**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ADRIANA DA SILVA FERREIRA

Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos, mediante avaliação por planimetria.

**São Paulo
2005**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ADRIANA DA SILVA FERREIRA

Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos, mediante avaliação por planimetria.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, opção Reabilitação.

Área de Concentração: Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor.

Orientador: Prof.º Dr.º. Claudio Henrique Barbieri.

**São Paulo
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Adriana

Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos, mediante a avaliação por planimetria. Ribeirão Preto, 2006.

74 p. : il. ; 1,5cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biomecânica, Medicina e Reabilitação.

Orientador: Barbieri, Cláudio Henrique.

1. Lesões cutâneas totais. 2. Ultra-som de baixa intensidade. 3. Cicatrização por segunda intenção. 4. Planimetria.

*Desconheço fato mais encorajador que a
habilidade inquestionável do homem para
melhorar sua vida através do esforço
consciente.*

Henry David Thoreau

*Dedico este trabalho a toda a minha família que me incentivou e me auxiliou em todos os momentos. Em especial aos meus pais, **Pedro e Benedita** por uma vida de amor e dedicação.*

Ao Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri,
*meus sinceros agradecimentos pela
orientação segura, credibilidade e
confiança dispensados a mim durante
esse tempo.*

AGRADECIMENTOS

*Ao meu esposo **Egno**, pela amizade, estímulo e incentivo no meu crescimento profissional e pessoal.*

*Às minhas irmãs, **Valéria e Renata** e ao meu cunhado **Wilson**, pelo carinho e amizade.*

*Aos meus tios **Aparecida e Geraldo (in memorian)**, pelo carinho e constante presença em minha vida.*

*À amiga **Dra. Adriana Clemente Mendonça**, pelo auxílio em todas as etapas do trabalho.*

*Ao prof. **Dr. Antonio Dorival Campos**, do departamento de Medicina Social, pela indicação dos testes estatísticos aplicados no experimento. E ao colega **Sidnei**, pela atenção prestada durante a elaboração dos gráficos.*

*Ao prof. **Dr. Adilson Gonzaga** e ao colega **Ricardo Rubin** do departamento de Engenharia Elétrica de São Carlos, pela elaboração do programa de imagens e presteza com que me receberam.*

*Às secretárias da Bioengenharia (São Carlos e Ribeirão Preto); **Janete** e em especial a **Terezinha**, pela atenção e carinho que sempre me recebeu.*

*Aos técnicos do laboratório da Bioengenharia, **Francisco e Luis Henrique**, pelo auxílio com os animais nos procedimentos cirúrgicos.*

*Ao **Prof. Dr. Shimano** do departamento de Bioengenharia, pelas orientações e sugestões prestadas durante o início da pós-graduação.*

*Às secretárias do departamento de Biomecânica, **Elizângela, Viviane** e em especial à **Fátima**, pela valiosa, prestativa e paciente colaboração.*

*À Prof. **Cristina**, bibliotecária, pela revisão bibliográfica realizada. E a minha irmã **Renata** pelos auxílios prestados nesta etapa.*

*Aos colegas do curso de Fisioterapia da Fafibe – Bebedouro, em especial à coordenação, **Dra. Elaine Leonezi**, pela compreensão e apoio, e a **Dra. Josimari Melo** pelo auxílio prestado na elaboração dos resultados.*

*Aos Professores **Dr. Murilo Antônio Rocha** e **Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan** pela presteza com que me receberam e sugestões feitas.*

À todos os amigos que me ajudaram a acreditar neste sonho.

OBRIGADA

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	III
LISTA DE SÍMBOLOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Sistema tegumentar	3
2.1.1 Epiderme	4
2.1.2 Derme	6
2.1.3 Anexos cutâneos	8
2.1.4 Hipoderme	9
2.2 Reparo dos tecidos	10
2.2.1 Fase inflamatória	11
2.2.2 Fase proliferativa	12
2.2.3 Fase de remodelagem	14
3 O ULTRA-SOM	16
3.1 Mecanismo de interação com os tecidos biológicos	17
3.1.1 Mecanismo térmico	18
3.1.2 Mecanismo não térmico	18
3.2 Ultra-som terapêutico no reparo do tegumento cutâneo	20
3.3 Ultra-som de baixa intensidade (USBI)	24
3.3.1 Estimulação da reparação / regeneração tecidual com o USBI	24
3.3.2 Estimulação do reparo do tegumento cutâneo com o USBI	26
4 USO DA PLANIMETRIA NA AVALIAÇÃO DA ÁREA DE FERIDAS CUTÂNEAS	29

5	OBJETIVO	32
6	MATERIAIS E MÉTODOS	33
6.1	Animais	33
6.2	Procedimento operatório	33
6.3	Equipamento de ultra-som	38
6.4	Tratamento	40
6.5	Avaliação dos resultados	42
6.5.1	Registro da área da lesão	42
6.5.2	Processamento das imagens pela visão computacional	44
6.6	Análise estatística	46
7	RESULTADOS	47
8	DISCUSSÃO.....	53
9	CONCLUSÕES	61
10	REFERÊNCIAS	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Preparação do local operatório	34
FIGURA 2	Punch utilizado para produzir a lesão	36
FIGURA 3	A lesão circular produzida	37
FIGURA 4	Equipamento de ultra-som	39
FIGURA 5	Aplicação do ultra-som	41
FIGURA 6	Obtenção do decalque da lesão	43
FIGURA 7	Seqüência do processamento digital de imagem para cálculo da área da lesão.....	45
FIGURA 8	Comparação da área de lesão entre os grupos controle e irradiado no 1º e 3º dias de lesão (sub-grupos A, 3 dias)	49
FIGURA 9	Comparação da área de lesão entre os grupos controle e irradiado no 1º e 7º dias de lesão (sub-grupos B, 7 dias)	50
FIGURA 10	Comparação da área de lesão entre os grupos controle e Irradiado no 1º e 14º dias de lesão (sub-grupos C, 14 dias)	51
FIGURA 11	Gráfico da evolução da área cicatrizada nos grupos 1 (Controle) e 2 (Irradiado) e seus subgrupos A (3 dias), B (7 dias) e C (14 dias)	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Valores das áreas da lesão no 1º e 3º dias, em milímetros, e respectivas diferenças nos sub-grupos 1A e 2A.....	49
TABELA 2 Valores das áreas da lesão no 1º e 7º dias, em milímetros, e respectivas diferenças nos sub-grupos 1B e 2B.....	50
TABELA 3 Valores das áreas da lesão no 1º e 14º dias, em milímetros, e respectivas diferenças nos sub-grupos 1C e 2C.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
Et al	e Colaboradores
SATA	Spatial Avarage and Temporal Avarage
US	Ultra-som
UST	Ultra-som terapêutico
USBI	Ultra-som de baixa intensidade
USP	Universidade de São Paulo
ERA	Área de irradiação efetiva

LISTA DE SÍMBOLOS

cm²	Centímetro ao quadrado (unidade de medida de área)
W	Watts (unidade de medida de potência)
W/ cm²	Watts por centímetro ao quadrado (quantidade de energia por unidade de área em uma unidade de tempo)
mW	Miliwatts (quantidade de energia por unidade de área em uma unidade de tempo)
Hz	Hertz (unidade de medida de frequência)
KHz	Kilohertz (unidade de medidade freqüência igual a mil hertz)
MHz	Megahertz (unidade de medidade freqüência igual a um milhão de hertz)

RESUMO

Ferreira, S.F. **Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos, mediante avaliação por planimetria.** 2005. 74f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Foram avaliados os efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização de lesão cutânea produzida na região dorsal de ratos. Utilizamos 60 ratos machos (Wistar, peso médio de 300g) divididos em dois grupos de acordo com o tratamento, sendo: 1) irradiação simulada (controle); 2) irradiação efetiva (irradiado) Freqüência fundamental de 1,5MHz, freqüência de repetição de pulsos de 1KHz, largura de pulso de 200 μ s, intensidade de 30mW/cm² (SATA), 10 minutos de aplicação em dias alternados). Cada grupo foi subdividido em três grupos, de acordo com o período de irradiação ultrasônica; 3, 7 e 14 dias, e a cicatrização foi avaliada através de análise planimétrica. Aumento significativo ($p<0,05$) da área cicatrizada foi observado no Grupo 2 ($141,88\pm18,50$ mm²) em relação ao Grupo 1 ($117,38\pm15,14$ mm²), no 14^o dia. Não foram observadas diferenças entre os grupos nos outros tempos experimentais estudados. Concluiu-se que o ultra-som pulsado de baixa intensidade não apresenta efeitos deletérios e estimula moderadamente a cicatrização cutânea por segunda intenção em condições experimentais, com potencial para aplicação clínica em humanos. Ainda, a planimetria, como método de acompanhamento da evolução da lesão cutânea, mostrou-se adequada e eficaz.

Palavras-chaves: lesões cutâneas totais; ultra-som de baixa intensidade; cicatrização por segunda intenção, planimetria.

ABSTRACT

Ferreira, S.F. **Effects of low intensity pulsed ultrasound irradiation on the secondary healing of a round shaped total skin lesion in rats, assessed by means of planimetry.** 2005. 74f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The effects of low intensity pulsed ultrasound irradiation on the secondary healing of a round shaped (1 cm in diameter) total skin lesion, produced on the dorsal region of rats, were studied. Sixty male Wistar rats weighing 300 g on average were used and divided into two groups of 30 animals each, according to treatment: Group 1, simulated irradiation (control); Group 2, effective irradiation (irradiated). 1.5 MHz fundamental frequency, 1 KHz pulse repetition frequency, 200 μ s pulse width, 30mW/cm² intensity (SATA), 10 minutes application in alternate days). Each group was divided into three subgroups: 3, 7 and 14 days, according to the postoperative period of ultrasound irradiation, and healing was evaluated by means of planimetry. The healed area was significantly increased ($p < 0.05$) in Group 2 (141.88 ± 18.50 mm²) as compared to Group 1 (117.38 ± 15.14 mm²) on the 14th day. No differences were observed between subgroups for the other experimental periods. The author conclude that low intensity pulsed ultrasound irradiation presented virtually no deleterious effect and moderately stimulated secondary healing of total skin lesions in the experimental conditions of this investigation, with potential for clinical application in similar situations in humans. Also, planimetry showed to be effective method in evaluating the healing of skin lesions.

Key words: total skin lesion; low intensity ultrasound; secondary healing, planimetry.

1. INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização ocorre para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido, de forma que o organismo lança mão de um complexo mecanismo que envolve: quimiotaxia, divisão celular, neovascularização, síntese de matriz protéica extra-celular e remodelação da cicatriz.

A contração da ferida é uma etapa importante do fechamento da lesão cutânea nos animais cujo tegumento está frouxamente conectada aos tecidos subjacentes, como os coelhos e ratos, raramente levando à perda da função desses tecidos. Entretanto, em humanos, uma contração demasiadamente pequena retarda o fechamento, permitindo sangramentos e infecções, ao passo que uma contração extensa pode levar a contraturas teciduais, com conseqüentes deformidades e disfunção. Todavia, isoladamente, a contração de uma ferida raramente é capaz de levar ao seu fechamento definitivo, o qual se deve principalmente à formação do tecido de granulação e a re-epitelização (ANASTÁCIO, 2000; ARAÚJO, 1997; KITCHEN e YOUNG, 1998). A possibilidade de acelerar a cicatrização e o fechamento de lesões cutâneas, através de recursos químico-medicamentosos ou físicos, tem sido objeto de investigação de inúmeros pesquisadores; o sucesso dessas pesquisas seria muito desejável e altamente benéfico para uma vasta população de portadores de úlceras e lesões cutâneas dos mais diversos tipos.

Estudos recentes têm demonstrado efeitos benéficos com o ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização de diversos tecidos biológicos, como o osso (DUARTE; XAVIER, 1983), o músculo (GUIRRO e GUIRRO, 1995; BASSOLI, 2001) e a pele (ALVES, 1988; ANASTÁCIO, 2000; HILÁRIO, 1993). Tais efeitos seriam de grande relevância, por exemplo, no tratamento de úlceras cutâneas crônicas, nas quais já tem sido demonstrado o aumento da velocidade de cicatrização, a diminuição do

número de células inflamatórias e a melhora da qualidade do tecido neoformado, sobretudo em trabalhos de investigação clínica (ANASTÁCIO, 2000; HILÁRIO, 1993; PESCHEN et al., 1997).

Considerando o pequeno número de estudos controlados sobre o tema, propôs-se o presente trabalho para verificar os efeitos da irradiação ultra-sônica de baixa intensidade por planimetria sobre a cicatrização cutânea, com a hipótese de que esse tratamento pode acelerar o processo de cicatrização.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. SISTEMA TEGUMENTAR

A pele é um órgão complexo, resistente e flexível que envolve todo o corpo, respondendo por mais de 15% do peso corporal e constituindo-se “em complexa estrutura de tecidos de várias naturezas, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se, de maneira harmônica, ao desempenho de suas funções” (SAMPAIO e RIVITTI, 2001, p. 03).

O tegumento cutâneo recobre toda a superfície do corpo e é constituído por duas camadas: 1) a epiderme, camada superficial, é um epitélio de revestimento estratificado e pavimentoso, possuindo várias camadas de células que vão se achatando à medida que se tornam mais superficiais; 2) a derme, camada mais profunda, é constituída por tecido conjuntivo, diversos tipos de células separadas por abundante material intercelular, fibras do conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e folículos pilo-sebáceos e glândulas sudoríparas. Abaixo da derme está a hipoderme, ou tela subcutânea, que não faz parte da pele, compondo-se de tecido adiposo e servindo de suporte e união da derme com os órgãos subjacentes (CUCÉ e FESTA NETO, 2001; SAMPAIO e RIVITTI, 2001 ; GUIRRO e GUIRRO, 2002).

