($0,5W/cm^2$) e o grupo controle. O grupo tratado com intensidade $2,0W/cm^2$ apresentou menor quantidade de colágeno tipo I quando comparado aos demais grupos. Isso demonstrou ineficiência da terapia ultrassônica nessa intensidade, período de tempo e no modo contínuo aplicado. Portanto, estes fatos nos obrigam condenar a aplicação do ultrassom no modo contínuo, de intensidade $2,0W/cm^2$ em médios e longos períodos de tratamento pós-lesão de pele.

Na avaliação do colágeno tipo III constatamos diferença significativa ($p<0,05$) entre as médias apresentadas pelo grupo controle, grupo 1 e grupo 2 em 3 dias. Entretanto, cabe ressaltar que a melhor média apresentada nesse período de tempo pertence ao grupo 1.

Estudando os resultados do colágeno tipo III no momento 7 dias do experimento observamos ausência significativa ($p>0,05$) entre as médias dos três grupos estudados. Novamente a melhor média apresentada foi a do grupo tratado com intensidade $0,5W/cm^2$ indicando maior concentração de colágeno tipo III na fase proliferativa confirmando o estímulo ultrassônico também, observadas nas lâminas fixadas com HematoxilinaEosina onde apresentou maior fibroplasia.

Ao analisarmos a variável colágeno tipo III e suas médias entre os três grupos estudados no tempo de 21 dias não identificamos significância ($p>0,05$) entre os resultados. Entretanto, a grande quantidade de colágeno tipo III nessa fase apresentada pelos grupos estimulados indica a permanência do processo de cicatrização.

É importante salientar que não encontramos na literatura resultados similares que pudessem corroborar com os nossos achados.

Finalizando a análise, este método mostrou ser eficiente para a terapia ultrassônica aplicada no grupo 1, de frequência 3MHz, modo contínuo, na intensidade de $0,5W/cm^2$ e período de tempo até 7 dias. Visto que ocorreu em todos os animais estudados maior quantidade de tecido de granulação, melhor

recuperação e apresentação dos anexos da pele, satisfatória quantidade dos colágenos tipo I e tipo III demonstrando sucesso no reparo.

Todavia, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos da terapia ultrassônica no modo contínuo em relação à dose, frequência, tempo e número de aplicações.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que:

- Os efeitos da terapia ultrassônica de 3MHz de frequência, no modo contínuo, com intensidade $0,5W/cm^2$, mostrou ser eficiente até 7 dias no protocolo de cicatrização de pele de ratos. Os resultados obtidos pela terapia ultrassônica de 3MHz de frequência, no modo contínuo, com intensidade $2,0W/cm^2$, os efeitos apresentaram-se negativos e incompatíveis para aplicação clínica.
- A análise histomorfológica demonstrou formação de tecido de granulação no local da incisão cirúrgica por primeira intenção em todas as fases do processo de reparação tecidual após aplicação da terapia ultrassônica na intensidade $0,5W/cm^2$.
- O protocolo estabelecido foi satisfatório e eficiente na demonstração dos diferentes aspectos da epiderme e da derme no processo de regeneração tecidual.
- A terapia ultrassônica promoveu a formação dos colágenos tipo I e tipo III em todos os grupos analisados. Houve maior quantidade de colágeno tipo I ao final do tratamento no grupo 1, com aplicação da intensidade $0,5W/cm^2$, comprovando a eficiência do método. Entretanto, constatamos maior formação de colágeno tipo III no mesmo período de tempo sugerindo a persistência do estímulo e, conseqüentemente, reverberação do processo de regeneração nos grupos estimulados pela onda ultrassônica.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K. et al. **Fundamentos de ROBBINS & COTRAN patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- ALFREDO, P. P. et al. Effects of phonophoresis with arnica montana onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: na experimental study. **Ultrasonics**, v. 49, p. 466-471, 2009. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/ultras>. Acesso em: 17 maio 2009.
- ALLEN, R. J. Physical agents used in the management of chronic pain by physical therapists. **Phys Med Rehabil Clin N Am**, v. 17, p. 315-345, 2006. Disponível em: <www.pubmedonline.com>. Acesso em: 20 maio 2009.
- AMANCIO, A. **Efeitos do ultra-som terapêutico na integração de enxertos de pele total em coelhos**. 2003. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-20082003-110748/>>. Acesso em: 10 maio 2009.
- ANDERSON, W. A. D. **Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- ARAÚJO, M. et al. Efeitos do Ultra-som de baixa intensidade na veia auricular em coelhos. **Acta Cir. Brás**, v. 18, n. 1, jan./fev. 2003. Disponível em: <www.scielo.br/acb>. Acesso em: 16 dez. 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR IEC 60601-2-5**: equipamento eletromédico parte 2; prescrições particulares para a segurança de equipamentos de ultra-som para terapia. São Paulo, 2000.
- BAKER, J. L.; CHANDLER, M. L.; LEVIER, R. R.; Ocurrence and activity of myofibroblasts in human capsular tissue surrounding mammary implants. **Plast. Recont. Surg**, v. 68, p. 905, 1981.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. N.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1. p. 27-51, 2005.
- BARROS, A. R. **Os efeitos do Ultra-som terapêutico nas lesões da epiderme em coelhos**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.
- BASSOLI, D. **Avaliações dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na região de músculos esqueléticos**. 2001. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

