ANA ROSA VISNARDI

EFEITO DO ULTRA-SOM DE BAIXA INTENSIDADE NO COLÁGENO DA PELE SADIA DE RATOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós–Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Bioengenharia.

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plépis

São Carlos 2007

Dedico este trabalho a minha Mãe por ter me dado todas as condições pra chegar até aqui, e à toda a minha família pelo apoio de sempre.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plépis por ter me aceitado como orientanda, por toda orientação, carinho e paciência.

Ao Prof. Dr. Maciel por todas sugestões e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Parizzoto pelas sugestões e disponibilidade para ajudar na realização das medidas de Birrefringência.

Ao Dr. Marco Andrey e ao Dr. Athanasi pelas sugestões.

Ao Prof. Oscar Peitl do laboratório Lamav da UFSCar, por ter disponibilizado o laboratório e o microscópio de luz polarizada para a realização das medidas de birrefringência. E aos alunos do Lamav por toda ajuda.

Ao Prof Dr. Carlos Benatti Neto e ao técnico José A. S. Zuanon, do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, por toda ajuda, atenção, receptividade e disponibilidade na realização das lâminas e da análise histológica.

À minha querida cunhada Parê por toda ajuda, disponibilidade e incentivo e por ter me recebido em sua casa todo o tempo que estive em São Carlos.

Ao casal Sra. Rosa e Sr. Armando Guerra por ter me recebido com tanto carinho e incentivo. Por ter me oferecido sua casa todas as vezes que estive em São Carlos.

Ao amigo Kaka por ter oferecido sua casa para minha hospedagem com muito carinho.

À minha querida sobrinha Viviane pela grande ajuda na formatação deste trabalho.

Ao Nelson do Laboratório da Bioengenharia por toda ajuda na parte experimental deste trabalho e pelos momentos de descontração. Aos funcionários da Bioengenharia: Janete e Mário, por toda ajuda, em cada etapa deste trabalho.

À amiga Giovana por toda ajuda, pelo incentivo, e companheirismo. À amiga Carla, pelas conversas informais que muito me ajudaram neste trabalho.

À Clínica de Medicina Estética Depilaser, e à Clínica Charles Yamaguchi pela compreensão da minha ausência ao trabalho e às funcionárias e amigas Milene, Bárbara e principalmente Regina, pela colaboração e paciência em organizar meus horários de atendimento. E obrigada pelo incentivo.

À Dra. Marzia por toda ajuda e incentivo neste trabalho.

À Dra. Miriam e Dra. Luciana pelas sugestões e disponibilidade.

RESUMO

VISNARDI, A. R. Efeito do ultra-som de baixa intensidade no colágeno da pele sadia de ratos. 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia. Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

O ultra-som de baixa intensidade é um recurso que vem sendo explorado em vários tipos de tecidos, inclusive a pele, porém os estudos buscam resultados em pele em reparação. Este estudo tem a finalidade de avaliar a eficácia do ultra-som de baixa intensidade no colágeno da pele sadia de ratos, visando analisar o comportamento das fibras de colágeno da derme, por meio da Birrefringência e da Análise Histológica. Foi utilizado um aparelho de ultra-som de 30 mW/cm² (SATA), modo pulsado, com fregüência de 1,5 MHz, largura de pulso de 200 milisegundos. Os animais utilizados foram 15 ratos e divididos aleatoriamente em 3 grupos (5 animais cada): Grupo Ultra-som (US), tratado com ultra-som; grupo Placebo (PL), submetido à irradiação simulada; e grupo Controle (C). A irradiação foi aplicada na pele do dorso dos animais durante 10 minutos, em 10 aplicações consecutivas com intervalo de 2 dias após a quinta aplicação. Amostras da pele dos animais foram submetidas à análise de Birrefringência com Microscopia de Luz Polarizada, através de medidas de Retardo Óptico (RO) e à Análise Histológica. As medidas de RO foram submetidas à análise estatística por meio do teste de variância Anova, com nível de significância de 5%, e ao teste de Tukey. O grupo US apresentou a menor média de RO (26,03), comparando com os grupos C (31,09) e PL (29,07) e as diferenças entre as médias foram significativas (p<0,01). Estes dados demonstram que a ação do ultra-som de baixa intensidade altera o comportamento das fibras de colágeno, causando uma desorganização das fibras uma vez que quanto maior o RO, maior a organização das fibras de colágeno. Analisando as medidas separadamente para cada camada da pele observa-se que a derme papilar e a derme reticular apresentaram o mesmo comportamento. A ação do ultra-som mostrou-se mais acentuada na camada reticular, pois esta apresentou o menor valor de média de RO (22,51). Os dados do grupo PL demonstraram que há uma ação da irradiação simulada, porém não na mesma intensidade que a do grupo US. Nas áreas adjacentes à superfície da pele irradiada, não houve ação do ultra-som, pois as médias de RO não foram diferentes estatisticamente do grupo C. Na análise histológica pode observar as fibras de colágeno do grupo US com aspecto mais compacto em relação aos demais grupos, porém num nível moderado. Conclui-se que o ultra-som de baixa intensidade, nas condições deste estudo, altera a organização das fibras de colágeno na derme, de maneira mais acentuada na camada reticular, promovendo uma desorganização das fibras.

Palavras - chaves: pele, colágeno, ultra-som de baixa intensidade, birrefringência.