A pele apresenta múltiplas funções: barreira contra agressões exógenas, impermeabilização, órgão sensorial e de comunicação com o meio externo, defesa imunológica, síntese de vitamina D, regulação da temperatura corpórea, excreção e absorção, dentre outros (CUCÉ e FESTA NETO, 2001; SAMPAIO e RIVITTI, 2001 ; KEDE e SABATOVICH, 2004).

2.1.1. EPIDERME

De acordo com Sampaio e Rivitti (2001) os queratinócitos, nos seus vários estágios de diferenciação, irão compor a epiderme, na qual se reconhecem distintas camadas celulares. A epiderme é constituída essencialmente de células epiteliais que proliferam continuamente e promovem contínua renovação celular, graças à intensa atividade mitótica. As células neoformadas são empurradas em direção à superfície, sofrendo modificações da estrutura pela diferenciação celular, com alterações morfológicas nesta progressão, vindo a constituir as demais camadas.

A epiderme é avascular, e todos os nutrientes necessários à sua proliferação e diferenciação derivam dos capilares dérmicos (CUCÉ e FESTA NETO, 2001; KEDE e SABATOVICH, 2004).

As camadas da epiderme são as seguintes:

Camada germinativa ou basal: As células basais têm forma cilíndrica, apresentam citoplasma basófilo e núcleos grandes, alongados e ovais. As células basais são formadas por células jovens em multiplicação constante, estão unidas entre si e às células espinhosas suprajacentes, e estas entre si, através das chamadas pontes intercelulares chamadas desmossomas, os quais também dão suporte ao epitélio.

Os melanócitos são células presentes na camada basal, de natureza dendrítica, com numerosos prolongamentos longos e ramificados, que se relacionam com as células espinhosas suprajacentes. Contêm no seu citoplasma organelas especializadas, denominadas melanossomas, onde ocorre a síntese e deposição da melanina que distribuindo-se no interior dos queratinócitos confere a cor ao indivíduo. (SAMPAIO e RIVITTI, 2001; CUCÉ e FESTA NETO, 2001; GUIRRO e GUIRRO, 2002; KEDE e SABATOVICH, 2004).

Além dos melanócitos existem outras células dentríticas na epiderme, as chamadas células de Langerhans, com função imunológica, atuando no processamento primário de antígenos exógenos que atingem a pele, e as células de Merckel, que estão associadas a filamentos terminais de nervos cutâneos e parecem desempenhar um papel na sensibilidade (GAWKRODGER, 2002; KEDE e SABATOVICH, 2004).

Camada espinhosa (malpighiano): Localizada logo acima da camada basal, apresenta de cinco a dez camadas de células maiores que as células basais, de formato poliédrico, citoplasma amplo e eosinófilico. Esta camada é assim denominada devido ao aspecto espinhoso que possui, o qual vai achatando-se progressivamente em direção à superfície. As células são separadas por espaços cruzados por finos filamentos, denominados pontes intercelulares, que se processam através dos desmossomas. (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

Camada granulosa: Suas células são mais achatadas, com os núcleos se desintegrando progressivamente. Têm de uma a três fileiras de células grandes, maiores do que as espinhosas, de formato losangular e citoplasma repleto de grânulos. Estes grânulos são de tamanho e forma irregulares e compõem-se de querato-hialina, já indicando a degeneração celular e queratinização dos epitélios (GUIRRO e GUIRRO, 2002).

Camada lúcida: Presente nas regiões palmo-plantares, compostas por duas ou três camadas de células achatadas, anucleadas e intimamente ligadas entre si (CUCÉ e NETO, 2001; SAMPAIO e RIVITTI, 2001; GUIRRO e GUIRRO, 2002).

Camada córnea: Tem espessura variável de acordo com a área anatômica, sendo formada por células epidérmicas anucleadas. Camada mais superficial da epiderme é formada por vários planos de células mortas e intimamente ligada e, desde que seu citoplasma tenha sido substituído por uma proteína fibrosa, a queratina, são referidas como células corneificadas (GUIRRO e GUIRRO, 2002). Constituem a

barreira de proteção às demais estruturas e ajudam a restringir a perda de água do organismo.

2.1.2. DERME

A derme é espessa, formada de tecido conjuntivo, com estrutura própria, sendo constituída basicamente de três camadas:

Superficial ou papilar: está composta por colágeno frouxamente entrelaçado (GAWKRODGER, 2002), fibras elásticas e reticulares, numerosos fibroblastos e abundante substância fundamental. A zona de contato derme-epiderme se dá através das papilas dérmicas (SAMPAIO e RIVITTI, 2001, CUCÉ e FESTA NETO, 2001). O sistema de vasos linfáticos se inicia nesta região e o suprimento sanguíneo é bastante rico.

Derme adventicial: tem a estrutura idêntica à da derme papilar, mas dispõe-se em torno dos folículos pilosos, das glândulas e dos vasos (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

Profunda ou reticular: é mais espessa e se estende até a hipoderme. É composta por feixes colágenos mais espessos e que se dispõem paralelamente à superfície (GAWKRODGER, 2002), apresentando menor quantidade de fibroblastos e de substância fundamental, em relação à derme adventícia.

Os fibroblastos são células típicas do tecido conjuntivo, sendo responsáveis pela síntese do colágeno, de mucopolissacarídeos e, também, das fibras elásticas (KEDE e SABATOVICH, 2004). No tecido conjuntivo adulto eles não se dividem com frequência; apenas entram em mitose quando ocorre uma solicitação como, p. e., nas lesões do tecido conjuntivo, sendo particularmente ativos nos processos de reparação do tegumento. Quando inativo, o fibroblasto é denominado de fibrócito (GUIRRO e GUIRRO, 2002).

As fibras colágenas compreendem 95% do tecido conectivo da derme (SAMPAIO e RIVITTI, 2001) e conferem às estruturas as propriedades de resistência e força. As fibras colágenas proporcionam a resistência dos ferimentos na fase de cicatrização, havendo um equilíbrio entre síntese e degradação, posto que são reabsorvidos durante o crescimento, a remodelação, a involução, a inflamação e o reparo dos tecidos (GUIRRO e GUIRRO, 2002).

As fibras elásticas estão frouxamente dispostas em todas as direções na derme e proporcionam elasticidade à pele. Elas cedem facilmente a trações mínimas, porém retornam facilmente à sua forma original, tão logo cessem as forças deformantes. A elastina é a proteína mais resistente do organismo, sendo encontrada em pequena quantidade na pele (GUIRRO e GUIRRO, 2002).

As fibras reticulares dispõem-se formando uma estrutura semelhante a uma rede, com fibras finas e inelásticas, constituídas de um tipo de colágeno denominado reticulina. Formam o arcabouço interno das glândulas.

Nos espaços interfibrilares, embebendo todas as estruturas, está a substância fundamental amorfa, composta por mucopolissacarídeos, dos quais os hialuronidatos e condroitinsulfatos são os mais importantes. Os mucopolissacarídeos são glicídeos de peso molecular elevado e proteínas, sendo a mais abundante o ácido hialurônico. Possuem característica de um gel viscoso que contribui para a resistência mecânica da pele às compressões e estiramentos (SAMPAIO e RIVITTI, 2001). Ao lado da substância fundamental, existe o líquido intersticial, que contém pequena quantidade de proteínas plasmáticas de pequeno peso molecular e que atravessa a parede dos capilares, graças à pressão hidrostática do sangue. A água presente no tecido conjuntivo origina-se do sangue, passando através das paredes dos capilares para os espaços intercelulares dos tecidos. Em condições normais a quantidade de líquido intersticial é insignificante (GUIRRO e GUIRRO, 2002).

A pele é um órgão densamente innervado, permitindo identificar os diferentes estímulos do ambiente; as sensações cutâneas são captadas por receptores especializados como os corpúsculos de Paccini (pressão), de Ruffini (calor), de Krause (frio) e de Meissner (sensações táteis) (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

Os vasos sanguíneos e linfáticos distribuem-se nos plexos profundo e superficial, interligados entre si. O plexo profundo situa-se entre a derme e a hipoderme, sendo formado por arteríolas, e o plexo superficial situa-se entre as camadas papilar e reticular, sendo formado por capilares. O sistema de vasos linfáticos inicia-se nas papilas dérmicas e desemboca num plexo linfático profundo, de localização dermo-hipodérmica (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

A musculatura da pele é predominantemente lisa e compreende os músculos eretores dos pêlos, o dartos do escroto e a musculatura da aréola mamária (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

2.1.3. ANEXOS CUTÂNEOS

A epiderme em formação origina os anexos cutâneos. Por proliferação celular, queratinócitos formam dois tipos de brotos que crescem aprofundando-se na derme e, por diferenciação celular progressiva, acabam por desenvolver as glândulas écrinas e os folículos pilossebáceos apócrinos (KEDE e SABINOVICH, 2004).

Glândulas sudoríparas écrinas: estão presentes em quase toda a extensão do revestimento cutâneo do corpo humano, mas o seu número varia em cada região, existindo em maior quantidade nas palmas das mãos, planta dos pés e axilas. A secreção sudoral écrina é incolor, inodora, hipotônica, composta de 99% de água e solutos encontrados no plasma, porém em concentrações menores, especialmente sódio, cloretos, potássio, uréia, proteínas, lípidos, aminoácidos, cálcio, fósforo e ferro (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

Glândulas sudoríparas apócrinas: desembocam, em geral, nos folículos pilossebáceos. Distribui-se na axila, na área perimamilar, na região anogenital e, modificados, no conduto auditivo externo, onde constituem as glândulas ceruminosas, nas pálpebras, onde constituem as glândulas de Moll, e na mama, onde formam as glândulas mamárias. As glândulas apócrinas secretam pequenas quantidades de secreção de aspecto leitoso, a intervalos longos de tempo. A secreção apócrina contém proteínas, açúcares, amônia e ácidos graxos (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

Aparelho pilossebáceo: as glândulas sebáceas estão presentes em toda a pele, à exceção das regiões palmares e plantares (CUCÉ e FESTA NETO, 2001; SAMPAIO e RIVITTI, 2001). O produto de sua atividade é o sebum. Apresenta função de lubrificação da pele e ligeira ação bactericida. Desembocam sempre no folículo pilossebáceo, com ou sem pelo. (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

Pelos: originam-se de uma invaginação da epiderme, o folículo piloso. Visíveis externamente apenas pela sua haste, estão distribuídos por toda a superfície cutânea, exceto nas regiões palmo-plantares. Os pelos não crescem continuamente; exibem atividade cíclica, havendo alternâncias de fases de crescimento e repouso (CUCÉ e FESTA NETO, 2001; SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

Unhas: recobrimo as últimas falanges, com a camada externa intensamente corneificadas, a unha cresce a partir de uma matriz de células situadas junto a sua raiz (CUCÉ e FESTA NETO, 2001).

2.1.4. HIPODERME

É o tecido sobre o qual a pele repousa, sendo de espessura variável e composto de células adiposas, arredondadas e grandes, que contém grande quantidade de lipídeos em seu citoplasma e distribuem-se em lóbulos subdivididos por

traves conjuntivo-vasculares. Conecta-se frouxamente à pele e à fáscia dos músculos subjacentes, o que permite aos músculos contraírem-se sem repuxar a pele.

Funcionalmente, a hipoderme serve como reservatório energético, participa do isolamento térmico e da proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

2.2. REPARO DOS TECIDOS

A cicatrização de feridas é um evento complexo, que envolve a interação de diversos componentes celulares e bioquímicos. O conhecimento dos eventos fisiológicos através dos quais se processa a cicatrização das feridas é de grande importância.

Ferida é uma solução de continuidade em um tecido que anteriormente encontrava-se íntegro; uma vez que essa solução de continuidade não representa uma condição normal, o organismo tenta reparar o defeito criando um tecido que funciona como um elo de ligação entre as duas bordas afastadas, a cicatriz, cuja principal função é a de reconstituir os tecidos da forma mais fisiológica (ARAÚJO, 1997).

O fechamento da ferida pode ser por primeira intenção, ou cicatrização primária, que designa o processo através do qual uma ferida limpa é imediatamente reaproximada ou suturada, demandando um tempo mínimo para seu fechamento. Feridas extensas demandam uma reposição tecidual maciça, com estímulo máximo das respostas fisiológicas e formação de tecido de granulação e, depois, re-epitelização e contração da ferida, fenômeno denominado de cicatrização por segunda intenção, ou secundária. Quando o processo pelo qual uma ferida é temporariamente mantida aberta, sendo fechada mais tarde, usualmente quatro a sete dias, com

aproximação ou sutura, é denominado de fechamento por terceira intenção, ou terciário (SIMÕES, 1988; LAWRENCE, 1995; ARAÚJO, 1997; GONÇALVES e PARIZOTTO, 1998).

Os diversos estágios da reparação tecidual envolvem uma seqüência ordenada de sinais bioquímicos e respostas celulares altamente reguladas, sendo comum a todos os tipos de tecidos do organismo (KITCHEN e YOUNG, 1998) e podendo ser dividido em três fases, que se sobrepõem: 1) Inflamação, 2) Proliferação, 3) Remodelagem.