BAYAT, M. et al. The effects of ultrasound therapy on skin scars of rabbits. **Arch Irr Med**, v. 4, n. 2, p. 72-75, 2001.

BIRCHARD, J. S.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders**: Clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, 2004.

BLUME, K. et al. Dosimetria proposta para tratamento por ultra-som: uma revisão de literatura. **Fisioterapia Movimento**, v. 18, n. 3, p. 54-55, 2005.

BORGES, F. Modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas. São Paulo: Phorte, 2006.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BYL, N. N. et al. Incisional wound healing: a controled study of low and high dose ultrasound. **J. Orth Sp Phys Ther**. v.18, n.5, p.619-628, 1993.

BYL, N. N.; TOULOUSE, L. H.; SITTON, P. et al. Effects of ultrasound on the orientation of fibroblasts: an in-vitro study. **Eur. J. Phys. Med. Rehab**. v.6, n.6, p.180-184, 1996.

BOUCAUD, A.; MACHET, L.; ARBEILLE, B.; MACHET, M. C. et al. In vitro study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. **International Journal of Pharmaceutics** v.228, p.69-77, 2001. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/ijpharm> Acesso em 19/07/2008.

CAMBIER, D. C.; VANDERSTRAETEN, G. G. Failure of therapeutic ultrasound in healing burn injuries. **Burns** v. 23, n.3, p.248-249, 1997.

CAMPANELLI, F. **Efeitos da radiação ultrassônica pulsada e de baixa intensidade sobre o mal perfurante plantar, manifestação cutânea decorrente de hanseníase**. 2004. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair. Basic biologic considerations. **J Am Acad Dermatol**. v.13, p. 701, 1985.

CLARK, R. A. F. Potencial roles of fibronectin in cutaneous wound repair. **Arch Dermatol**, v. 124, p. 201, 1998.

CLARK, R. A. F. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **Am J Med Scie** v. 306, p. 42-48., 1993.

CLARK, R. A. F.; HENSON, P. M. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum, 1988. p. 3-33.

COAKLEY, W.T. Biophysical effects of ultrasound at therapeutic intensities. **Physiotherapy** v.64, p. 166-169, 1978.

COLLINS, K. Efeitos térmicos. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10. ed. São Paulo: Manole, 2001. p. 89-104.

COOPS, J. et al. Anesthesia of laboratory animals. University of Guelph, 1992.

CULLING, C. F.; ALLISON, R. T.; BARR, W. T. **Cellular pathology technique** 4, Butterworth, London, 1985.