ABSTRACT

VISNARDI, A. R. **The Effects of a Low Intensity Ultrasound on Health Rat Skin.** 2007. 106 f. Master (Dissertation). Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia. Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

The low intensity ultrasound is a resource that is been explored over many different kinds of tissues, including skin. However, most studies attempt only to the skin healing process. The objective of this study was to evaluate the behavior of collagen fibers in the derm when exposed to the low intensity ultrasound through birefringence and histological analysis. The ultrasound equipment used had 30 mW/cm² (SATA) pulsing model, frequency of 1.5 MHz and pulse width of 200 milliseconds. The 15 wistar rats used during the experiment were randomly divided into 3 distinct groups of 5 specimens each. The ultrasound group (US) was exposed to ultrasound; the placebo group (PL) was exposed to simulated ultrasound and the control group (C). The ultrasound irradiation was applied on the dorsal skin portion of the body for 10 minutes/day with two days rest between the sections after the fifth of the ten programmed sections. Skin samples collected were them submitted to a birefringence analysis under the polarized light microscopy and measured optical delays (RO) as well as to a histological analysis. The optical delay (RO) analyses were them statistically analyzed under the ANOVA variance with 5% significance level and to the Tukey test. The statistical analyses demonstrated that the ultrasound group (US) having the lowest average of Optical Delay (RO) of the tested specimens with an RO of 26.03 when compared with to Control Group (C) average of 31.09 and the Placebo Group (PL) 29.07 and the statistical difference between the series averages were significant (p <0.01). The data demonstrates that the low intensity ultrasound changes the behavior of the collagen fibers generating a disorganization of the fibers arrangement based on the concept that higher Optical Delay indicates a higher collagen fiber organization. Analyzing each individual skin layer was possible to see that papilar derm and reticular derm have the same behavior. The ultrasound action was more visible on the reticular derm were the Optical Delay average was 22.51. The Placebo Group also demonstrated that the simulated radiation had some effect over the area; however its level was lower than the Ultrasound Group. The skin surrounding the irradiated patch showed no change in behavior this fact was confirmed by the statistical analyses which matched the Control Group Optical delay averages. The histological analyses allowed to see a more compacted collagen aspect on the Ultrasound group than the observed on the other groups. Low intensity ultrasound, following this study conditions, changes the collagen fiber structure of the derm, presenting high intensity disorganization on the reticular layer.

Key words: skin, collagen, low intensity ultrasound, birefringence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arquitetura típica da pele. Observa-se a epiderme (a), a derme (b) e a hipoderme (c).
Modificado de GUIRRO & GUIRRO, (2002)20
Figura 2. Aspecto histológico da pele normal (visão geral): (a) epiderme, (b) derme, (c) folículo piloso,
(d) glândula sebácea (HORIBE, 2000)21
Figura 3. (A) Microscopia eletrônica da derme papilar e reticular DP: derme papilar, PSP:Plexo
subpapilar, DR: derme reticular 525 X; (B) Microscopia óptica da derme papilar e reticular DP, DR,
PSP,300X; (C) Microscopia óptica, da derme papilar, El: fibras elásticas, 700X Modificado de
Freedberg, et al, 200522
Figura 4. Microscopia de luz polarizada da derme demonstrando a trama tridimensional das fibras de
colágeno25
Figura 5. Microscopia de luz polarizada de tendão demonstrando a orientação das fibras de colágeno.
Modificado de ROSA, (2007)25
Figura 6. Representação da classificação do tecido conjuntivo
Figura 7. Deslocamento da pele sob uma constante força de tensão. Onde, ξ_e : deformação elástica da
pele, ξ_{ve} : fase de viscoelasticidade, $\xi_{s:}$ constante de deslizamento Modificada de (KATHYR et al,
2004)
Figura 8. Linhas de Langer. (A) Face Anterior. (B) Face Posterior. Modificado de GUIRRO e GUIRRO,
(2002)
Figura 9. Esquema da hélice tripla da molécula de colágeno. (A): cadeia alfa, (B): hélice tripla.
Modificado de ALBERTS, (1994)32

Figura 10. Organização fibrilar do colágeno durante a fibrilogênese. Adaptado de NIMNI, (1988)33
Figura 11. Aparelho de Ultra-som terapêutico de baixa intensidade, desenvolvido pelo Laboratório de
Bioengenharia da EESC utilizado neste estudo49
Figura 12. Depilação digital do animal50
Figura 13. (A) Demonstração da área tratada e (B) da aplicação do ultra-som no dorso do animal50
Figura 14. Anestesia intramuscular do animal
Figura 15. (A) Demonstração do retalho da pele do dorso do animal e (B) detalhe do retalho52
Figura 16. Gráfico Box Plot para representação das médias de RO em nm dos grupos C, US e PL, com
desvio padrão e valores máximos e mínimos61
Figura 17. Gráfico Box-Plot para representação das médias de RO em nm da camada papilar da
derme dos grupos C, US e PL, com desvio padrão e valores máximos e mínimos63
Figura 18. Gráfico Box-Plot para representação das médias de RO em nm da camada reticular da
derme dos grupos C, US e PL, com desvio padrão e valores máximos e mínimos65
Figura 19. Gráfico Box-Plot para representação das médias de RO em nm da derme dos grupos C, US
e PL, incluindo os subgrupos USpescoço e PLpescoço com desvio padrão e valores máximos e
mínimos67
Figura 20. Imagem referente à observação qualitativa da análise de Birrefringência total por meio de
microscopia de luz polarizada da pele do grupo US69
Figura 21. Imagem referente à observação qualitativa da análise de Birrefringência total por meio de
microscopia de luz polarizada da pele (a) derme papilar, (b) derme reticular. (A) grupo C; (B)
Grupo US; (C) Grupo PL70