2.2.1 Fase inflamatória

Inflamação é a resposta imediata a uma lesão, cujos sinais cardeais externos são o rubor, tumor, calor, dor e perda de função. A fase aguda ou inicial da inflamação se prolonga por 24 a 48 horas, seguida por uma fase subaguda ou tardia, que se prolonga por mais 10 a 14 horas (KITCHEN e YOUNG, 1998). A finalidade fundamental da fase inflamatória é livrar a área de tecido morto e secreções provocados pela lesão tecidual, no qual diversos mediadores bioquímicos são liberados tão logo ocorre a destruição de células na ferida. A presença dos mediadores químicos no local da inflamação é transitória, sendo os mais importantes a histamina, a serotonina, a bradicinina e as prostaglandinas (KLEIMAN e SIMÕES; GOLDENBERG, 1987).

A reação vascular local é caracterizada, inicialmente, por uma vasoconstrição, que previne a perda sanguínea ou de líquidos corporais, durando de alguns segundos a poucos minutos (GONÇALVES e PARIZOTTO, 1998; KITCHEN e YOUNG, 1998; SIMÕES, 1988). Segue-se, então, uma vasodilatação, com aumento da permeabilidade capilar, causada por agentes como a bradicinina e a histamina, levando a uma separação reversível entre as células endoteliais que permite a saída

dos fluídos e macromoléculas para o interstício, juntamente com leucócitos, responsáveis pela fagocitose e, uma pequena parte, pela resposta imune mediada por células (BEVILACQUA et al., 1981).

As plaquetas promovem a coagulação sanguínea e liberam fatores químicos (fatores de crescimento derivados das plaquetas) que iniciam e controlam o processo de cicatrização. O espaço da ferida é, então, preenchido por exsudato inflamatório e pela rica rede de fibrina do coágulo, que servirá como substrato para a proliferação dos fibroblastos. Contudo, tanto a fibrina como os leucócitos são posteriormente fagocitados e todo o líquido formado é reabsorvido, encerrando assim a reação inflamatória inicial, ou seja, a resolução do exsudato (BEVILACQUA et al., 1981).

Os neutrófilos e os monócitos são as primeiras células a chegar ao local da lesão. A principal ação dos neutrófilos é a fagocitose de partículas antigênicas e de corpos estranhos, ocorrendo a liberação de proteases e collagenases que dão início, respectivamente, à lise das proteínas e do colágeno necrosados. Os monócitos, que se infiltram mais tardiamente, diferenciam-se em macrófagos, que são essenciais no processo de cicatrização tissular, fagocitando microorganismos patogênicos e os restos teciduais e celulares, inclusive os neutrófilos, e liberando collagenases e proteoglicanos, que são enzimas degradantes que destroem o material necrosado, orientam a formação de tecido de granulação e atraem para a área os fibroblastos que depositam o novo colágeno. Nas primeiras 24 horas após a lesão, há um grande afluxo de neutrófilos para a ferida, seguindo-se de um aporte maior de macrófagos durante os dois a três dias seguintes (ARAÚJO, 1997; KITCHEN e YOUNG, 1998).

2.2.2 Fase proliferativa

Inicia-se por volta do terceiro dia, persistindo por duas a três semanas e se constitui no início da formação de tecido de granulação, o qual precede o

desenvolvimento do tecido cicatricial maduro, constituído de uma neomatriz, neo-vasculatura, macrófagos e fibroblastos. Fibroplasia é um termo que envolve os processos de proliferação e migração dos fibroblastos e o desenvolvimento das matrizes colagenosas e não-colagenosas. Assim que chegam à ferida, os fibroblastos passam a sintetizar ácido hialurônico, fibronectina e colágenos dos tipos I e III, que formam a matriz extracelular inicial. Os tipos de colágeno no interior de uma ferida e suas quantidades são gradualmente modificados com o tempo; o colágeno do tipo III (embrionário) é gradualmente absorvido e substituído pelo colágeno do tipo I, que é o colágeno fibrilar maduro, acompanhado pela deposição de proteoglicanos (KLEIMAN, SIMÕES e GOLDBERG, 1987; SIMÕES, 1988; KITCHEN e YOUNG, 1998).

O ácido hialurônico parece facilitar a mobilidade celular, em virtude de sua grande camada aquosa ou de hidratação, a fibronectina facilita a união e a migração celular e os proteoglicanos contribuem para a elasticidade dos tecidos e para a migração celular (KITCHEN e YOUNG, 1998). O colágeno é o material responsável pela força e integridade de todos os tecidos, havendo um equilíbrio entre síntese e degradação nos tecidos sãos. Na pele lesada, as taxas de síntese e degradação se alteram de maneira seqüencial; o colágeno é sintetizado, forma ligações cruzadas e, depois, é depositado na região cicatricial, de onde é posteriormente removido, no processo de remodelação da cicatriz, que não deve ser excessiva (KLEIMAN, SIMÕES e GOLDBERG, 1987; GONÇALVES e PARIZOTTO, 1998).

Deve-se ressaltar que para se tornarem metabolicamente ativos e facilitarem a síntese do colágeno, os fibroblastos dependem de adequado suprimento de oxigênio e da neo-vascularização (SIMÕES, 1988). A neo-angiogênese, é uma resposta complexa mediada por vários estímulos durante a fase inflamatória, fazendo com que as feridas em cicatrização por segunda intenção tenham o aspecto característico, conhecido como tecido de granulação. Inicialmente, o processo envolve o brotamento capilar, pelo

qual as células endoteliais migram na direção do estímulo, criando novos vasos; brotos capilares individuais interligam-se, formando alças de capilares que, por sua vez, formam novos brotos. Também ocorrem anastomoses dos vasos pré-existentes, fazendo com que o fluxo sanguíneo seja gradualmente restabelecido. Contudo, este estado não persiste, pois mais tarde o tecido de granulação é remodelado, transformando-se em tecido cicatricial (BEVILACQUA et al., 1981; SIMÕES, 1988; ARAÚJO, 1997; KITCHEN e YOUNG, 1998).

À medida que ocorre a deposição de fibroblastos na malha de fibrina e neo-vascularização, alguns fibroblastos são estimulados e diferenciam-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida, reduzindo o seu tamanho (ARAÚJO, 1997). A contração da ferida consiste no processo que reduz as dimensões de uma ferida em decorrência do movimento centrípeto da pele circunjacente, em toda a sua espessura. Tem início logo após a lesão, passando por um pico após duas semanas (KITCHEN e YOUNG, 1998). É importante para a cicatrização da ferida, mas se ocorrer de maneira exagerada e desordenada, poderá causar defeitos cicatriciais importantes.

2.2.3 Fase de remodelagem

Tem início praticamente junto com a formação do novo tecido e persiste usualmente por até seis meses (ARAÚJO, 1997), mas pode durar anos (KITCHEN e YOUNG, 1998). A matriz presente neste estágio é gradualmente substituída e remodelada enquanto ocorre a maturação do tecido cicatricial. A cicatriz é definida morfológicamente como ausência de organização tissular em comparação com a arquitetura tissular adjacente normal (SABISTON e LYERLY, 1996). A deposição desorganizada do colágeno desempenha um papel importante na formação da cicatriz.

O balanço da síntese e da degradação do colágeno favorece sua deposição. As cicatrizes lentamente adquirem resistência à ruptura, a qual aumenta com a deposição de colágeno, atingindo cerca de 20% da resistência da pele normal por volta do 21º dia. A resistência final é de 70-80% do valor normal (KITCHEN e YOUNG, 1998).

As lesões da pele podem envolver somente a epiderme ou a epiderme juntamente com a derme. A re-epitelização da superfície é o objetivo final do processo de reparo, iniciando-se já nas primeiras 24 a 36 horas. As células epiteliais migram a partir das bordas da ferida e dos folículos pilosos próximos, contribuindo para a contração e reduzindo sua superfície. Uma célula migra para a ferida, ancora-se na área descoberta e não se move mais; outra célula próxima avança sobre a primeira, ancora-se e, posteriormente, é encoberta por uma terceira célula, que migra sobre ela, num movimento celular que tende a ser rápido. Após a cobertura da superfície cutânea, as células amadurecem e diferenciam-se em queratinócitos (ARAÚJO, 1997); BEVILACQUA et al., 1981).

3. O ULTRA-SOM

O ultra-som é uma forma de energia mecânica não audível, que consiste em vibrações de alta frequência, na faixa acima de 20 KHz (kilohertz). A frequência está relacionada com o número de ondas que passam por um determinado ponto em unidade de tempo, expressa em Hz (hertz). A onda mecânica produzida pelo ultra-som é a energia transmitida por vibrações de moléculas do meio em que estão se propagando, fazendo-as oscilarem, quer o meio seja sólido, líquido ou gasoso (TER HAAR, 1987).

A quantidade de energia que incide em uma determinada superfície é chamada de potência, expressa em watts (W). Essa energia é dependente de algumas características do ultra-som (frequência, intensidade, amplitude, foco e uniformidade do feixe) e do tipo de tecido onde ocorre a propagação da onda (SPEED, 2001). A intensidade é definida como a quantidade de energia que passa através da unidade de área na unidade de tempo, expressa em watts por centímetro ao quadrado (W/cm^2) (utilizamos a sigla SATA para expressar a intensidade média de energia ultra-sônica).

As ondas mecânicas que se propagam podem ser longitudinais ou transversais. Nas ondas longitudinais, as mais comuns, o movimento das partículas tem a mesma direção de propagação da onda, podendo este tipo de onda propagar-se em meio líquido; utilizadas nos equipamentos de ultra-som terapêutico, uma vez que os tecidos moles do corpo humano podem ser considerados como um fluido. Nas ondas transversais o movimento é perpendicular à direção de propagação da onda, propagando-se somente em meios sólidos (GUIRRO et al., 1996).

O aparelho de terapia ultra-sônica consiste em duas partes funcionais, uma de circuito eletrônico alojada na estrutura do aparelho e um transdutor montado no aplicador. O transdutor converte energia elétrica em vibrações mecânicas quando uma

tensão alternada é aplicada; este fenômeno é denominado efeito piezoelétrico (KITCHEN e PARTRIDGE, 1990), sendo observado em alguns materiais cristalinos, como o quartzo ou uma cerâmica sintética, tais como o zirconato e o titanato (PZT), os quais podem ser polarizados pela aplicação de uma carga elétrica (WILLIAMS, 1987).

O bom desempenho do equipamento de ultra-som depende de um acoplamento correto entre o transdutor e o paciente, sendo os tecidos caracterizados por apresentarem impedância acústica e as aplicações feitas em contato direto com estes, necessitamos de um agente acoplador que também excluirá as bolhas de ar que podem se formar entre o transdutor e o paciente podendo ser água, gel e alguns tipos de óleos, como a vaselina. (CASAROTTO, 2000; DOCKER, 1987; GUIRRO, CANCELIERI e SANT'ANA, 2001; SPEED, 2001; WILLIAMS, 1987).

As ondas ultra-sônicas podem se propagar de dois modos: o contínuo e o pulsado. No modo contínuo não ocorre interrupção da onda ultra-sônica, de modo que há uma deposição ininterrupta de energia nos tecidos irradiados. Já no modo pulsado há interrupções regulares e reguláveis na liberação da energia nos tecidos irradiados. A escolha entre o modo contínuo ou pulsado depende dos efeitos biofísicos que se buscam e da interação do ultra-som com o tecido em questão (McDIARMID e BURNS, 1987).

3.1 Mecanismos de interação do ultra-som com os tecidos biológicos

É fato conhecido que o ultra-som interage com os tecidos biológicos por meio de mecanismos térmicos e não térmicos ou mecânicos, que prevalecem de acordo com o modo de propagação da onda; contínua ou pulsada. Os dois mecanismos de interação ocorrem simultaneamente (DYSON, 1982), mas é possível potencializar um ou outro

efeito alterando os parâmetros físicos da irradiação, como o tipo de onda utilizada, o tempo e a técnica de aplicação (BAKER, ROBERTSON e DUCK, 2001; DYSON, 1987).

3.1.1 Mecanismo térmico

A irradiação ultra-sônica promove o aquecimento dos tecidos biológicos devido à absorção de parte da energia mecânica do ultra-som, causando um aumento do fluxo sanguíneo local, aumento temporário na extensibilidade das estruturas colagenosas, como os tendões, ligamentos e cápsulas articulares, diminuição da rigidez articular, redução da dor e do espasmo muscular e produção de uma discreta reação inflamatória (BAKER, ROBERTSON e DUCK, 2001; DYSON, 1987; KITCHEN e PARTRIDGE, 1990). O aquecimento local depende do tipo de tecido (os altamente protéicos como os músculos e tendões, absorvem mais energia do que os tecidos com alto teor de gordura), do fluxo sanguíneo regional (poderá dissipá-lo) e da frequência aplicada (altas frequências são mais rapidamente absorvidas do que as baixas frequências) (DYSON, 1987; TER HAAR, 1987).

3.1.2 Mecanismos não-térmicos

São os efeitos mecânicos, conhecidos como cavitação, microfluxo acústico e força de radiação, sob o efeito da micromassagem; que consiste na reação mecânica dos tecidos devido á pressão da onda ultra-sônica (GUIRRO et al, 1996).

A cavitação é o termo usado para descrever a formação de micro-bolhas de gás num meio contendo líquido, sob a ação do campo ultra-sônico; envolve a formação, o crescimento, o colapso e os efeitos associados às bolhas gasosas. A cavitação estável ocorre quando as bolhas se contraem e se expandem de modo estável, sendo responsável, em parte, pela estimulação do reparo dos tecidos (DYSON, 1987; KITCHEN e PARTRIDGE, 1990; TER HAAR, 1987). Os efeitos potencialmente

benéficos da cavitação estável podem ocorrer a intensidades de 0,1 e 0,2 W/cm² (DYSON, 1987).