CUNHA, A.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. Achilles Tendon (*Tendo Calcaneus*) of the rat. **Ultrasound in Med. & Biol.**, v. 27, n. 12, p. 1691-1696, 2001. Disponível em: <www.libertonline.com/doi/pdfplus>. Acesso em: 20 dez. 2008.

DANTAS et al. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 31-58.

DEMIR, H. et al. Comparison of the effects of laser, ultrasound, and combined laser + ultrasound treatments in experimental tendon healing. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 35, p. 84-89, 2004.

DI FIORE, M. S. H. **Atlas de histologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

DRAPER, D.O.; SCHULTHIES, S.; SORNISTO, P.; HAUTALA, A. M. Temperature changes in deep muscles of humans during ice and ultrasound therapies: an in vivo study. **J Orthop Sports Phys Ther** v.21, p.153-157, 1995.

DUCK, F. A. Medical and non-medical protection standards for ultrasound and infrasound. Review. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 93, p. 176-191, 2007. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 18 maio 2009.

DYCE, S. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

DYSON, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physioterapy**, London, v. 73, n. 3, p. 116-120, mar. 1987.

DYSON, M. et al. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. **Clin. Sci.**, London, v. 35, n. 2, p. 273-285, 1968.

EMING, S. et al. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. **Semin Cell Dev Biol**. Disponível em: <doi:10.1016/j.semcdb.2009.04.009>. Acesso em: 10 maio 2009.

EMING, S.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 514-525, 2007. Disponível em: <doi:10.1038/sj.jid.5700701.2009,04,09>. Acesso em: 10 maio 2009.

EMSEN, I. M. The effect of ultrasound on flap survival: an experimental study in rats. **Burns**, v. 33, p. 369-371, 2007. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/burns>. Acesso em: 20 dez. 2008.

ENWEKA, C. S. The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study. **American Journal Physical Rehabilitation**, v. 68, n. 6, p. 283-287, 1989.

ENWEKA, C. S.; RODRIGUEZ, O.; MENDOSA, S. The biomechanical effects of low intensity ultrasound on healing tendons. **Ultrasound Medicine and Biological**, v. 16, n. 8, p. 801-807, 1990.

FAGANELLO, F. **Ação do Ultra-som terapêutico ao processo de regeneração do músculo esquelético**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Rio Claro, 2003. Disponível em: <www.bibliotecaunesp.br/bibliotecadigital/document/get.php/1367/faganello_fr_me_r_dapdf>. Acesso em: 16 ago. 2007.

FERNANDES, M. A. L.; ALVES, G. E. S.; SOUZA, J. C. A.; Efeito do ultra-som terapêutico em tendinite experimental de eqüinos: estudo clínico, ultra-sonográfico e histopatológico de dois protocolos. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v. 55, n. 1, p. 27-34, fev. 2003. Disponível em: <www.scielo.br/cgi-bin/wxis.exe/ieah/>. Acesso em: 21 jul. 2007.

FISHER, B. D.; HILLER, C. M.; RENNIE, S. G. A. A comparison of continuous ultrasound and pulsed ultrasound on soft tissue injury markers in the rat. **J Phys Ther Sci.**, v. 15, n. 1, p. 65-70, 2003.

FRANCO, A. Análise do efeito do ultra-som no edema inflamatório agudo. **Fisioterapia Movimento**, v. 18, n. 2. p. 19-24, 2005.

FRENKEL, V.; KIMMEL, E.; IGER, Y. Ultrasound- induced cavitation damage to external ephitelia of fish skin. **Ultrasound in Med & Biol.** v.25, n.8, p. 1295- 1303, 1999.

FYFE, M. C.; CHAHL, L. A. Mast cell degranulation: a possible mechanism of action of therapeutic ultrasound, **Ultrasound in Med. & Biol.** v.8, n.1 p.62, 1982.

GAN, B. S. et al. The effects of ultrasound treatment on flexor tendon healing in the chicken, **Journal Hand gery Sur**, v. 20, n. 6, p. 809-814, 1995.