Figura 22. Imagens referentes à observação qualitativa da análise de Birrefringência total por meio de
microscopia de luz polarizada da pele. Derme papilar (A) grupo C, (C) grupo US e (E) grupo PL.
Derme reticular (B) grupo C, (D) grupo US e (F) grupo PL71
Figura 23. Imagem referente à observação qualitativa da análise de Birrefringência total por meio de
microscopia de luz polarizada da pele. (A). grupo USpescoço; (B). grupo US; (C). grupo
PLpescoço; (D) . grupo PL72
Figura 24. Grupo C, aumento 100 X, (a) estrato epitelial, (b) folículo piloso. Coloração Tricômio de
Massom74
Figura 25. Grupo C, 400X, fibras de colágeno na disposição (a) longitudinal e (b) transversal, (c)
fibroblasto. Coloração Tricômio de Masson74
Figura 26. Grupo C. (A) – aumento 100X , (B) - aumento 200X, (C) - aumento 400X. Coloração
Hematoxilina-Eosina75
Figura 27. Grupo C. (A) –200X –, derme papilar e reticular. (B) - 400X, derme papilar e reticular. (C) -
400X, derme reticular. Coloração Tricômio de Masson77
Figura 28. (A) e (B) - Grupo US, aumento 200X , (C) e (D) –Grupo C, aumento 200X. (A) e (C)
coloração Hematoxilina-Eosina, (B) e (D) coloração Tricômio de Masson
Figura 29. Grupo US. Coloração Hematoxilina-Eosina. (A) e (B) - aumento 400X
Figura 30. (A), (B) e (C) Grupo US, coloração Tricômio de Masson, (A) e (B) aumento 200X e (C)
aumento 400X80
Figura 31. (A) Grupo PL, 400X; (B) Grupo PL 400X; (C) Grupo PL, 200X; (D) Grupo US 400X; (E)
grupo US 400X; (F) Grupo US 200X. (A) e (D) coloração Tricômio de Masson, (B), (C), (E) e (F)
coloração Hematoxilina-Eosina81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise das médias de RO em nm da derme por meio dos testes estatísticos Anova e Tukey
Tabela 2. Análise das médias de RO em nm da derme papilar, por meio dos testes Anova e Tukey62
Tabela 3. Análise das médias de RO em nm da camada reticular da derme por meio do teste Anova e
Tukey64
Tabela 4. Análise das médias de RO em nm dos grupos C, US, PL incluindo os subgrupos USpescoço
e PLpescoço, da derme por meio do teste Anova e Tukey66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
3.1 PELE	20
3.1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA PELE	24
3.1.2 COLÁGENO	
3.1.3 BIRREFRINGÊNCIA DO COLÁGENO	34
3.2 ULTRA-SOM	37
3.2.1 INTERAÇÃO DO ULTRA-SOM COM TECIDO BIOLÓGICO	
3.2.1.1 EFEITO TÉRMICO	40
3.2.1.2 EFEITOS NÃO TÉRMICOS	41
3.2.3 ULTRA-SOM E COLÁGENO	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Animais	48
4.2 Tratamento	49
4.3 Coleta de material	51
4.4 Preparação das lâminas	53
4.5 Análise Histológica	54
4.6 Análise da Birrefringência	54
4.7 Análise Estatística	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Análise da birrefringência	58

5.1.1 Análise Quantitativa	59
5.1.2 Análise Qualitativa	68
5.2 Análise Histológica	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8. APÊNDICES	96
APÊNDICE A – ROTINA HISTOLÓGICA E COLORAÇÕES	96
APÊNDICE B – MEDIDAS DE RO (nm) DOS GRUPOS	100
9. ANEXOS	106
ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	

1. INTRODUÇÃO

Um fato notório na cultura brasileira é a busca pelo padrão estético social que vem crescendo nos últimos anos e atingindo diferentes classes sócio-econômicas. O mercado de Medicina Estética atual oferece uma diversidade de recursos para atender a demanda do consumidor brasileiro, dentre eles o ultra-som terapêutico.

Dentre as queixas de pacientes que procuram as clínicas de Medicina Estética, pode-se salientar o anseio dos pacientes na busca por métodos menos invasivos para a obtenção do rejuvenescimento, com melhor custo benefício, uma vez que a maioria dos tratamentos apresenta valores ostensivos.

O mercado da Medicina Estética atual nos apresenta, entre uma vasta oferta de tratamentos estéticos, um elevado número de equipamentos ultra-sônicos terapêuticos para atuar em tratamentos corporais. Este recurso se enquadra como método não invasivo e de baixo custo, com indicações de aumento da firmeza e elasticidade da pele. Como efeito do ultra-som terapêutico é anunciado um efeito de estímulo ao colágeno e em sua extensibilidade, supostamente melhorando a elasticidade e a sustentação da pele (EBAY, 2007). No entanto, há uma escassez de estudos que mostrem a ação do ultra-som em colágeno de tecidos sadios, sem lesão natural ou por segunda intenção. A maioria dos estudos busca resultados em colágeno do tecido cutâneo em processo de reparação tecidual. Os achados científicos sobre a ação do ultra-som no tecido conjuntivo e nos elementos da matriz extracelular encontrados são em tendões e ligamentos e poucos são os registros sobre fibras de colágeno da pele.

Diante destas evidências torna-se oportuna a viabilização do estudo experimental que busque calçar estes apontamentos do mercado atual com achados científicos. Segundo YOUNG e DYSON, (1990) o efeito benéfico do ultra-som tem sido demonstrado sobre diversos tecidos, inclusive a pele, destacando o aumento da angiogênese, do tecido de granulação, do número de fibroblastos e da síntese de colágeno, e a diminuição de leucócitos e macrófagos, dentre outros.

O uso do ultra-som na fisioterapia vem se moldando conforme as pesquisas embasam seus efeitos e segundo HAAR, 1999, com o passar dos anos tem-se dado preferência para a utilização de ultra-som com intensidades menores, visando os efeitos não térmicos.

O ultra-som de baixa intensidade vem sendo investigado conforme WEBSTER et al, (1978) e DUARTE e XAVIER, (1983) e efeitos benéficos vêm sendo demonstrados, sobretudo no modo pulsado, em diferentes tipos de tecidos biológicos, apontando a minimização de risco de lesões teciduais que podem ocorrer em doses elevadas e no modo contínuo. Uma vez que esta modalidade de ultra-som terapêutico apresenta efeito sobre diversos tipos de tecidos, torna-se perpicaz a investigação de sua ação na pele sadia.

Um equipamento ultra-sônico de baixa intensidade de 30 mW/cm² (SATA) desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia da EESC vem sendo atualmente, a ferramenta de investigações de estudos experimentais e clínicos, principalmente sobre seu efeito na cicatrização de diversos tecidos biológicos, dentre eles osso, músculo e pele (BASSOLI, 2001). Esses estudos ratificaram a necessidade atual da ampliação e aprofundamento dos estudos que envolvam todas as possíveis aplicações do ultra-som de baixa intensidade.

Surgiu então o desejo de investigar a ação do ultra-som no tecido sadio, especificamente, a pele sadia, para avaliar o eventual efeito morfométrico do Ultra-som sobre as fibras de colágeno, independente das reações inflamatórias que pudessem vir a acontecer sob a influência de um processo cicatricial causado por lesões externas intencionadas ou não. Em vista do desenvolvimento das pesquisas com o ultra-som de baixa intensidade, optou-se por esta modalidade para dar continuidade e explorar em todo seu contexto, a sua ação nos distintos tipos de tecido e em diferentes situações fisiológicas.