A cavitação transitória ocorre quando as bolhas entram em colapso, liberando grande quantidade de energia (KITCHEN e PARTRIDGE, 1990; TER HARR, 1987). Pode ser danosa para os tecidos, mas só ocorre com altas intensidades (10 W/cm²), maiores do que aquelas usadas terapeuticamente (LEITE, 1989). A irradiação com o feixe ultra-sônico estacionário pode causar a diminuição do fluxo de células sanguíneas, diminuição do fluxo de oxigênio e cavitação transitória. Evita-se a cavitação transitória por meio da movimentação contínua do cabeçote aplicador do ultra-som (KITCHEN e PARTRIDGE, 1990; TER HAAR, 1987).

O microfluxo corresponde a movimentos unidirecionais que ocorre em fluídos submetidos a um campo ultra-sônico e que originam forças e tensões que podem, por um lado, danificar macromoléculas e células e, por outro, modificar a posição de partículas intra e extra-celulares. Conseqüentemente, podem afetar a atividade celular, estimulando o metabolismo e a multiplicação (DYSON e SUCKLING, 1978).

Os efeitos fisiológicos dos mecanismos não-térmicos foram evidenciados em vários estudos, incluindo a degranulação de células de sustentação, alterações na função da membrana celular, aumento nos níveis intracelulares de cálcio, aumento da angiogênese e da permeabilidade vascular, estimulação da atividade fibroblástica e, conseqüentemente, aumento da síntese protéica e da tensão elástica do colágeno (DYSON, 1982, 1987; DYSON e SUCKLING, 1978; KITCHEN e PARTRIDGE, 1990; YOUNG e DYSON, 1990). Assim, o ultra-som tem um papel terapêutico importante na reparação tecidual, sobretudo à baixa intensidade, o que minimiza inclusive o risco de lesões teciduais, que podem ocorrer com intensidades elevadas (FRENKEL e KIMMEL; IGER, 1999; KITCHEN e PARTRIDGE, 1990; OAKLEY, 1978; YOUNG e DYSON, 1990; YOUNG, 1998). Não existem dados científicos ou clínicos quantitativos

que indiquem que devam ser utilizadas intensidades elevadas de irradiação ultrassônica, isto é, acima de 1 W/cm², na reparação tecidual. Ao contrário, as referências bibliográficas apóiam o uso de intensidade de 0,5 W/cm² (SATA) e até inferiores para que seja acelerada a cicatrização de tecidos como a pele, o osso e o tendão (YOUNG, 1998).

3.2 Ultra-som terapêutico no reparo do tegumento cutâneo

Há poucos estudos sobre os efeitos do ultra-som de baixa intensidade sobre o reparo da pele, mas um número considerável do ultra-som terapêutico sobre esta, cuja frequência de irradiação varia, em geral, entre 1 e 3 MHz, embora outras frequências possam ser programadas. A possibilidade de usar várias frequências de irradiação é relevante, pois a absorção mais rápida das frequências mais elevadas as torna mais adequadas para o tratamento de tecidos superficiais, enquanto que a maior penetração das frequências mais baixas as faz propícias para o tratamento das estruturas profundas (DOCKER, 1987; MCDIARMID e BURNS, 1987).

A terapia por ultra-som, indicada no tratamento tanto de condições agudas, como crônicas (KITCHEN e PARTRIGDE, 1990), é um dos recursos mais utilizados na prática clínica para o tratamento de lesões de tecidos moles, pois é fato comprovado que acelera a reparação tecidual (DYSON, 1987; RAMIREZ et al., 1997; ROBERTSON e BAKER, 2001; WEBSTER, 1978; YOUNG e DYSON, 1990) agindo nas fases do mecanismo fisiológico (inflamação aguda, proliferação e remodelação) desde o seu início, no qual promove a liberação de histamina e de fatores de crescimento, pela degranulação de macrófagos, mastócitos e plaquetas. Os fibroblastos e as células endoteliais também podem ser afetados pelo ultra-som, aumentando a síntese de colágeno, o que confere maior resistência do tecido à tração (DYSON, 1987; YOUNG e DYSON, 1990).

As evidências dos efeitos benéficos da irradiação ultra-sônica sobre o tegumento cutâneo estimularam a investigação sobre os seus benefícios em algumas situações clínicas. Assim, Galitsky e Levina ¹ (1964, apud HILÁRIO, 1993) usaram a irradiação com o ultra-som terapêutico (UST) de 2,5 MHz de frequência e com intensidade de 1,5 W/cm², como método preparatório de procedimentos de enxerto de pele em úlceras cutâneas tróficas, cuja eficácia aumentou.

Dyson et al. (1968) utilizaram diferentes intensidades de irradiação do UST para estimular a regeneração de lesões cutâneas de espessura total na orelha de coelhos e demonstraram que a irradiação por 5 minutos com o ultra-som pulsátil a 0,5 W/cm² de intensidade, acelera o processo de cicatrização, com os melhores resultados ocorrendo nas fases iniciais do processo.

Dyson, Franks e Suckling (1976) avaliaram os efeitos do UST (modo pulsado, 3 MHz de frequência, intensidade de 1,0 W/cm², por 5 a 10 minutos, três vezes por semana) na cicatrização de úlceras varicosas crônicas, demonstrando que houve redução do tamanho da área lesada e melhora da dor.

Dyson e Suckling (1978) utilizaram o UST (modo pulsado, frequência de 3 MHz, potência de 0,2 W/cm², por mais de 5 minutos) na superfície cutânea ao redor de úlceras dos membros inferiores e demonstraram uma redução significativa do tamanho das lesões, concluindo assim que o ultra-som pode estimular o processo de reparação.

Roche e West (1984) confirmaram estes resultados, com o ultra-som na frequência de 3 MHz, intensidade de 1 W/cm² e os mesmos parâmetros para o tempo de aplicação.

Shamberger et al. (1981) avaliaram os efeitos térmicos do UST de 5 MHz e a

¹ GALITSKI, A.B.; LEVINA, S.I. **Vascular origin of trophic ulcers and application of ultrasound as preoperative treatment to plastic surgery.** Acta Chir. Plast., v.89, p.271-8, 1964.

resistência mecânica à ruptura da cicatriz de feridas dérmicas irradiadas diariamente por 5 (0,05 a 0,15 W/cm²) e 10 minutos (0,05 W/cm²). Demonstraram que houve um aumento da temperatura do tecido subcutâneo igual para todas as intensidades e que a resistência da cicatriz não aumentou para nenhuma delas.

Callan et al. (1987) observaram um aumento de 20 % na velocidade de cicatrização das úlceras crônicas de pernas tratadas com o ultra-som pulsado (1MHz, 0,5 W/cm²) aplicado semanalmente por doze semanas durante um minuto por área de transdutor ao redor das úlceras com aplicação semanal, durante doze semanas.

Young e Dyson (1990) observaram os efeitos do ultra-som pulsado (0,1 W/cm², freqüências de 0,75 e 3 MHz) em lesões de pele total em ratos, com aplicações diárias de 5 minutos cada durante 7 dias, iniciando imediatamente após a produção da lesão. Os resultados obtidos sugerem que o ultra-som pode acelerar o processo inflamatório do reparo, bem como os estágios de proliferação celular em ambas freqüências utilizadas. Esses achados são similares aos encontrados por Dyson (1987), Maxwell (1992) e Yang et al. (1990), que concluíram que o ultra-som causa o aumento do fluxo sanguíneo para a ferida, a liberação dos mediadores da inflamação, a migração de leucócitos, a angiogênese, a síntese de colágeno e a formação do tecido cicatricial. Por outro lado, Cambier e Vanderstraeten (1997) observaram os efeitos do UST pulsado (0,25 W/cm²) e contínuo (0,3 W/cm²), com freqüência de 3 MHz, na cicatrização de queimaduras em ratos, não observando diferenças significantes no processo de cicatrização entre os efeitos dos parâmetros.

Byl et al. (1993) aplicaram o UST contínuo e pulsado (1 MHz, 1,5 W/cm², sessões de 5 minutos) em lesões cutâneas em porcos. Observaram que o UST pulsado produziu maior deposição de colágeno a 0,5 W/cm², já com cinco dias de tratamento, intensificando após 10 dias e resultando em aumento significativo da resistência mecânica da cicatriz, em comparação com o UST contínuo.

Johannsen, Gam e Karlsmark (1998) revisaram 44 artigos a respeito da aplicação do UST para estimular a cicatrização de úlceras crônicas na perna, encontrando que os melhores resultados ocorrem com a irradiação na margem ao redor da úlcera com doses baixas. Sugerem que mais estudos são necessários para avaliar os possíveis efeitos em relação ao modo de aplicação do ultra-som, dose, frequência, tempo e número de aplicações.

Frenkel, Kimmel e Iger (1999) estudaram os efeitos do UST subaquático (1 MHz, até 1 W/cm²) sobre o epitélio de peixes e relataram que as doses mais altas (a partir de 0,75 W/cm²) associadas ao tempo de irradiação (90 segundos) podem levar a lesões teciduais importantes, das camadas superficiais às mais profundas, produzindo falhas na superfície celular e dispersão dos componentes intracelulares, tais como segmentos da membrana celular, organelas e fibras intracelulares.

Boucaud et al. (2001) expuseram segmentos de pele humana e a de ratos sem pêlo, *in vivo* e *in vitro* ao ultra-som de baixa frequência (20 KHz) e intensidade variando entre 0,25 a 7 W/cm², no modo pulsado e contínuo. Um lento e pequeno eritema foi observado na pele do rato após a exposição de 2,5 W/cm², evoluindo 24 horas depois para uma lesão dérmica e necrose muscular; atribuída ao aumento importante de temperatura observado quando um filme plástico era colocado entre o agente acoplador e a pele durante a terapia. Em contraste, submetida às mesmas condições, não houve modificações na pele humana, que se mostrou também menos sensível *in vitro*.

Lowe et al. (2001) observaram os efeitos do UST pulsado (1 e 3 MHz, 0,5 W/cm², 5 minutos de aplicação) na pele de ratos com atraso no fechamento de feridas cutâneas submetidas à exposição radioativa, concluindo que houve estímulo ao fechamento da ferida com ambas as frequências.

Barros (2002) estudou os efeitos do UST pulsado (3 MHz, 0,8 e 0,4 W/cm²) sobre lesões epidérmicas totais em coelhos, demonstrando que houve estimulação da cicatrização das feridas com a dosagem menor (0,4 W/cm²).

Amâncio (2003) evidenciou um aumento significativo no número de células em proliferação na epiderme e neoformação vascular, com aceleração e melhora na integração de enxertos de pele total após irradiação com o UST (3MHz, 05 W/cm², 5 minutos) em coelhos.

3.3. Ultra-som de baixa intensidade (USBI)

3.3.1. Estimulação da reparação/regeneração tecidual com o USBI

A intensidade do ultra-som varia conforme a finalidade da sua aplicação. Para fins diagnósticos, a intensidade fica na faixa de 1 a 50 mW/cm², mas para procedimentos cirúrgicos vai de 5 a 300 W/cm². Para procedimentos terapêuticos, a intensidade usual fica entre 1 e 3 W/cm² (CHANG et al, 2002; RUBIN, 2001). A aplicação mais freqüente do USBI como recurso terapêutico na atualidade é na estimulação da osteogênese, por meio de técnica e equipamentos devidamente aprovados pelo Food and Drug Administration (F.D.A.) para o tratamento de fraturas, em 1994, e pseudartroses, em 2000 (RUBIN, 2001). No Brasil, foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para ambas as aplicações, em 2001.

Os efeitos benéficos da irradiação com o USBI na aceleração de consolidação óssea foram devidamente demonstrados por meio de investigações experimentais em animais e de investigações clínicas, no Brasil e no exterior. Duarte e Xavier (1983) foram os primeiros a demonstrar que a terapia de pulsos por USBI (30 mW/cm²)

poderia afetar a consolidação de fraturas ósseas experimentais em coelhos, acelerando a regeneração óssea e levando a um aumento significativo do calo ósseo.

Além da influência positiva na produção do calo ósseo, também proporciona significativo aumento da sua resistência mecânica e rigidez (CHANG et al., 2002; GEBAUER et al., 2002; PILLA et al., 1990; SHIMAZAKI et al., 2000; WANG et al., 1994; YANG et al., 1996).

Artigos de revisão bibliográfica (BUSSE, 2002; RUBIN et al., 2001) sugerem que o USBI pulsado efetivamente estimula a consolidação de fraturas, reduzindo o tempo de cicatrização, especialmente em pacientes com atrasos nesse processo, contribuindo para reduzir os custos do tratamento da não-consolidação (LERNER, STEIN e SOUDRY, 2004).

A análise da expressão genética de várias substâncias relacionadas à consolidação óssea mostrou que ocorre um aumento da expressão de uma proteína agregadora da matriz extracelular da cartilagem, sugerindo que o USBI promove a consolidação óssea pelo estímulo da produção dessa proteína, que interfere com o metabolismo dos condrócitos e incrementa o processo de ossificação endocondral (PARVIZI et al., 1999; YANG et al., 1996). A ação favorável do USBI sobre os condrócitos também foi confirmada por Cook et al. (2001) e Nishikori et al. (2002). O cálcio parece ser o mediador desse mecanismo, pois o USBI altera a função da membrana celular, cuja permeabilidade ao cálcio aumenta, aumentando assim os níveis intracelulares desse íon, ao mesmo tempo em que ocorre um aumento dos níveis dos fatores de crescimento ósseo (PARVIZI et al., 2002; GEBAUER et al., 2002).