GARAVELLO, I. et al. Efeitos térmicos do ultra-som terapêutico sobre os tecidos ósseo e muscular e sobre placa metálica implantada. **Rev Brás Ortop.**, v. 32, n. 6, jun. 1997.

GARTNER, L. P.; HIATT, J.L. **Atlas colorido de histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GOGIA, P. **Feridas, tratamento e cicatrização**. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

GONÇALVES, A. et al. Can therapeutic ultrasound influence the integration of skin grafts. **Ultrasound in Med. & Biol.**, v. 33, n. 9, p. 1406-1412, 2007. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 22 jul. 2008.

GRAF, R.; AERSWALD, A.; NORONHA, L. Full-face laser resurfacing and rhytidectomy. **Acta Cir. Brás.**, v. 23, p. 101-106, 1999.

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

GUIRRO, R.; FERREIRA, A L.; GUIRRO, E.C. Os efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial. Estudo experimental em ratos. **Revista Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 4, p. 37-47, 1995.

HAJJAR, K.; DEORA, A. New concepts in fibrinolysis and angiogenesis, **Curr. Atheroscler Rep**, v. 2, n. 5, p. 417-421, 2000.

HARVEY, W.; DYSON, M.; POND, J. The Stimulation of protein synthesis in human fibroblast by therapeutic ultrasound. **Rheumatology and Rehabilitation**, v. 14, p. 237, 1975.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HOOGLAND, R. **Terapia ultrasonica**. Espanha: Enraf-Nonius Delft, 1986.

HSIEH, Y. L. Reduction in Induced Pain by Ultrasound May caused by altered Expression of Spinal Neuronal Nitric Oxide Synthase-Producing Neurons. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 86, p. 1311-1317, 2005.

HUYS, S.; GAN, B. S.; SHEREBRIN, M. Comparison of effects of early and late ultrasound treatment on tendon healing in the chicken limb. **J. Hand Ther** v.6, p. 58-59, 1993.

IRION, G. **Feridas, novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

JOHNS, L. D. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. **J. AthlTrain** v.37, n.3, p.293-299, 2002. JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J. **Histologia básica texto/atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia e biologia celular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KARNES, J. L.; BURTON, H. W. Continuous therapeutic ultrasound accelerate repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. **Arc Phys Med Rehabil**, v. 83, p. 1-4, 2002.

KEDE, M.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 2004.

KIERSNZE, A. **Histologia e biologia celular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10. ed. São Paulo: Manole, 1996.

LEESON, T. S.; LEESON, C. R. **Histologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1970.

LEHMAM, J. F.; DELATEUR, B. J. **Therapeutic Heat and Cold**, Williams and Wilkins, Baltimore, 1982.

LEUNG, M. C.; NG, G.; YIP, K. K. Effect of ultrasound on acute inflammation of transected medial collateral ligaments. **Arch Phys. Med. Reab.**, v. 85, p. 963- 966, 2004.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 9-18, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X06001386>>. Acesso em: 10 maio 2009.

LOBATO, R.; NAZZER, N. **Efeitos do ultrassom terapêutico na prevenção de aderências tendinosas**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

LOPES, L. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 1999.

LOPES, L. et al. Análise morfométrica do tecido muscular de coelhos submetidos ao ultra-som pulsado e contínuo de 1MHz. **Fisioterapia Pesquisa**, v. 12, n. 3, p. 15-21, 2005.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia explicada**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2001.

LUFT, J. H. Improvements in epoxi resin embedding methods. **Journal Biophysica Biochem Cytology**, New York, v. 9, p. 409-414, 1961.

MACEDO, A. Um dispositivo prático para avaliar a potência ultra-sônica terapêutica. **Fisioterapia Movimento**, v. 18, n. 3, p. 11-21, 2005.