Poucos estudos sobre a influência do ultra-som em tecido sadio foram encontrados. Dentre eles pode-se mencionar LOPES, (2005), onde estudou o efeito do ultra-som pulsado e contínuo de 1 MHz na morfometria do tecido muscular, onde não encontrou relação na influência do ultra-som na variação da área da célula muscular. Foi utilizado intensidade máxima de 3W/cm², em tecido muscular sadio do músculo vasto lateral de coelhos, em 10 aplicações consecutivas. Com esta metodologia concluiu-se que o Ultra-som não produz efeitos morfométricos no tecido muscular sadio de coelhos.

Somado a este contexto, o outro grande fator estimulante deste estudo, foi a atual apresentação do recurso ultra-som no mercado da medicina estética. O ultra-som terapêutico vem se mantendo sob a sombra de uma mídia, caracterizada forte, decisiva e extremamente influente na classe consumidora, onde atribui a seus efeitos, uma ação rejuvenescedora da pele (BABBIT, 2007).

Sendo um recurso com baixo custo, fácil manipulação, transporte, armazenamento e operação, pode ser instalado em qualquer espaço físico, e sob um contexto sócio-econômico favorável à adesão do ultra-som às clínicas que seguem a tendência do atual mercado, este recurso vem correntemente sendo muito utilizado. Além disso, a mais atual apresentação deste recurso, é a versão portátil domiciliar, onde o próprio paciente adquire seu equipamento e o utiliza em casa, sem orientação de profissional da área médica, apenas seguindo as instruções do fabricante. (EBAY, 2007).

Seus efeitos são anunciados como rejuvenescimento da pele, melhora de firmeza da pele, melhora de estrias e cicatrizes, com melhora da suavização e textura da pele, aumento do fluxo sanguíneo e da síntese de colágeno (EBAY, 2007).

Com o intuito de averiguar esta ação do ultra-som descrita acima, este trabalho visa estudar o efeito deste recurso físico nas fibras de colágeno da pele sadia de ratos, sem estar sob nenhum processo inflamatório, utilizando análise histológica e de birrefringência do colágeno.

A aplicabilidade prática deste estudo poderia relacionar-se à extensão destes resultados a clínica diária. Assim, podemos exemplificar três diferentes situações em que pacientes podem se beneficiar do conhecimento médico aprofundado acerca deste tema: o tratamento de rejuvenescimento da pele, tratamento de flacidez de pele, melhora da qualidade e da firmeza da pele. Além disso, este constituiria sem dúvida, um dos recursos de menor custo para o usuário e para a clínica, dentre os recursos existentes hoje, na prática da Medicina Estética e da Fisioterapia Dermato-Funcional.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é verificar se há ação do ultra-som de baixa intensidade sobre as fibras de colágeno da pele sadia em ratos.

Para isso foi proposto um estudo da pele dos animais tratados com ultra-som por meio da análise histológica e da birrefringência do colágeno da pele.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 PELE

A pele é formada por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica que se arranjam em três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1 e 2). Esta última não é considerada por alguns autores como integrante da pele, porém é estudada dentro do tecido tegumentar. A pele constitui uma barreira eficiente contra agressores exógenos, de natureza química ou biológica e impede a perda de água e de proteínas para o exterior. A pele também age como órgão sensorial, participa do sistema imunológico, da regulação da temperatura corpórea, da produção de vitamina D3, da excreção de eletrólitos e outras substâncias, entre outras funções. Ela é considerada o maior órgão humano, (SOUZA & VARGAS, 2004).



Figura 1. Arquitetura típica da pele. Observa-se a epiderme (a), a derme (b) e a hipoderme (c). Modificado de GUIRRO & GUIRRO, (2002)



Figura 2. Aspecto histológico da pele normal (visão geral): (a) epiderme, (b) derme, (c) folículo piloso, (d) glândula sebácea (HORIBE, 2000)

A espessura da pele apresenta uma variação considerável de 0,5 a 4 mm. A derme apresenta em média 2 mm de espessura (GUIRRO & GUIRRO, 2002). A variação na espessura pode ir de 4 a 5 mm na região das costas e 1 mm nas pálpebras (ROOK, 1998).

A derme de origem mesodérmica é dividida em duas porções: derme papilar e derme reticular. O limite entre elas é dado pelo plexo vascular superficial, que se situa pouco abaixo da base dos cones epidérmicos (SOUZA e VARGAS, 2004), este plexo também é chamado de Plexo Subpapilar. A derme é formada por fibras colágenas e fibras elásticas, inclusas na substância fundamental amorfa, (Figura 3) todos produzidas pelos fibroblastos. Na derme encontram-se vasos, nervos e músculos eretores do pêlo, além dos anexos cutâneos (LEVER e SHAUMBURG-LEVER, 1991 e FREEDBERG et al., 2005).



Figura 3. (A) Microscopia eletrônica da derme papilar e reticular DP: derme papilar, PSP:Plexo subpapilar, DR: derme reticular 525 X; (B) Microscopia óptica da derme papilar e reticular DP, DR, PSP,300X; (C) Microscopia óptica, da derme papilar, EI: fibras elásticas, 700X Modificado de Freedberg, et al, 2005

A porção papilar da derme contém um maior número de fibroblastos do que na derme reticular, e as fibras de colágeno constituídas principalmente por colágeno tipo III, são mais finas, não se agrupando em feixes, como ocorre na derme reticular (SOUZA e VARGAS, 2004 e FREEDBERG, et al., 2005).

Na derme reticular os feixes de colágenos são constituídos por colágeno tipo I, correm em vários sentidos, de forma que são cortadas longitudinalmente, transversais e obliquamente, mas todos se encontram em planos paralelos à superfície cutânea. Os feixes são permeados por colágeno tipo III. Nesta porção da derme as fibras de colágeno se mostram mais espessas, curtas, curvas, retorcidas e paralelas à superfície (SOUZA e VARGAS, 2004 e FREEDBERG, et al., 2005).

Envolvendo as unidades pilosebáceas, as glândulas écrinas e apócrinas e os vasos sanguíneos constituintes da derme, também há uma malha delgada de fibras colágenas semelhante àquela presente na derme papilar, denominada de derme perianexial. Por esta razão, a derme papilar e perianexial são consideradas uma unidade anatômica chamada de derme adventicial (LEVER e SHAUMBURG-LEVER, 1991 e FREEDBERG et al., 2005).