O sucesso da aplicação do USBI no reparo de fraturas motivou o estudo em outros tecidos. Em relação ao tecido muscular, Guirro e Guirro (1995) observaram os efeitos do USBI sobre a cicatrização da parede abdominal de ratos, por meio da análise histopatológica e da resistência mecânica à ruptura. Os resultados mostraram que a

energia ultra-sônica pode abreviar a fase inflamatória do processo de reparo, levando ao aumento da resistência mecânica da ferida. Bassoli (2001) observou que a irradiação com o USBI acelerou a regeneração das fibras musculares do músculo glúteo máximo, produzindo intensa neovascularização, reabsorção da necrose e formação de mioblastos, os quais agregavam-se em miotubos formando novas células musculares.

No que concerne aos nervos periféricos, Crisci (2001) observou que o USBI induziu uma recuperação mais rápida após axotomia experimental do nervo isquiático, em ratos, conforme constatação de análise morfológica e morfométrica, particularmente do coto proximal do nervo.

Os efeitos do USBI sobre ligamentos também foram analisados. Assim, Takakura et al. (2002) observaram que o ultra-som acelerou o processo de cicatrização do ligamento colateral medial do joelho de ratos, aumentando significativamente suas propriedades mecânicas com 12 dias de tratamento, em comparação com o ligamento não irradiado.

3.3.2. Estimulação do reparo do tegumento cutâneo com o USBI

Apesar de inúmeros trabalhos experimentais comprovarem que o USBI pulsado acelera a osteogênese e tem, também, efeitos cicatriciais benéficos sobre outros tecidos, há relativamente poucos estudos sobre seus efeitos na cicatrização cutânea.

Alves (1988) realizou uma investigação experimental em ratos nos quais foi produzida uma queimadura de terceiro grau, submetida à irradiação com o USBI pulsado (33 mW/cm²). Realizou aplicações diárias, de cinco minutos cada, em quatro pontos vizinhos à lesão, perfazendo 20 minutos totais de irradiação, por até dez dias, conforme o grupo de animais. Observou que ocorria uma reação inflamatória mais

precoce e regeneração do tecido conjuntivo dérmico e do epitélio mais acentuadas nos animais tratados.

Hilário (1993) investigou os efeitos do USBI pulsado (25mW/cm^2) na reparação de úlceras tróficas de perna, por meio da irradiação de suas bordas por 20 a 40 minutos, de acordo com a área da úlcera, em três aplicações semanais. As úlceras eram medidas a cada duas semanas e a porcentagem de área cicatrizada, nos períodos de 4, 8 e 12 semanas. Os resultados obtidos mostraram que o USBI pulsado acelerou o processo de reparação das úlceras.

Peschen et al. (1997) também estudaram os efeitos do USBI subaquático (30 KHz, 100 mW/cm^2), por meio de aplicações de 10 minutos cada, três vezes por semana, e relataram que houve redução da área da ferida e aumento na formação de tecido de granulação. Sugeriram que o ultra-som de baixa intensidade e frequência é uma opção de tratamento para as úlceras venosas crônicas, principalmente quando elas não respondem ao tratamento convencional.

Anastácio (2000) analisou os efeitos do USBI (25 mW/cm^2) em úlceras vasculares na perna, por meio de aplicações em pontos adjacentes à sua borda. O tempo de cada aplicação, repetida três vezes por semana, variou de acordo com a extensão da úlcera (no mínimo 10 minutos por área). Observou macroscopicamente que houve uma redução da área das úlceras, ao passo que a análise histopatológica mostrou neoformação de vasos sanguíneos e aumento dos fibroblastos, concluindo que a reparação tecidual foi acelerada pelo USBI.

Campanelli (2004) estudou os efeitos do USBI pulsado (16 mW/cm^2) sobre o mal perfurante plantar e úlceras cutâneas em portadores de hanseníase. As aplicações foram realizadas até a obtenção da cicatrização total das lesões, obtida em todos os casos, independentemente do tempo de existência da lesão e da sua área e

profundidade. O autor concluiu que o USBI foi altamente eficaz no tratamento dessas úlceras.

4. USO DA PLANIMETRIA NA AVALIAÇÃO DA ÁREA DE FERIDAS CUTÂNEAS

A evolução de uma lesão ou ferida cutânea e a eficácia de um determinado tratamento podem ser acompanhados e medidos a intervalos regulares por meio vários métodos até que haja o restabelecimento da continuidade da pele.

Os métodos para a avaliação do reparo das feridas podem ser divididos em dois grupos principais: técnicas invasivas e não-invasivas. As técnicas invasivas proporcionam informação quantitativa concernente à ferida e ao seu estágio de cicatrização, tais como: análise histológica e bioquímica, resistência tensil do tecido e angiogênese. As técnicas não-invasivas tendem a ser menos quantitativas que os métodos invasivos, contudo são mais aceitos pelos pacientes, podendo ser realizadas por meio de diversos processos como: traçados por transparência ou planimetria, registro fotográfico, calibres de profundidade e/ou volume, fotografia esteroscópica, imagens térmicas e análise por imagem de vídeo (ROMANELLI et al., 2002; YOUNG, 1998).

A planimetria é um método de avaliação não-invasiva, utilizado para feridas superficiais e sem fatores complicadores, como as lesões profundas, afetando, fáscia, músculo, tendões e outros. A impressão da ferida, é obtida através do desenho do seu contorno sobre um filme transparente em períodos programados; a área da superfície da ferida poderá ser então calculada com o auxílio de um computador, que escaneará e digitará o perímetro traçado, calculando automaticamente a área da ferida, permitindo acompanhar a contração e o fechamento (SIMÕES, 1988; YOUNG, 1998).

De fato, o estudo da contração de ferimentos cutâneos produzidos em ratos, pela planimetria seqüencial, tem-se constituído numa metodologia simples e precisa dessa fase do processo cicatricial, amplamente utilizada em nosso meio (FALCÃO et

al., 2001; MAcGRATH e SIMON, 1983; PESCHEN et al., 1997; TADJALLI et al., 1999; ZACHARIAS et al., 1991). Além do uso em investigações envolvendo animais, o método também tem sido aplicado em humanos, independente da morfologia da ferida (ALVAREZ, et al., 2002; ANASTÁCIO, 2000; HILÁRIO, 1993; TANAKA et al., 1996).

A planimetria também se mostrou efetiva no acompanhamento da evolução de lesões cutâneas mais complexas. Assim, Tadjalli et al (1999) produziu úlceras cutâneas por radiação com diferentes doses de radioterapia em ratos e avaliou a evolução das lesões e os limites da pele intacta por meio da planimetria. Do mesmo modo, Salmi, Hong e Futrel (1999) acompanharam a evolução de área isquêmica da pele, após submetê-la a repetidos ciclos de calor e frio.

De acordo com Richard et al (2000), a utilização da planimetria constitui um processo alternativo para a reprodução e mensuração da área da lesão cutânea, sendo método confiável, rápido, de baixo custo e seguro para o paciente. Entretanto, a precisão das medidas deve ser otimizada pela reprodução computadorizada do decalque, obtido diretamente das feridas sobre um filme transparente, o que permite calcular as dimensões ou outras de suas características, utilizando um programa e técnicas de processamento da imagem (FALCÃO et al., 2001; LAGAN et al., 2000; MEDEIROS, 2001; RICHARD et al., 2000).

Para que as medidas tomadas não sofram imprecisões e sejam confiáveis Sussman e Bates-Jensen ² (1998, apud MEDEIROS, 2001) descrevem algumas regras importantes:

- Fazer a mensuração da lesão sempre do mesmo modo a cada vez, tomando como referência um determinado ponto aleatoriamente fixado no corpo do paciente, ou na lesão;

- Usar a mesma terminologia e unidades de medida em cada medição, a fim de se manter um padrão para as medidas, o que facilita posteriores comparações de resultados;
- Se possível, poder contar sempre com a ajuda do mesmo examinador para a repetição das medidas. Isto é conveniente para que sejam mantidas as mesmas condições de medição de uma mesma ferida, em tempos diferentes.

Esses cuidados básicos são importantes para evitar medidas errôneas e, deste modo, obter uma documentação dos resultados mais completa e precisa para que seja testada a eficácia da terapia e acompanhar a evolução da lesão.

5. OBJETIVO

Avaliar os efeitos da irradiação ultra-sônica de baixa intensidade sobre a cicatrização cutânea num modelo experimental de lesão cutânea total em ratos, através do método da planimetria para a mensuração da área de lesão.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar de idade adulta e peso corpóreo variando entre 250 e 350 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco animais cada) sob condições ambientais adequadas (controle da temperatura ambiente e aeração), recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (1 e 2) de 30 animais cada, conforme o tratamento realizado; irradiação ultra-sônica baixa intensidade simulada (controle) e irradiação ultra-sônica de baixa intensidade efetiva (irradiado). Em cada grupo, os animais foram distribuídos em subgrupos de dez animais cada (A, B e C), conforme o período de tratamento (3, 7 e 14 dias, respectivamente).

6.2 Procedimento operatório

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Inicialmente, os animais foram anestesiados com uma injeção intra-peritonal de uma dose única adequada (60 mg/kg) de pentobarbiturato de sódio (Nembutal®, Abbott). Em seguida, era feita a tricotomia na região escapular direita (Figura 1), o animal era posicionado na mesa operatória e era feita a anti-sepsia do local operatório com solução alcoólica de iodo a 2%.

Figura 1. Preparação do local operatório

Com o animal assim preparado, era feita uma lesão cutânea por ressecção de uma área redonda de 1 cm de diâmetro da pele, utilizando um *punch* (instrumento dotado de superfície circular cortante, medindo 1 cm de diâmetro) (Figura 2). Sendo a pele do rato muito elástica, era necessário fazer uma dobra cutânea, que era apoiada sobre a superfície dura da mesa operatória, o que permitia a realização das lesões (Figura 3).

Figura 2. *Punch* utilizado para produzir a lesão

Figura 3. A lesão circular produzida

6.3 Equipamento de ultra-som

O equipamento utilizado foi desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Engenharia de Materiais, Aeronáutica e Automobilística da EESC - USP para fins médicos e biológicos e possui as seguintes características: frequência fundamental de 1,5 MHz; pulsado com frequência de repetição de pulsos de 1 KHz; largura de pulso de 200 μ s; intensidade de 30 mW/cm² (SATA); área de irradiação efetiva (ERA) de 22 mm. O tempo de irradiação em cada sessão foi de 10 minutos (Figura 4).

Figura 4. Equipamento de ultra-som

6.4 Tratamento

Para a aplicação do tratamento, os animais eram introduzidos em um dispositivo confeccionado em PVC, constante de um tubo sem saída de 4,5 cm de diâmetro e dotado de perfurações para aeração e de uma janela lateral, onde ficava exposta a lesão. Desse modo, o animal permanecia imobilizado, praticamente sem a necessidade nem o trauma de mantê-lo submetido à força (Figura 5).

O tratamento pela irradiação ultra-sônica era iniciado imediatamente após a produção da lesão e, a partir daí, em dias alternados, sendo que no subgrupo **A** foi repetido duas vezes, no subgrupo **B**, quatro vezes, e no subgrupo **C**, sete vezes.

A irradiação ultra-sônica era realizada diretamente sobre a lesão, da seguinte forma: primeiramente, a lesão era profusamente banhada com solução fisiológica; depois, era coberta com uma película de filme plástico (PVC) previamente esterilizado e esticado sobre a superfície para não permitir a formação de bolhas de ar; em seguida, a película de PVC era coberta com o hidrogel de acoplamento para o cabeçote do ultra-som (Figura 5). A irradiação era feita no modo estacionário, com o cabeçote permanecendo diretamente sobre a lesão por 10 minutos. O mesmo procedimento era realizado nos Grupos 1 e 2, sendo com o equipamento desligado no Grupo 1 (controle) e ligado no Grupo 2 (irradiado).

Figura 5. Aplicação do ultra-som. Tubo para imobilizar o animal (A e B); o animal introduzido no tubo (C); banho da lesão com solução fisiológica (D); a película de filme de PVC colocada sobre a lesão (C); e a irradiação com o hidrogel aplicado sobre a película (D).

6.5 Avaliação dos resultados

Os resultados foram avaliados pela mensuração da área da lesão antes e após o término do tratamento. Para o cálculo da área, eram feitos, inicialmente, o registro da lesão e o processamento da imagem obtida.

A observação da ferida em relação a infecções, a integridade do tecidos circunjacentes e a evolução da cicatrização também foi realizada.

6.5.1 Registro da área de lesão

Foram registrados os perímetros das áreas das lesões, imediatamente após a sua produção e no terceiro dia, no subgrupo A, no sétimo dia, no subgrupo B, e no 14º dia, no subgrupo C, nos dois grupos experimentais (1 e 2). O perímetro da lesão era obtido por decalque *in loco*, utilizando-se uma película plástica translúcida, de aspecto leitoso e poroso (folha de transparência) previamente esterilizada, e desenhando-se diretamente com uma caneta esferográfica de ponta fina (Figura 6).

Esses registros eram copiados em *scanner* digital e armazenados para posterior processamento e análise computacional, utilizado o programa Matlab 6.0 *release* 13, específico para processamento e análise de imagens, desenvolvido no Laboratório de Visão Computacional do Departamento de Engenharia Elétrica de São Carlos da Universidade de São Paulo. Os registros foram reproduzidos juntamente com uma escala milimetrada para cálculo das áreas, tomando como referência a medida-padrão da área do *punch* empregado para produzir as lesões (78,54 mm² de área), de 1 cm de diâmetro. A partir da área interna do punch foi construído um padrão de 100 mm², pois o programa não lê números quebrados.