MACHADO, C. M. Ultra-som. In: **Eletroterapia prática**. 2. ed. São Paulo: Pancast, 1991. p. 143.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos. **An. Brás. Dermatol.**, v. 78, n. 4, jul./ago. 2003.

MARCHIONNI, A. et al. Influência do Meloxicam e da Dexametasona no processo inflamatório no reparo tecidual. **Revista Odonto Ciência-Fac.Odonto/PUCRS**, v. 21, n. 51, jan./mar. 2006.

MATHEUS, J. P. C. et al. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. **Rev. Bras. Fisioter.**, v. 12, n. 3, p. 241-247, 2008.

MAXWELL, L. Therapeutics ultrasound: its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. **Physiotherapy**, v. 78, n. 6, p. 421-426, 1992.

MCDIARMID, T.; ZISKIN, M. C.; MICHLOVITZ, S. L. **Therapeutic ultrasound**. Philadelphia: F. A. Davis Co., 3 ed., 1996.

MENDONÇA, A. et al. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre cicatriz por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta Ortopédica Brasil**, v. 14, n. 3, 2006.

MORISCOT, A. S.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. A. **Histologia para fisioterapia e outras áreas da reabilitação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

MORTIMER, A. J.; DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 14, n. 6, 1988.

MÜLLER-DECKER, K. et al. The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin. **Journaul Invest Dermatol.**, v. 119, n. 5, p. 1189-1195, 2002.

NG, G. Y. F.; FUNG, D. T. C. The effect of therapeutic ultrasound intensity on the ultrastuctural morphology of tendon repair. **Ultrasound in Med & Biol**. V.33, n.11, p. 1750-1754, 2007.

NUSSBAUM, E. L. Ultrasound: to heat or not to heart-that is the question. **Phys. Ther. Rev.**, v. 2, p. 59-72, 1997.

NUSSBAUM, E. L. The influence of ultrasound on healing tissues. **J. Hand Ther.** V1. n2. p. 140-147, 1998.

OLIVEIRA, E. **Patologia geral dirigida a cursos paramédicos**. Rio de Janeiro: Revinter, 1994.

OLIVEIRA, R. F. et al. Assessment of fibroblast cells submitted to ultrasonic irradiation. **Cell Biol Int.**, v. 32, p. 1329-1335, 2008.

OLSSON, D. et al. Estimulação pulsada e contínua no processo cicatricial de ratos submetidos a celiotomia. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, 2006.

PEREIRA, F. **Eletroterapia sem mistério**. 3. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007.

POLACOW, M. L. O. et al. Efeito do ultra-som e do D-Pantenol na Regeneração Tegumentar. **Rev. Bras. Fisioter.**, v. 9, n. 3, p. 365-371, 2005.

PRENTICE, W. **Técnicas de reabilitação em medicina esportiva**. São Paulo: Manole, 2002.

PRENTICE, W.; QUILLEN, W.; UNDERWOOD, F. **Modalidades terapêuticas para fisioterapeutas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

RANG, H. P. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROBERTSON, V. J. Dosage and treatment response response in randomised clinical trials of therapeutic ultrasound. **Phys. Ther. Sport**, v. 3, p. 124-133, 2002. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 20 jun. 2008.

ROBINSON, A; SNYDER-MACKLER, L. **Eletrofisiologia clínica eletroterapia e teste fisiológico**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

RODRIGUES, E.; GUIMARÃES, C. **Manual de recursos fisioterapêuticos**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.

ROWETT, H. **Dissections Guides The Rat**. New York: Rinehart & Company. Inc, 1957.

SÁ, J. N. B.; PEREIRA, W. C. A.; KRÜGER, M. A. V. Estudo do padrão de aquecimento por ultra-som fisioterapêutico em phantom ultra-sônico com matriz de termopares. In: **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, São Pedro, 2008.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Transcriptional control of wound repair. **Annu. Rev. CellDev. Biol.**, v. 23, p. 69-92, 2007. Disponível em: <www.pubmedcentral.capes>. Acesso em: 05 mar. 2009.