As fibras elásticas são encontradas entrelaçadas entre as fibras de colágeno, são mais finas e onduladas (Fig.3). Na derme papilar, elas formam um plexo intermediário de fibras elauninas, que também seguem paralelas à superfície e mais superficialmente as fibras oxitalâmicas seguem perpendiculares à junção dermoepidérmica, arborizando-se nas papilas dérmicas (SOUZA e VARGAS, 2004; LEVER e SHAUMBURG-LEVER, 1991; ROOK, 1998 e FREEDBERG et al., 2005).

Ainda encontra-se na derme a presença de fibras reticulares, as quais consistem em um tipo especial de fibra colágena delgada medindo de 0,2µm a 1µm de diâmetro correspondendo à distribuição de colágeno tipo III. São as primeiras fibras a serem formadas durante a vida embrionária e em várias condições patológicas onde se tem uma aumenta da atividade fibroblástica. Na pele normal, o colágeno está sendo continuamente substituído e o colágeno neoformado consiste de fibras grandes, entretanto há poucas áreas, nas quais fibras colágenas normalmente pequenas estão presentes sob a forma de fibras reticulares, sem se transformarem em maiores fibras colágenos posteriormente. Já em condições patológicas, como em feridas, há uma abundância das fibras reticulares, onde os fibroblastos ativos formam novos colágenos em forma de fibras reticulares e posteriormente são gradualmente substituídas por fibras de colágeno grandes à medida que se tem lugar a resolução da ferida (LEVER e SHAUMBURG-LEVER, 1991).

Com a finalidade de localizar melhor certos processos médicos HORIBE (2000) sugere outra divisão da derme: derme superficial, derme média e derme profunda.

A substância Fundamental Amorfa preenche os espaços entre as fibras e os feixes de colágeno, constituída de glicosaminoglicanos, ou mucopolissacarídeos ácidos, denominados proteoglicanos quando unidos covalentemente a cadeias peptídicas formando complexos de maior peso molecular (LEVER e SHAUMBURG-LEVER, 1991).

3.1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA PELE

A característica mais importante das propriedades físicas da pele é sua variedade no mesmo indivíduo. Cada parte da pele é unicamente construída e todas as propriedades físicas da pele depende principalmente da dupla rede de colágeno e elastina, a qual constitui a maior parte da derme e o molde de sua arquitetura entrelaçada (GIBSON 1977). A derme é responsável pela flexibilidade, elasticidade e pela capacidade de estiramento da pele (FREEDBERG et al., 2005).

O tecido conjuntivo constituinte da derme é classificado como tecido conjuntivo denso irregular, uma trama tridimensional de feixes de colágeno, conferindo ao tecido certa resistência às trações em qualquer direção (Figura 4).



Figura 4. Microscopia de luz polarizada da derme demonstrando a trama tridimensional das fibras de colágeno

O tecido conjuntivo denso também pode ser classificado como regular, onde os feixes de colágeno são orientados seguindo uma organização fixa, em resposta a trações exercidas num determinado sentido, como por exemplo, nos tendões musculares. O tecido conjuntivo denso regular pode ser visto na Figura 5.



Figura 5. Microscopia de luz polarizada de tendão demonstrando a orientação das fibras de colágeno. Modificado de ROSA, (2007)

O tecido conjuntivo e a sua classificação (GUIRRO E GUIRRO, 2002), está representado na Figura 6.



Figura 6. Representação da classificação do tecido conjuntivo

Tanto a espessura da pele e suas propriedades viscoelásticas não dependem apenas da quantidade de material presente na derme, mas também de sua organização estrutural (VITELLARO-ZUCCARELLO, 1994).

Para FREEDBERG (2005) e HERMANNS (2004) as características mecânicas da pele dependem da interdependência das estruturas constituintes, principalmente no que se refere ao mecanismo de transmissão de cargas, ou de forças, já que a pele é um complexo de tecidos e heterogênea.

As propriedades físicas da pele podem ser divididas em três grupos: propriedades viscoelásticas, propriedades de tensão da pele e propriedades de extensibilidade da pele. Normalmente se confunde tensão natural da pele e extensibilidade da pele, e são incorretamente chamados de elasticidade. Eles são certamente inter-relacionados. A tensão da pele é de particular importância na cicatrização de feridas. (GIBSON 1977).

As fibras de colágeno da pele são estruturas extremamente longas comparadas com seu diâmetro. Em seu estado relaxado, apresentam-se torcidas. (Fig. 4) Elas parecem ser randomicamente orientadas e entrelaçadas uma com as outras e ainda, quando a pele é estirada em uma direção as torções endireitam-se. Além disso, quando há um estiramento e a carga aumenta gradativamente, um crescente número de fibras tornam-se alinhados na direção da força de estiramento, até finalmente haver uma estrutura de fibras paralelas, as quais tornam-se mais resistentes para uma próxima extensão. Este comportamento impõe um limite na extensibilidade da pele naquela direção e constitui a base da típica curva de estresse/tensão da pele. A rede formada por estas estruturas proporciona uma livre mobilidade da pele para permitir uma vasta margem de movimentos corporais, porém há um limite embutido para a quantia de extensão (GIBSON, 1977).

As fibras de elastina da derme são muito mais finas que as de colágeno e sua função é retornar a deformidade da rede para a condição de relaxamento, retornando à sua forma original após distenção, já que o colágeno é inestensível, embora sua disposição ondulada da derme possibilite a pele esticar um pouco (LEVER e SHAUMBURG-LEVER, 1991 e FREEDBERG et al., 2005). Na figura 4, pode-se observar de modo apurado por meio da microscopia eletrônica como os dois sistemas de fibras estão integrados e podem interagir para proporcionar à derme propriedades de firmeza e resistência mecânica.

Como uma microarquitetura móvel requer um lubrificante, provavelmente proporcionado por substâncias de mucopolissacarídeos que fluem ao redor e por entre as fibras. O colágeno está sempre associado com uma cobertura de mucopolissacarídeo (GIBSON 1977).