Figura 6. Obtenção do decalque da lesão

6.5.2 Processamento das imagens pela visão computacional

As imagens digitalizadas (Figura 7a), com 8 bits de escala de cinza, eram binarizadas, de modo a se obter o contorno da área da lesão (Figura 7b). A binarização pode ser entendida como a separação da região de interesse do restante da figura, chamado de fundo, com o que a imagem passa a ter somente dois níveis de cinza, sendo ou 0 (preto) ou 1 (branco), caracterizando a região de interesse e o fundo, respectivamente. Por meio de operações morfológicas, a região interna do contorno (centro da lesão), caracterizada inicialmente como fundo, era modificada, sendo preenchida de modo a pertencer à região de interesse (Figura 7c).

A área da lesão era, então, calculada contando-se o número de *pixels* (unidade espacial da imagem) da região de interesse, no caso deste estudo, constando da quantidade de 0's (*pixels* de cor preta) presentes na figura. A conversão de *pixels* para milímetros ao quadrado é feita tomando por base a imagem de um padrão de 100 mm².

Os resultados foram avaliados quanto à evolução temporal, entre os sub-grupos do mesmo grupo, e quanto ao tipo de tratamento (controle ou irradiado), entre os subgrupos de cada grupo.

Figura 7. Seqüência do processamento digital de imagem para cálculo da área da lesão. Decalque obtido (A), binarização do contorno (B), e preenchimento da área interna ao contorno (C).

6.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados através da aplicação do teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação de duas amostras independentes, com o nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$) (HOLLANDER e WOLFE, 1973; ROSNER, 1995).

7. RESULTADOS

Dos 60 animais que foram submetidos ao experimento apenas 06 deles não sobreviveram devido ao acidente anestésico e desta forma eles foram substituídos para manter a uniformidade dos grupos.

O modelo experimental de lesão cutânea promovida através do punch obteve bons resultados; pois era de fácil execução, manteve a integridade dos tecidos vizinhos e de adequada extensão da lesão para o tratamento proposto.

A confecção de um tubo com material em PVC foi importante para manter o animal imobilizado sem a necessidade de anestesiá-lo e/ou submetê-lo à força; permitindo desta forma que a lesão ficasse exposta. Esse dispositivo teve boa adaptação pelo animal, permitindo que a aplicação do ultra-som fosse efetiva.

O acompanhamento da evolução da lesão foi feito durante todo o experimento; não sendo observados sinais de infecção ou outras complicações na área lesada ou nos tecidos circunjacentes que impossibilitassem a continuidade do tratamento.

Foi observado que os subgrupos que receberam o tratamento com o ultra-som apresentaram maior resistência e melhor qualidade no tecido cicatricial quando comparados aos subgrupos dos animais não tratados, visto que estes apresentaram com frequência a formação de um tecido cicatricial fibroso.

A área média inicial da lesão, imediatamente depois de produzida no subgrupo 1A (controle 3 dias) foi de $115,73 \text{ mm}^2$, diminuindo para $68,00 \text{ mm}^2$ no terceiro dia, com diferença média de $47,73 \text{ mm}^2$. No subgrupo 2A (irradiado 3 dias), a área média da lesão foi de $119,85 \text{ mm}^2$ de imediato e de $64,06 \text{ mm}^2$ no terceiro dia, com diferença média de $55,79 \text{ mm}^2$ (Tabela 1).

No subgrupo 1B (controle 7 dias) a área média da lesão foi de 133,24 mm² de imediato e de 19,69 mm² no sétimo dia, com diferença média de 113,56 mm². No subgrupo 2B (irradiado 7 dias), a área média da lesão foi de 118,03 mm² de imediato e de 18,69 mm² no sétimo dia, com diferença média de 99,34 mm² (Tabela 2).

No subgrupo 1C (controle 14 dias), a área média da lesão foi de 127,55 mm² de imediato e de 10,17 mm² no décimo quarto dia, com diferença média de 117,38 mm². No subgrupo 2C (irradiado 14 dias), a área média da lesão foi de 148,69 mm² de imediato, e de 6,81 mm² no décimo quarto dia, com diferença média de 141,88 mm² (Tabela 3).

Na figuras de 8 a 10 estão as representações gráficas das diferenças de área encontrada nos subgrupos A (3 dias), B (7 dias) e C (14 dias), na forma de *box plots*, onde as bordas inferior e superior correspondem, respectivamente, aos primeiro e terceiro quartis, a linha interna, à mediana, os colchetes horizontais externos, ao menor e maior valores da amostra, e as linhas horizontais isoladas abaixo e acima, aos valores correspondentes ao primeiro e o terceiro quartis.

A análise estatística evidenciou que não houve diferença significativa entre as áreas médias ou medianas das lesões entre os subgrupos 1A (controle 3 dias) e 2A (irradiado 3 dias) ($p=0,064$; Figura 8) e entre os subgrupos 1B (controle 7 dias) e 2B (irradiado 7 dias) ($p=0,144$; Figura 9). Já entre os subgrupos 1C (controle 14 dias) e 2C (irradiado) as diferenças entre as áreas inicial e final foram significantes ($p=0,002$; Figura 10).

O grupo controle e o grupo irradiado apresentaram um aumento na área que foi cicatrizada ao longo dos 14 dias que se sucederam após a lesão cutânea, este aumento foi gradual e contínuo para ambos os grupos (Figura 11).

Tabela 1 – Valores das áreas da lesão no 1º e no 3º dias, em milímetros, e respectivas diferenças nos subgrupos 1A e 2A

Animais	Subgrupo A					
	Controle (1ª)			Irradiado (2A)		
	1º Dia	3º Dia	Diferença	1º Dia	3º Dia	Diferença
1	109,45	54,63	-54,81	119,47	54,36	-65,11
2	134,55	83,64	-50,91	126,53	67,12	-59,42
3	111,18	62,37	-48,81	117,74	67,69	-50,05
4	125,21	71,35	-53,86	103,73	43,66	-60,08
5	109,11	74,04	-35,07	119,79	71,40	-48,40
6	98,59	61,86	-36,73	120,43	61,11	-59,32
7	149,92	77,79	-72,13	114,14	62,52	-51,62
8	118,13	65,95	-52,18	117,74	60,42	-57,32
9	104,83	69,80	-35,03	124,05	69,89	-54,16
10	96,37	58,60	-37,77	134,88	82,44	-52,44
Média	115,73	68,00	-47,73	119,85	64,06	-55,79
Desvio padrão	16,70	9,02	11,81	8,10	10,45	5,29

Figura 8. Comparação da área de lesão entre os grupos controle e irradiado no 1º e 3º dias de lesão (subgrupo A, 3 dias)

Tabela 2 – Valores das áreas da lesão no 1º e no 7º dias, em milímetros, e respectivas diferenças nos subgrupos 1B e 2B

Animais	Subgrupo B					
	Controle (1B)			Irradiado (2B)		
	1º Dia	7º Dia	Diferença	1º Dia	7º Dia	Diferença
1	166,69	18,06	-148,63	139,20	17,81	-121,38
2	142,06	21,92	-120,14	108,76	14,32	-94,44
3	103,31	21,89	-81,42	113,74	19,81	-93,93
4	115,21	16,51	-98,71	104,71	18,30	-86,41
5	105,29	30,02	-75,27	99,97	16,98	-82,99
6	131,22	17,20	-114,02	126,88	22,41	-104,47
7	144,19	15,14	-129,05	140,22	18,44	-121,77
8	152,06	19,95	-132,11	112,12	20,09	-92,03
9	126,77	14,34	-112,43	131,55	23,29	-108,27
10	145,63	21,83	-123,79	103,15	15,44	-87,71
Média	133,24	19,69	-113,56	118,03	18,69	-99,34
Desvio padrão	20,74	4,59	22,81	15,15	2,82	14,03

Figura 9. Comparação das áreas de lesão entre os grupos controle e irradiado no 1º e 7º dias de lesão (subgrupo B, 7 dias)

Tabela 3 – Valores da áreas da lesão no 1º e no 14º dias, em milímetros, e respectivas diferenças nos subgrupos 1C e 2C

Animais	Subgrupo C					
	Controle (1C)			Irradiado (2C)		
	1º Dia	14º Dia	Diferença	1º Dia	14º Dia	Diferença
1	116,37	11,24	-105,14	137,65	8,24	-129,41
2	129,59	6,93	-122,66	141,09	7,95	-133,14
3	130,29	12,47	-117,82	146,39	6,44	-139,95
4	105,81	10,93	-94,87	196,61	5,84	-190,77
5	125,31	10,41	-114,91	147,10	5,32	-141,79
6	118,53	8,04	-110,49	129,37	7,52	-121,85
7	133,36	9,05	-124,31	145,01	7,45	-137,57
8	131,16	9,47	-121,69	143,44	5,88	-137,56
9	121,17	11,32	-109,86	154,13	8,41	-145,72
10	163,90	11,85	-152,05	146,11	5,01	-141,10
Média	127,55	10,17	-117,38	148,69	6,81	-141,88
Desvio padrão	15,29	1,76	15,14	18,06	1,26	18,50

Figura 10. Comparação das áreas de lesão entre os grupos controle e irradiado no 1º e 14º dias de lesão (subgrupo C, 14 dias)

Figura 11- Gráfico da evolução da área cicatrizada nos grupos 1 (Controle) e 2 (Irradiado) e seus subgrupos A (3 dias), B (7 dias) e C (14 dias) (*p=0,002)

8. DISCUSSÃO

A terapia ultra-sônica é uma modalidade terapêutica freqüentemente utilizada na prática da fisioterapia. O ultra-som é uma forma de energia mecânica de alta freqüência, onde a energia é transmitida pelas vibrações das moléculas do meio através do qual a onda esta se propagando. Provavelmente, é o recurso físico mais utilizado no tratamento de lesões de tecidos moles, podendo acelerar a reparação tecidual nas suas diferentes fases, sendo possível melhorar tanto a velocidade da cicatrização, quanto a qualidade do tecido cicatricial (BYL et al., 1993; DYSON, 1987; RAMIREZ et al., 1997; ROBERTSON e BAKER, 2001; YOUNG e DYSON, 1990a).

O ultra-som pode ser produzido na forma de ondas contínuas ou pulsadas. No modo contínuo, caracteriza-se pela produção de efeitos biofísicos e térmicos, enquanto que no modo pulsado, reduz o efeito térmico devido à interrupção cíclica da emissão de energia, ao mesmo tempo em que mantém o efeito biológico. Tem sido sugerido que os efeitos não térmicos do ultra-som, incluindo a cavitação e a micro-massagem acústica, são mais importantes no tratamento de lesões dos tecidos moles do que os efeitos térmicos. Doses inadequadas do ultra-som nos dois modos podem ser lesivas, sendo necessária, portanto, a perfeita compreensão dos seus efeitos biológicos, mecanismos de ação e da dose adequada, de acordo com as características do tecido envolvido, para maximizar a segurança e eficácia do tratamento. Por esse motivo, os equipamentos devem ser calibrados e testados periodicamente, para que os padrões de segurança sejam atendidos.

Os efeitos benéficos do ultra-som têm sido demonstrados, sobretudo à baixa intensidade, similar à utilizada em diagnóstico por imagem, com o uso de equipamentos especificamente construídos com essa característica (DUARTE e XAVIER, 1983) e no modo pulsado, o que minimiza o risco de lesões teciduais que

podem ocorrer com as intensidades elevadas (CHANG et al, 2002; FRENKEL, KIMMEL e IGER, 1999; KITCHEN e PARTRIDGE, 1990; YOUNG e DYSON, 1990a).

A eficácia do ultra-som de baixa intensidade (USBI) foi comprovada em várias investigações sobre sua influência na estimulação da neo-osteogênese (BUSSE, 2002; CHANG, 2002; LERNER, STEIN e SOUDRY, 2004; RUBIN et al., 2001) e no reparo de outros tipos de tecidos, como a pele (ALVES, 1988; ANASTÁCIO, 2000; CAMPANELLI 2004; HILÁRIO, 1993; PESCHEN et al., 1997), o músculo (GUIRRO e GUIRRO, 1995; BASSOLI, 2001), a cartilagem (NISHIKORI et al., 2002), os nervos periféricos (CRISCI, 2001) e os ligamentos (TAKAKURA et al., 2002). Apesar de várias pesquisas já terem comprovado os efeitos benéficos do USBI sobre o processo de cicatrização e regeneração de diferentes tipos de tecidos, ainda pouco se sabe sobre os seus efeitos na cicatrização da pele. Foi, portanto, o objetivo primário da presente investigação avaliar a hipótese de que o USBI efetivamente acelera o fechamento das lesões totais da pele, produzidas até o plano fascial, utilizando o método da planimetria computacional para medir as lesões nos diferentes períodos de avaliação.

O rato foi escolhido como modelo experimental por ser um animal de fácil manuseio e manutenção, sendo também de dimensões adequadas à produção das lesões planejadas e ao tratamento com o tipo de ultra-som. A distribuição dos animais em dois grupos experimentais permitiu analisar comparativamente a cicatrização das lesões cutâneas. No Grupo 1 (grupo controle), a irradiação era simulada, ou seja, o equipamento era utilizado do mesmo modo que no Grupo 2 (grupo irradiado), embora desligado. Essa estratégia teve por finalidade submeter os animais do Grupo 1 ao mesmo protocolo do Grupo 2, garantindo assim que os efeitos encontrados seriam exclusivamente relacionados ao estímulo ultra-sônico.