SHUNG, K.; SMITH, M.; TSUI, B. **Principles of medical imaging academic press limited**, San Diego, California, USA, 1992.

SJÖSTRAND, F. Common sense in electron microscopy about osmium fixation. **Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research**, v. 102, n. 1, p. 8, 1989.

SNELL, R. **Histologia clínica**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985.

SORIANO, M.; PÉREZ, S.; BAQUÉS, M. **Teoria e prática para a utilização de correntes em estética**. Sant Quirze Del Vallès: SOR International, 2003.

STARKEY, C. **Recursos terapêuticos em fisioterapia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. **Histologia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996.

TER HAAR, G. Princípios eletrofísicos. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, 2001.

TER HAAR, G. Therapeutic applications of ultrasound. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 93, p. 111-129, 2007. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 20 maio 2009.

TER HAAR, G. Therapeutic ultrasound. **Eur. J. Ultrasound**, v. 9, p. 3-9, 1999. Disponível em: <www.pubmedcentral.com>. Acesso em: 05 mar. 2008.

TER HAAR, G.; BARNETT, S. B.; ZISKIN, M. C. Current status of research on biophysical effects of ultrasound. **Ultrasound in Med. e Biol.**, v. 20, n. 3, p. 205-218, 1994.

TIPLER, P. **Física para cientistas e engenheiros – Gravitação, ondas e termodinâmica**. 3. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1991.

TORISEVA, M; KÄHÄRI, V. M.; Review proteinases in cutaneous wound healing. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 203-224, 2009. Disponível em: <www.pubmedcentral.com>. Acesso em: 21 maio 2009.

UZUNIAN, A.; BIRNER, E. **Biologia**. São Paulo: HARBRA, 2001.

WARD, A.R. **Electricity, Fields and Waves in Therapy**. Marrickville, Australia: Science Press, 1980.

WARDEN, S. J. et al. Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound in the prevention of osteoporosis following spinal cord injury. **Bone**, v. 2, n. 51, p. 431-436, 2001.

WARREN, L.; ERNEST, J.; SENNA, J. **Microbiologia médica e imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journals Biophysical, Biochemi, Cytology**, v. 4, n. 4, p. 475-478, 1958.

WATSON, T. Electrotherapy and tissue repair. **Sportex-Medicine**, v. 29, p. 7-13, 2006.

WATSON, T. Estimulação elétrica para a cicatrização de feridas: uma revisão do conhecimento atual. In: KITCHEN, S., BAZIN, S. **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11. ed. São Paulo: Manole, 2003.

WATSON, T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. **Ultrasonics**, v. 48, p. 321-329, 2008. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 17 maio 2009.

WAYNFORTH, H.; FLECKNELL, P. **Experimental and surgical technique in the rat**. 2. ed. San Diego: Academic Press Limited, 1992.

WELLS, P. N. T. **Biomedical ultrasonics**. London: Academic Press, 1977.

WILLIAMS, R. Production and transmission of ultrasound. **Physioterapy**, v. 73, p. 113-116, 1987.

WINTER, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, p. 193-293, 1962.

YOUNG, S. Reparo dos tecidos. In: Kitchen, S.; Bazin, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, 1998.

YOUNG, S. R.; DYSON, M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full thickness excised skin lesions. **Ultrasonics** v.28, n.3, p.175-180, 1990.

ZHOU, S.; BACHEM, M. G. et al. Low intensity pulsed ultrasound accelerates macrophage phagocytosis by a pathway that requires actin polymerization, Rho, and Src/ MAPKs activity. **Cellular Signalling** v.20, p.695-704, 2008. Disponível em: www.elsevier/locate/cellsig Acesso em: 03/02/2009.

ZISKIN, M. C.; MCDIARMID, T.; MICHLOVITZ, S. L. Therapeutic ultrasound. In: MICKLOVITZ, S. L. **Thermal agents in rehabilitation**. Philadelphia: FA Davis, 1990. p. 134-69.