Conforme Agache (2000), citado por Khatyr et al (2004), quando a pele é submetida à uma escala de tensão, pode-se obter uma curva dividida em 3 fases conforme figura abaixo. A primeira fase (ξ_e) corresponde a deformação elástica, a segunda fase (ξ_{ve}) de deslizamento variável, corresponde à

fase de viscoelasticidade e a terceira fase (ξ_s) corresponde à fase de constante deslizamento (Figura 7).



Figura 7. Deslocamento da pele sob uma constante força de tensão. Onde, ξ_e : deformação elástica da pele, ξ_{ve} : fase de viscoelasticidade, ξ_s : constante de deslizamento Modificada de (KATHYR et al, 2004)

Sasaki, 1996, estudando a curva de tensão/distenção do colágeno, sugere a existência de um componente viscoelástico dentro da molécula de colágeno e uma diferença nas propriedades mecânicas do colágeno pra cada tipo de tecido e relaciona ainda a suposta viscoelasticidade com a rede de ligações de hidrogênio na molécula de colágeno.

Segundo GUIRRO e GUIRRO, (2002) e GIBSON, (1977) as linhas de Langer (Figura 8), também chamadas de linhas de fenda, correspondem à orientação dos feixes conjuntivos elásticos, que indicam, portanto, a direção de menor distensibilidade, ou seja, de resistência da pele à tração. As linhas também são chamadas de linhas de clivagem, com as quais é possível esquematizar verdadeiros mapas utilizados pelos cirurgiões plásticos. Na direção perpendicular às linhas de fenda a pele apresenta máxima distensibilidade.



Figura 8. Linhas de Langer. (A) Face Anterior. (B) Face Posterior. Modificado de GUIRRO e GUIRRO, (2002)

Quando há um processo de reparo, na fase final ocorre a remodelagem do tecido imaturo e da matriz que se forma na fase proliferativa e que será substituída ao longo de meses ou anos até ocorrer maturação do tecido cicatricial. Com o passar do tempo as fibras de colágeno reorientam-se ao longo das linhas de tensão, aumentando a resistência tênsil do tecido (KITCHEN; PATRIGE 1990).

A tensão da pele decresce com a idade e marcas resultantes de flacidez, do envelhecimento estarão evidentes (GIBSON, 1977 e ORIÁ et al., 2003).

Devido às suas propriedades físicas, a pele é considerada anisotrópica (GIBSON, 1977).

Estruturas isotrópicas apresentam sempre o mesmo comportamento para determinado fenômeno, independente da direção analisada, ao contrário das estruturas anisotrópicas. No caso da luz, cristais anisotrópicos apresentam valores distintos de índices de refração em função da direção de

propagação da luz ao atravessá-los. O caráter anisotrópico verificado nas amostras de pele pode ser atribuído às fibras de colágeno, estruturas agregadas e ligadas com alta ordem molecular. Este estado de agregação com elevado grau de cristalinidade muito bem estabelecido é fundamentado pela sua Birrefringência, propriedade esta permitida somente para estruturas anisotrópicas (VIDAL, 1987).

Segundo ROOK, 1998, as fibras de colágeno são birrefringentes sob luz polarizada.

3.1.2 COLÁGENO

A principal função fisiológica das fibras de colágeno na pele é promover as propriedades de tensão que permitem que a pele sirva como órgão de proteção contra traumas externos. (FREEDBERG et al., 2005).

O colágeno é a proteína mais abundante do organismo dos animais. É a principal estrutura protéica do tecido conjuntivo, contem os aminoácidos, glicina, prolina e hidroxiprolina em quantidades que representam 2/3 de seu conteúdo total (FRANÇA, 2002).

As fibras de colágeno começam a aparecer durante o desenvolvimento embrionário no processo inicial de diferenciação dos tecidos. Mais tarde tornam-se responsáveis pela integridade dos tecidos dos ossos, da cartilagem, da pele, de estruturas de vasos sanguíneos e de outros órgãos. Com resistência à tração, a principal função do colágeno é acomodar e modular as forças mecânicas e internas que são exercidas no organismo (NIMNI, 1988a).

Os colágenos dos tipos I, II, III e IV são os mais comuns e já se conhece 28 tipos de colágeno, conforme GUIDO et al, (2006).

As proporções relativas de cada tipo de colágeno são específicas de cada tecido. Na derme, predomina o colágeno tipo I, porém outros três tipos de colágenos também estão presentes em menor escala, os tipos III, IV e V. (FREEDBERG et al., 2005,). O colágeno tipo II é encontrado na cartilagem e no humor vítreo. O tipo III também é presente nos músculos das paredes arteriais e nas fibras reticulares. O tipo IV está presente na membrana basal. O tipo V está presente tanto nas artérias como nas membranas profundas da epiderme na pele. As proporções dos diferentes tipos de colágeno alteram conforme o tempo no mesmo tecido (MINOR, 1980).

O comprimento de um filamento de colágeno é de 300 nm e seu diâmetro é de 1,5 nm, e ele é formado fundamentalmente por uma unidade denominada tropocolágeno. Na derme normal, a espessura das fibrilas colágenas varia de 70 nm a 140nm, a maioria das fibrilas tem aproximadamente 100nm de espessura (LEVER e SHAUMBURG-LEVER, 1991). Para ROOK, (1998), o diâmetro da fibrila de colágeno aumenta progressivamente da derme superficial, para a média e para a mais profunda, aumentando de aproximadamente 20 nm à 70 nm.

O tropocolágeno é constituído por três cadeias polipeptídicas denominadas α , que possuem forma helicoidal. Estas cadeias enrolam-se umas nas outras formando a hélice tripla (Figura 9), através das ligações de hidrogênio, que estabilizam a estrutura (NIMMI, 1988b).



Figura 9. Esquema da hélice tripla da molécula de colágeno. (A): cadeia alfa, (B): hélice tripla. Modificado de ALBERTS, (1994)

Essa estabilidade na hélice é necessária para garantir a secreção normal do colágeno e isso faz com que a molécula nativa de colágeno resista à clivagem por todas as proteases, exceto pela colagenase (MINOR, 1980).