O modelo experimental utilizado foi o de lesões cutâneas totais, ou seja, de remoção completa da pele, deixando exposto o tecido fascial de revestimento

muscular. Para maior reprodutibilidade do método, foi utilizada um *punch* circular cortante, que fazia mais de 90% do corte da pele, o restante sendo complementado com um bisturi. As lesões foram realizadas no dorso do rato, por ser uma região relativamente protegida de contaminação, pelo menor contato com fezes e com a saliva do animal, o que diminuía o risco de infecções. Foi produzida uma lesão cutânea total, ou seja, interessando toda a espessura da pele, até o plano fascial, com o objetivo de retirar toda e qualquer camada proliferativa central que pudesse propiciar uma cicatrização espontânea rápida, de modo que a ferida teria que obrigatoriamente cicatrizar da periferia para o centro, inclusive com a contração da cicatriz e epitelização central. Seria esse o modo, portanto, de mimetizar uma lesão cutânea grave, cuja cicatrização espontânea é sempre lenta.

Observações macroscópicas da pele dos ratos relativas a sua integridade foram realizadas durante todo experimento, não sendo observadas quaisquer reações adversas neste período em ambos os grupos.

O tempo e a frequência de estimulação do USBI pulsado no reparo do tegumento cutâneo apresenta grande variação na literatura consultada. Alves (1988) tratou por 5 minutos cada um dos quatro pontos adjacentes às lesões, em queimaduras produzidas na pele de ratos, perfazendo o total de 20 minutos diários. Hilário (1993), tratando pacientes com úlceras tróficas da perna, irradiou a periferia da lesão três vezes por semana, com tempo de irradiação de 20 a 40 minutos, na dependência da área da úlcera. Peschen et al. (1997) trataram pacientes com úlceras venosas crônicas, com três sessões semanais de 10 minutos de duração cada, usando a técnica subaquática. Anastácio (2000) tratou pacientes com úlceras vasculares também com três sessões semanais de 10 minutos de irradiação em cada ponto adjacente das lesões. Campanelli (2004) tratou pacientes com mal perfurante plantar, com três

sessões semanais de 10 minutos cada ponto adjacente, o número de pontos dependendo das dimensões da lesão.

O protocolo inicial do uso do USBI pulsado preconizava a aplicação diária por 20 minutos (DUARTE e XAVIER, 1983), mas, dependendo das dimensões da lesão, a irradiação deveria ser feita em vários pontos ao seu redor, o que tornava o tratamento muito longo e dispendioso. Por este motivo, alguns pesquisadores já têm reduzido o tempo de aplicação e, seguindo este raciocínio, no presente trabalho o tempo foi diminuído para 10 minutos por sessão, inclusive para demonstrar se tal tempo seria suficiente para acelerar o processo de reparo. Na mesma linha, a frequência das aplicações foi reduzida para dias alternados, totalizando três sessões semanais, o que torna o uso da técnica mais viável do ponto de vista clínico e econômico.

O tratamento com o USBI pulsado era iniciado no primeiro dia, imediatamente depois de produzida a lesão, com o objetivo de interferir já nos estágios iniciais do processo de reparação, na fase inflamatória aguda, conforme recomendam vários autores (OAKLEY, 1978; YOUNG e DYSON, 1990a; YOUNG, 1998; CARVALHO, 2001; BARROS, 2002). O período estabelecido para avaliação foi de 3, 7 e 14 dias, de acordo com Carvalho (2001), pois é nestes períodos que se concentram grande parte dos eventos que acompanham as fases do processo de reparação cutânea.

O emprego da técnica de aplicação estacionária, que consiste em manter o transdutor imóvel sobre o local a ser tratado, já havia sido convalidada em trabalhos anteriores (DUARTE e XAVIER, 1983). Entretanto, tratando-se de uma ferida com exposição dos tecidos profundos, era necessário que ela fosse executada da maneira mais estéril possível, para evitar infecções, que poderiam comprometer a evolução da cicatrização. Assim, foi feito o isolamento dos planos profundos por meio do filme de P.V.C., sob o qual era introduzida solução fisiológica em profusão e, acima do qual, era esparramada uma camada de gel de acoplamento (AMÂNCIO, 2003). Apesar de isolar

a ferida, essa técnica não interfere com a transmissibilidade das ondas ultra-sônicas (GUIRRO, CANCELIERI e SANT'ANA, 2001; LOW e REED, 2001; BOUCAUD et al., 2001).

De acordo com Simões (1988), a cicatrização de feridas é um evento complexo, que envolve a interação de diversos componentes celulares e bioquímicos e ocorre espontaneamente, sem intervenções externas, mas que, quando tratada através de artifícios, tende a ocorrer de forma mais rápida e com melhores resultados funcionais e estéticos. Em casos de lesões cutâneas crônicas, como as úlceras de várias causas, sempre de difícil cicatrização espontânea, a utilização de recursos e meios externos que possam eventualmente acelerá-la se justifica plenamente, pois pode significar a diferença entre haver ou não cicatrização. O ultra-som é um desses recursos, visto que seus efeitos benéficos se fazem sentir desde a fase inflamatória aguda até a fase de remodelagem da cicatriz cutânea, resultando efetivamente numa cicatrização mais rápida, como observado no 14º dia, em que a diferença de área exposta em relação ao 1º dia foi significativa.

O conhecimento dos eventos fisiológicos através dos quais se processa a cicatrização das feridas tem grande importância, sendo a sua contração uma etapa importante do fechamento das lesões que cicatrizam por segunda intenção. Ela é tida por alguns investigadores como sendo controlada pelos miofibroblastos, porque eles são vistos em grande número perto das bordas das feridas contraídas associados ao movimento centrípeto do tecido preexistente (ROBSON, RAINE e SMITH, 1995; MACGRATH e SIMON, 1983). O real mecanismo pelo qual se inicia a contração da ferida é ainda controvertido; pode ocorrer nos bordos da ferida (ARAÚJO, 1997; BEVILACQUA et al., 1981), ou na sua parte mais profunda, ou em ambos os locais (BEVILACQUA et al., 1981; KITCHEN e YOUNG, 1998). No curto prazo, o fechamento de uma ferida pela contração de suas margens é considerado insuficiente, pois resta

quase sempre uma área central cujo fechamento é por epitelização, de modo que a cicatrização se completa como resultado de uma combinação dos processos de contração e epitelização (MACGRATH e SIMON, 1983).

Na literatura concernente, há referências tanto ao emprego da irradiação ultra-sônica nas bordas das lesões (ALVES, 1988; ANASTÁCIO, 2000; CAMPANELLI 2004; HILÁRIO, 1993), no seu centro, em local destituído de pele (AMÂNCIO, 2003; LOW e REED, 2001), ou em ambas as regiões (PESCHEN et al., 1997; YOUNG e DYSON, 1990a). Neste trabalho, a irradiação envolveu simultaneamente as bordas e o centro da lesão produzida, em função das dimensões do cabeçote (22 mm de diâmetro) e da área da lesão (10 mm de diâmetro), o que foi proposital, tendo em mente que se pretendia estimular os miofibroblastos, sensíveis ao ultra-som, aumentando assim a contração da cicatriz, como já referido por outros autores (YOUNG, 1998).

O seguimento da evolução pela medida da circunferência ou da área da lesão cutânea é o parâmetro mais empregado na prática clínica diária de fisioterapeutas e médicos, motivo da sua utilização neste trabalho. A medida da área da lesão pela planimetria computacional foi escolhida por ser de baixo custo, fácil manuseio e aplicabilidade clínica, havendo já vários relatos do seu emprego para o seguimento da evolução de lesões cutâneas em humanos (FALCÃO et al., 2001; MEDEIROS, 2001; ALVAREZ et al., 2002). Por esse parâmetro, o efeito da irradiação ultra-sônica apareceu somente no último período de observação, no 14º dia (subgrupos C), quando a diferença entre os grupos foi significativa, fato não ocorrido nos períodos de 3 (subgrupos A) e 7 dias (subgrupos B). Parece claro que esse fato não tenha resultado de fenômenos ocorridos nesse período, mas da somatória de fenômenos que vinham ocorrendo desde o início, provavelmente induzidos pela irradiação ultra-sônica, visto ser este o único diferencial com o grupo não irradiado. A irradiação ultra-sônica certamente atuou já na fase proliferativa da cicatrização, que se inicia por volta do

terceiro dia após a lesão e persiste por duas a três semanas, resultando na infiltração celular do leito da ferida, na neo-angiogênese, na deposição da matriz colágena, na re-epitelização e na contração da ferida. Células como os fibroblastos e as células endoteliais acumulam-se no local da ferida por meio de uma combinação de migração e proliferação e o estímulo que controla esses eventos provém de numerosas fontes, sendo o macrófago, que fagocita o tecido desvitalizado e libera fatores de crescimento, uma das fontes mais importantes. Portanto, é muito provável que a proliferação dos fibroblastos ter-se devido, em parte, a um efeito indireto do ultra-som, através dos macrófagos (YOUNG, 1998; YOUNG e DYSON, 1990a, 1990b).

Young e Dyson (1990a) observaram, já por volta do 5º dia após a produção de uma lesão cutânea total, em ratos, que havia um contingente consideravelmente menor de células inflamatórias, mas maior de tecido de granulação, nos animais submetidos à irradiação ultra-sônica. Também, o alinhamento dos fibroblastos nos leitos das feridas paralelamente à sua superfície nos animais tratados, contra um alinhamento aleatório naqueles não tratados, foi considerado indicativo de uma cicatrização mais avançada. Segundo os autores, esses achados sugerem que o estímulo à cicatrização pela irradiação ultra-sônica deve ter ocorrido durante a fase inflamatória do reparo.

Em animais como o rato, a contração da cicatriz, gerada por forças celulares e elementos contráteis de fibroblastos e miofibroblastos, os quais aparecem na ferida já no final da primeira e começo da segunda semana (SIMÕES, 1988), é o principal mecanismo de oclusão da ferida. Posto que nos animais irradiados o fechamento foi mais rápido, é válido propor que a irradiação ultra-sônica tenha estimulado também esse mecanismo. A observação pós-operatória dos animais não foi levada a períodos mais prolongados do que duas semanas justamente porque é nessa fase que os eventos e as diferenças entre animais tratados e não tratados são mais evidentes.

Os resultados obtidos neste trabalho vão ao encontro dos relatados na literatura, segundo os quais a irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade de fato estimula a cicatrização cutânea (ALVES, 1988; ANASTÁCIO, 2000; CAMPANELLI 2004; HILÁRIO, 1993; PESCHEN et al., 1997). Todavia, as variações nos parâmetros de irradiação, como o tempo, a frequência e a dose de aplicação, entre os diferentes autores, contribuem para que a dúvida permaneça, assim como os trabalhos de meta-análise, que sugerem não haver evidências biofísicas suficientes para afirmar que a irradiação ultra-sônica estimula a cicatrização cutânea (BAKER, ROBERTSON e DUCK, 2001; JOHANSEN, GAM e KARSMARK, 1998; ROBERTSON e BAKER, 2001).

Tendo em vista os resultados obtidos para o período compreendido entre o 7° e o 14° dias, ao se comparar a área de lesão nos grupos controle e irradiado ($p=0,002$), sugere-se que novas pesquisas sejam conduzidas no intuito de identificar em qual dia o grupo tratado apresenta melhor eficácia do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização cutânea.

9. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho com experimentação animal permitem concluir que a irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade estimula a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais, com potencial para aplicação clínica em humanos, adaptados os parâmetros de aplicação, particularmente tempo e periodicidade. Ainda, a planimetria computacional mostrou ser um recurso confiável, de baixo custo e de fácil manuseio, com o mesmo potencial de aplicação clínica.

10. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M. O., OBREGON, F. A., ROGERS, S. R., BERGAMO, L., MASSO, J., BLACK, M. A prospective, randomized, comparative study of collagenase and papain-urea for pressure ulcer debridement. **Wounds**, Thousand Oaks, v. 14, n. 8, p. 293-301, 2002.

ALVES, J. M. **Efeitos da energia ultra-sônica na regeneração de pele animal com queimadura por calor**. 1988. 79f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1988.

AMÂNCIO, A. G. **Efeitos do ultra-som terapêutico na integração de enxertos da pele total em coelhos**. 2003. 53f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

ANASTÁCIO, M. A. D. J. **Reparação epitelial em úlceras vasculares após estimulação do ultra-som pulsado de baixa intensidade**. 2000. 95f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

ARAÚJO, I. D. Fisiologia da cicatrização. In: PETROIANU, A. **Lições de cirurgia**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997. cap. 11, p. 101-109.

BAKER, K. G., ROBERTSON, V. J., DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Phys. Ther.**, Albany, v. 81, p. 1351-1358, 2001.

BARROS, A. R. B. **Efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões da epiderme de coelhos.** 2002, 40f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

BASSOLI, A. D. **Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica.** 2001. 93f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

BEVILACQUA, Cicatrização. In: GOLDEMBERG, S.; BEVILACQUA. **Bases da cirurgia,** São Paulo, Pedagógica e Universitária, 1981. cap. 7, p. 99-118.

BOUCAUD, A., MONTHARU, J., MACHET, L., ARBEILLE, B., MACHET, C. M., PATAT, F., VAILLANT, L. Clinical, histological, and electron microscopy study of skin exposed to low-frequency ultrasound. **Anat.Rec.,** New York, v. 264, n. 1, p. 114-119, 2001.