O arranjo dos aminoácidos nas cadeias α consiste em tripletes em que o terceiro resíduo é a glicina. A forma mais comum, correspondente a 1/3 das estruturas é o tipo (Gly-X-Y), as posições X e Y das seqüências de repetição podem ser ocupadas por uma variedade de aminoácidos, exceto os que contém enxofre, mas em geral a posição X é ocupada por Prolina, e a Y ocupada por Hidroxiprolina. (FREEDBERG et al., 2005; NIMNI, 1988a).

As moléculas de tropocolágeno interagem entre si, formando as microfibrilas, menor unidade estrutural do tecido conjuntivo. Estas, também se agregam formando as fibrilas. Estas fibrilas, por sua vez, não possuem uma resistência tênsil até que as moléculas sejam ligadas umas às outras por ligações covalentes específicas conhecidas como ligações cruzadas, formando assim as fibras que compõem a matriz colagênica dos tecidos (FREEDBERG et al., 2005). Este processo, em que as

moléculas de colágeno se organizam ordenadamente *in vitro* é chamado fibrilogênese (Figura 10) e é dependente da temperatura, pH e força iônica do meio. (NIMNI, 1988b).



Figura 10. Organização fibrilar do colágeno durante a fibrilogênese. Adaptado de NIMNI, (1988)

Independente do tecido lesado, o colágeno é, do ponto de vista funcional, o componente mais importante na reparação de tecidos (THORTON e BARBUL, 1997; SAVASSI – ROCHA e LOPES, 1994; GOTTRUP, 1981).

As propriedades físicas e mecânicas das fibras de colágeno são determinadas pelo nível de agregação e estrutura molecular de seus componentes. Através de sua característica anisotrópica, chamada de birrefringência, detecta-se e mede-se, as variações do estado de organização do colágeno em processo de reparação (VIDAL, 1990).

3.1.3 BIRREFRINGÊNCIA DO COLÁGENO

A birrefringência é a anisotropia óptica devida à diferença de índices de refração do objeto, o que significa propagação de luz com velocidades e direções diferentes, ou seja, as propriedades ópticas não são as mesmas em todas direções numa mesma amostra. A anisotropia está presente em muitas substâncias cristalinas (sólidos cujos átomos se distribuem de uma maneira regular). (VIDAL, 1987)

A anisotropia óptica é um fenômeno de ordem espectral que identifica componentes macromoleculares. Materiais biológicos são identificados dependendo do grau de agregação e cristalinidade. As propriedades anisotrópicas são importantes para o diagnóstico de patologias e para o estudo da ordem molecular dos componentes celulares. No tocante do colágeno a microscopia de polarização pode dar informações de natureza micromorfológica, pois evidencia o fenômeno de birrefringência textural ou de forma que depende da geometria das moléculas, da concentração dos feixes de colágeno e da diferença entre seus índices de refração (CUNHA, 2001).

A cristalinidade é definida como a medida de grau de ordem das moléculas no polímero. A cristalinidade é afetada pela regularidade estrutural e pela mobilidade das cadeias de polímero, pela presença de cadeias laterais repetidas que permitem ligações intermoleculares e pela ausência de cadeias laterais carregadas que interferem na formação do cristal (MILLER & KROCHTA, 1997).

Segundo ANGELO Jr. (2000), o estudo das propriedades anisotrópicas do colágeno através da técnica de microscopia de polarização, permite determinar as modificações do nível de agregação dos biopolímeros, possibilitando uma interpretação das bases moleculares e do arranjo dos componentes da matriz extracelular envolvidos no processo como fibrilogênese, ossificação, inflamação e envelhecimento.

Segundo VIDAL (1964), os tendões apresentam características biofísicas de ordem molecular que lhes conferem a qualidade de estrutura polimérica anisotrópica, caracterizada pela ausência de simetria interna, por exibirem mais de um índice de refração para direções determinadas e diferentes de propagação da luz. Essa característica do tendão é em função do arranjo hierarquizado de agregados fibrilares de colágeno.

Nas fibras de colágeno dois tipos de birrefringência podem ser detectados (VIDAL, 1964 e 1986): a birrefringência textural ou de forma e a birrefringência intrínseca.

A birrefringência textural ou de forma resulta da compatibilidade dos comprimentos de onda (λ) com as dimensões da molécula e também com a alternância ordenada da grade molecular. As informações sobre a birrefringência textural ou de forma de um corpo são obtidas por meio de medidas acuradas de Retardo Óptico (RO).

A birrefringência intrínseca deve-se a transições de elétrons nas ligações peptídicas planares ao longo do eixo das fibras de colágeno (VIDAL, 1986). O índice de refração pode ser descrito sendo uma função da polarizabilidade dos elétrons que transitam nas ligações peptídicas planares da molécula de colágeno.

Segundo VIDAL, (1986) Birrefringência expressa-se pela equação

$$B = \left(n_e - n_o\right) \tag{1}$$

Sendo B = Birrefringência

n_e = índice de refração na direção de propagação do raio extraordinário
n_o= índice de refração na direção de propagação do raio ordinário

e o Retardo Óptico (RO) pode ser expressado por

$$RO = (n_e - n_o) \cdot t \tag{2}$$

Sendo RO = Retardo Óptico

t = índice de espessura do material estudado

A medida do Retardo Óptico (RO) em água, corresponde à soma das birrefringências de forma e intrínseca do colágeno. (VIDAL, 1987b).

É conhecido que o brilho de birrefringência, observado ao microscópio de luz polarizada, é função do retardo óptico, o qual é diretamente proporcional ao estado de organização de materiais birrefringentes (VIDAL, 1986).

Na literatura encontram-se estudos que utilizam a birrefringência total e a microscopia de polarização como metodologia para medidas quantitativa e qualitativa de colágeno, principalmente em tendões e ligamentos (KOEKE, 2003; CUNHA, 2001; VIDAL e CARVALHO 1990; VIDAL, 1986, PIMENTEL, 1981).