BUSSE, J. W., BHANDARI, M., KULKARNI, A. V., TUNKS, E. The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: a meta-analysis. **Can. Med. Assoc. J.,** Toronto, v. 166, n. 4, p. 437-441, 2002.

BYL, N. M., Mckenzie, A., Wong, T., West, J., Hunt, T. K. Incisional wound healing: A controlled study of low and high dose ultrassound. **J. Orthop. Sports Phys. Ther.,** Alexandria, v. 18, n. 5, p. 619-628, 1993.

CALLAM, J. M., Dale, J. J., Harper, R. D., Ruckley, V. C., Prescott, J. R. A controlled trial of weekly ultrasound therapy in chronic leg ulceration. **Lancet**, London, v. 330, n. 8552, p. 204-206, 1987.

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

CAMPANELLI, F. **Efeitos da radiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade sobre o mal perfurante plantar (MPP), manifestação cutânea decorrente da hanseníase**. 2004. 125f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. 2001. 72f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

CASAROTTO, R. Agentes acoplantes em fisioterapia: perdas acústicas e térmicas. **Rev. Fisioter. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 7, n. 1/2, p. 34-35, 2000.

CHANG, S. H. W., SUN, S. J., CHANG, P. S., LIN, C. J. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 23, p. 256-263, 2002.

FALCÃO, C. S., COELHO, B. R. A., ALMEIDA, L. E., GALDINO, M. P. A. C. Modified process of image reproduction and amplification for measurement of area by planimetry.

Application in plain wounds produced in dogs treated by occlusive skin frog dressings.

Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v. 38, n. 4, p. 165-169, 2001.

COOK, S. D., SAIKEID, S. L., POPICH-PATRON, L. S., RYABY, J. P., JONES, D. G., BARRACK, R. L. Improved cartilage repair after treatment with low-intensity pulsed ultrasound. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, (391), p. 231-243, 2001. Supplement.

CRISCI, A. R. **Estudo experimental dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a regeneração do nervo ciático de ratos após neurotomia, mediante avaliações morfológicas e morfométricas.** 2001. 73f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

CUCÉ, C. L., NETO, F. C. **Manual de dermatologia.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 1-11.

DOCKER, M. F. A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, Londons, v. 73, n. 4, p. 154-155, 1987.

DUARTE, L. R., XAVIER, C. A. M. Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. **Rev. Bras. Ortop.**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 73-80, 1983.

DYSON, M. Non-thermal cellular effects of ultrasound. **Br. J. Cancer**, London, v. 45, p. 165-175, 1982.

_____. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, London, v. 73, n. 3, p. 116-120, 1987.

DYSON, M., POND, J. B., JOSEPH, J., WARWICK, R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. **Clin. Sci.**, Philadelphia, 35, p. 273-285, 1968.

DYSON, M., FRANKS, C., SUCKLING, J. Stimulation on healing of varicose ulcers by ultrasound. **Ultrasonics**, London, v. 14, p. 232-236, 1976.

DYSON, M., SUCKLING, J. Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. **Physioterapy**, London, v. 64, n. 4, p. 105-108, 1978.

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

GAWKRODGER, J. D. **Dermatologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

GEBAUER, P. G., LIN, S. S., BEAM, A. H., VIEIRA, P., PARSONS, R. J. Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB wistar rats but does not affect cellular proliferation. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 20, p. 587-592, 2002.

GONÇALVES, G., PARIZOTTO, N. A. Fisiopatologia da reparação cutânea. Atuação da fisioterapia. **Rev. Bras. Fisiot.**, São Carlos, v. 3, n. 1, p. 5-13, 1998.

GUIRRO, R., GUIRRO, E. Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial: estudo experimental em ratos. **Rev. Ciên. Tecnol.**, Piracicaba, v. 8, n. 4, p. 37-47, 1995.

_____. **Fisioterapia dermatofuncional**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2002.

GUIRRO, R., GUIRRO, E., BREITSCHWERDT, C., ELIAS, D., FERRARI, M., RATTO, R. As variáveis físicas do ultra-som terapêutico: uma revisão. **Rev. Ciên.Tecnol.**, Piracicaba, v. 9, n. 5, p. 31-41, 1996.

GUIRRO, R., CANCELIERI, A. S., SANT'ANA, I. L. Avaliação dos meios intermediários utilizados na aplicação do ultra-som terapêutico. **Rev. Bras. Fisioter.**, São Carlos, v. 5, n. 2, p. 49-52, 2001.

HILÁRIO, M. L. **Radiação ultra-sônica de baixa intensidade na reparação tecidual de úlceras tróficas de perna**. 1993. 153f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

HOLLANDER, M., WOLPE, D. A. **Nonparametric statistical methods**. New York: John Wiley & Sons, 1973.

JOHANSEN, F., GAM, A. N., KARLSMARK, T. Ultrassound therapy in cronic leg ulceration: a meta-analysis. **Wound Repair Regene.**, St. Louis, v. 6, p. 121-126, 1998.

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

KITCHEN, S., YOUNG, S. Reparo dos tecidos. In: KITCHEN, S., BAZIN, S.

Eletroterapia de Clayton. São Paulo: Manole, 1998. cap. 3, p. 47-58.

KITCHEN, S. S., PARTRIDGE, C. J. A review of therapeutic ultrasound.

Physiotherapy, London, v. 76, n. 10, p. 593-600, 1990.

KLEIMAN, I., SIMÕES, M. J., GOLDENBERG, S. Aspectos atuais do processo de reparação tecidual. **Acta Cirurg. Bras.**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 19-21, 1987.

LAGAN, K. M, DUSOIR, A. E., McDONOUGH, S. M., BAXTER, G. D. Wound measurement: the comparative reliability of direct versus photographic tracings analyzed by planimetria versus digitizing techniques. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, Chicago, v. 81, n. 8, p. 1110-1116, 2000.

LEITE, A. J. **Quantificação da ruptura celular produzida por ultra-som em eritrócitos do sangue humano.** 1989. 125f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1989.

LERNER, A., STEIN, H. SOUDRY, M. Compound high-energy limb fractures with delayed union: our experience with adjuvant ultrasound stimulation (exogen).

Ultrasonics, London, v. 42, p. 915-917, 2004.

LOW, J., REED, A. Ultra-som terapêutico. In: _____. **Eletroterapia explicada: princípios e prática.** São Paulo: Manole, 2001. cap. 6, p. 187-228.

LOWE, A.S., WALKER, M.D., COWAN, R., BAXTER, G.D. Therapeutic ultrasound and wound closure: lack of healing effect on x-ray irradiated wounds in murine skin. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, Chicago, v. 82, n. 11, p. 1507-11, 2001.

MACGRATH, M.H., SIMON, R.H. Wound geometry and the kinetics ou wound contraction. **Plast. Reconstr. Surg.**, New York, v. 72, n. 1, p. 66-73, 1983.

MAXWELL, L. Therapeutic ultrasound: its effects on the cellular and molecular of inflammation and repair. **Physiotherapy**, London, v. 78, n. 5, p. 421-426, 1992.

McDIARMID, T., BURNS, P. N. Clinical aplications of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, London, v. 73, n. 4, p. 155-162, 1987.

MEDEIROS, G. **Uso de texturas para o acompanhamento da evolução do tratamento de úlceras dermatológicas.** 2001. 93f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

NISHIKORI, T., OCHI, M., UCHIO, Y., MANIWA, S., KATAOKA, H., KAWASAKI, K., KATSUBE, K., KURIWAKA, M. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen® gel. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, N. J., v. 59, p. 201-206, 2002.

OAKLEY, E. M. Applications of continuous beam ultrasound at therapeutic levels. **Physiotherapy**, London, v. 64, n. 6, p. 169-173, 1978.

PARVIZI, J., WU, C. C., LEWALLEN, G. D., GREENLEAF, F. J., BOLANDER, E. M. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 17, n. 4, p. 488-494, 1999.

_____. Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 20, p. 51-57, 2002.

PESCHEN, M., WEICHENTHAL, M., SCHOPF, E., VANSCHIEDT, W. Low-frequency ultrasound treatment of chronic venous leg ulcers in an outpatient therapy. **Acta Derm. Venereol. Stockh.**, Stockholm, v. 77, n. 4, p. 311-314, 1997.

PILLA, A. A., MONT, M. A., NASSER, P. R., KLAN, S. A., FIGUEIREDO, M., KAUFMAN, J. J., SIFFERT, R. S. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. **J. Orthop. Trauma**, New York, v. 4, n. 3, p. 246-253, 1990.

RAMIREZ, A., SCHWANE, A. J., McFARLAND, C., STARCHER, B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation *in vitro*. **Med. Sci. Sports Exerc.**, Madison, v. 29, n. 3, p. 326-332, 1997.

RICHARD, L. J., DAURES, P. J., RICHARD, P. C., VANNEREAU, D., BOULOT, I. Of mice and wounds: reproducibility and accuracy of a novel planimetry program for measuring wound area. **Wounds**, Thousand Oaks, v. 12, n. 6, p. 148-154, 2000.

ROBERTSON, V. J., BAKER, K. G. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. **Phys. Ther.**, Albany, v. 81, n. 7, p. 1339-1350, 2001.

ROBSON, M., RAINE, T., SMITH, D. Feridas e cicatrização. In: LAWRENCE, P. **Fundamentos em cirurgia geral**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995. cap. 11. p. 131-133.

ROCHE, C., WEST, J. A controlled trial investigating the effect of ultrasound on venous ulcers referred from general practioners. **Physiotherapy**, London, v. 70, n. 12, p. 475-477, 1984.

ROMANELLI, M., GAGGIO, G., PIAGGESI, A., COLUCCIA, M., RIZZELLO, F. Technological advances in wound bed measurements. **Wounds**, Thousand Oaks, v.14, n. 2, p. 58-66, 2002.

ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**. 4th ed. New York: International Thomson, 1995.

RUBIN, C., BOLANDER, M., RYABY, J. P., HADJIARGYROU, M. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. **Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 83, n. 2, p. 259-270, 2001.

SABISTON, D., LYERLY, K. **Sabiston fundamentos de cirurgia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SALMI, A. M., HONG, C., FUTRELL, J. W. Preoperative cooling and warming of the donor site increase survival of skin flaps by the mechanism of ischaemic preconditioning: an experimental study in rats. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg**, Stockholm, v. 33, n. 2, p. 163-167, 1999.

SAMPAIO, S. A., RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

SHAMBERGER, R. C., TALBOT, T. L., TIPTON, H. W., THIBAUT, L. E., BRENNAN, M. F. The effect of ultrasonic and thermal treatment on wounds. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 68, n. 6, p. 860-870, 1981.

SHIMAZAKI, A., TNUI, K., AZUMA, Y., NISHIMURA, N., YAMANO, Y. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. **J Bone Joint Surg Br.**, London, v. 82, n. 7, p. 1077-1082, 2000.

SIMÕES, M. L. P. Cicatrização. In: SILVA JÚNIOR, O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER JÚNIOR, A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo, Robe Editorial, 1988. cap. 23. p. 266-273.

SPEED, C. A. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. **Rheumatology**, New York, v. 40, n. 12, p. 1331-1336, 2001.

TANAKA, C., RAVAGNANI, R., HÖFLING, L., GUIMARÃES, P. C. M., MURACONETO, B., PUECH-LEÃO, P. Análise morfométrica do reparo de ulcerações de pele de origem venosa após tratamento de fisioterapia. **Rev. Fisioter. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 3, n. 1/2, p. 47-53, 1996.

TADJALLI, H. E., EVANS, G. R. D., GÜRLEK, A., BELLER, T. C., ANG, K. K., STEPHENS, L. C. Skin graft survival after external beam irradiation. **Plast. Reconstr. Surg.**, New York, v. 103, n. 7, p. 1902-1908, 1999.

TAKAKURA, Y., MATSUI, N., YOSHIYA, S., FUJIOKA, H., MURATSU, H., TSUNODA, M., KUROSAKA, M. Low-intensity pulsed ultrasound enhances early healing of medial collateral ligament injuries in rats. **J Ultrasound Med.**, Shannon, v. 21, n. 3, p. 283-288, 2002.

TER HARR, G. Basic physics of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, London, v. 73, n. 3, p. 110-113, 1987.

WANG, S. J., LEWALLEN, D. G., BOLANDER, M. E., CHAO, E. Y. S., LLSTRUP, D. M., GREENLEAF, J. F. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 12, n. 1, p. 40-47, 1994.

WEBSTER, D. F., POND, J. B., DYSON, M., HARVEY, W. The role of cavitation in the *in vitro* stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. **Ultrasound Med. Biol.**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 343-351, 1978.

WILLIAMS, R. Production and transmission of ultrasound. **Physiotherapy**, London, v. 73, n. 3, p. 113-116, 1987.

YANG, K. H., PARVIZI, J., WANG, S. J., LEWALLEN, D. G., KINNICK, R. R., GREENLEAF, J. F., et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan

gene expression in a rat femur model. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 14, n. 6, p. 802-809, 1996.

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

_____. Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. **Ultrasound Med. Biol.**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 809-816, 1990b.

YOUNG, S. Terapia por ultra-som. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, 1998. cap. 15, p. 235-258.

ZACHARIAS, D. P. M., WAITZBERG, D. L., SCHIMIDT, B., OLIVEIRA, A. S. B., GONÇALVES, E. L. Efeito da desnutrição protéica sobre a resposta cicatricial ao trauma: aspectos histológicos, histoquímicos e contração cicatricial. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 97-102, 1991.