Apesar de ser escasso na literatura a análise de birrefringência do colágeno em pele, o estudo de SILVA (2002), observou a birrefringência da pele, para avaliar a eficácia da irradiação de laser He-Ne linearmente polarizado em tecido queimado. Amostras de pele queimada foram irradiadas por laser e comparadas com amostras de pele sadia através das medidas de retardo óptico, onde se concluiu que a direção de polarização do campo elétrico (do laser) afeta o processo cicatricial de queimaduras, particularmente na organização do colágeno da derme. Os parâmetros de organização das fibras de colágeno utilizados foram os da pele sadia, com as guais puderam ser comparados.
3.2 ULTRA-SOM

O Ultra-som é uma onda mecânica longitudinal, não audível pelo ser humano, com freqüência acima de 20 KHz, sendo a energia transmitida pelas vibrações das moléculas do meio pelo qual a onda é propagada (GUIRRO & GUIRRO, 2002). Para que a propagação ocorra é necessário que se tenha um meio deformável, podendo ser sólido, liquido ou gasoso (FISH, 1996).

Em 1917, iniciou-se a utilização do ultra-som com a criação de sonares para a detecção de submarinos, utilizando o método pulso-eco. Com o passar do tempo, a utilização do ultra-som mostrou um efeito de aumento de temperatura de tecidos biológicos submetidos ao campo acústico. Assim sendo passou a ser empregado na medicina como recurso terapêutico para produzir calor em tecidos profundos por volta de 1930 e 1940. Desde então o ultra-som vem sendo utilizado em áreas médicas e pesquisas se desenvolvem para elucidar seus efeitos (OKUNO; CALDAS e CHOW, 1986). Atualmente o ultra-som terapêutico e muito utilizado na prática clínica da Fisioterapia e alcançou grande espaço nas clínicas de Medicina Estética, para tratamentos corporais.

Um transdutor ultra-sônico consiste de uma cerâmica piezelétrica, com diâmetro maior que a espessura, onde a freqüência de trabalho é determinada pela espessura do disco. Um transdutor é basicamente um dispositivo que converte uma forma de energia em outra, no caso do ultra-som energia elétrica em energia mecânica. A transformação de energia elétrica em mecânica ocorre devido às propriedades piezelétricas de certos materiais, e consiste na geração de um sinal elétrico quando este sofre deformação mecânica e vice-versa, alguns desses materiais são naturais, como o quartzo, turmalina e sulfato de lítio, outros são elementos sintéticos como o titanato de bário ou PZT, titanato zirconato de chumbo (WELLS, 1977).

A intensidade do ultra-som segundo HAAR et al (1999) é um dos parâmetros que exerce maior influência sobre os mecanismos de interação do ultra-som com células e tecidos biológicos. Comumente na prática fisioterápica são usadas intensidades médias que variam de 0,25 a 1,5 W/cm², para tratar de tecidos moles, e nesta faixa de intensidade encontra-se a maioria das pesquisas sobre ultra-som em reparação tecidual.

Na década de noventa é que surgiram novas pesquisas de ultra-som pulsátil de intensidades próximas de 0,25 W/cm², sendo abaixo dos limiares cavitacionais. E esta modalidade de estímulos conseguiu resultados significativos em reparação tecidual epitelial em animais conforme ALVES (1998).

A freqüência de saída, em um equipamento de ultra-som, determina a profundidade de penetração da energia, com uma relação linear entre a freqüência do ultra-som e a profundidade na qual a energia é absorvida pelo tecido. A taxa de absorção e, conseqüentemente a atenuação aumenta conforme a freqüência do ultra-som aumenta, devido à fricção entre as moléculas que as ondas sonoras devem superar para passar através dos tecidos (FISH, 1996).

O equipamento de ultra-som é uma modalidade terapêutica utilizada atualmente nas mais variadas aplicações clínicas, podemos citar sua aplicação em:

- úlceras venosas (PESCHEN et al 1997), e úlceras de pressão (MACDIARMID; BURNS; LEWITH, 1985),
- cicatrização tendinosa (GAM e JOHANNSEN 1995; POWELL; NG, 1989; ROBERTS;
 RUTHERFORK; HARRIS 1982; STEVENSON et all., 1986; TURNER et al., 1989),
- consolidação de fraturas e pseudo-artroses (DUARTE e XAVIER, 1983; DYSON, 1982),e em reparação de tecido ósseo animal (COLOMBO et al., 1991)
- regeneração muscular (MENEZES, 1997),
- em estímulo à angiogênese (DIONISIO, 1998) e

na melhora do tecido cicatricial (CLARKE e STENNER, 1976; FIELDHOUSE, 1979;
 MARKHAM e WOOD, 1980; MENDONÇA et al., 2006; PATRICK, 1978).

Segundo DURIGAN (2006), que revisou os mecanismos e interações do ultra-som terapêutico nos tecidos biológicos, visando as respostas de cada tipo de tecido biológico, mostrou efeitos em síntese de colágeno, proliferação celular, reparação tecidual, circulação, angiogênese, tecido ósseo e concluiu que o ultra-som ainda consiste em um recurso controverso, quanto as suas interações e efeitos no tecido biológico, sendo necessário mais investigações.

3.2.1 INTERAÇÃO DO ULTRA-SOM COM TECIDO BIOLÓGICO

A ação do Ultra-som depende de muitos fatores físicos e biológicos, como intensidade, tempo de exposição, estrutura espacial e temporal do campo ultra-sônico e estado fisiológico do tecido. A interação destas variáveis dificulta a compreensão exata do mecanismo de ação do ultra-som na interação com os tecidos biológicos (BASSOLI, 2001).

Os efeitos do ultra-som são divididos em térmicos e não térmicos. Os efeitos térmicos são produzidos por ondas de ultra-som contínuas ou pulsadas com alta intensidade, e levam a uma alteração dos tecidos, como um resultado direto da elevação de sua temperatura, provocada pelo ultra-som. Os efeitos não-térmicos produzidos pelo ultra-som pulsado causam alterações resultantes do efeito mecânico da energia (STARKEY, 2001 e DYSON, 1982).

Segundo KITCHEN e BAZIN (1996) efeitos térmicos e atérmicos são os mecanismos físicos pelos quais o ultra-som terapêutico induz a repostas clinicamente significativas nos tecidos biológicos.

3.2.1.1 EFEITO TÉRMICO

O efeito térmico do ultra-som é considerado de grande importância. O som se atenua à medida que atravessa um meio e diminui sua intensidade durante este trajeto. Parte desta atenuação é causada pela conversão da energia em calor por absorção (KITCHEN & BAZIN, 1996).

O aumento da temperatura nos tecidos, causado pelas ondas de ultra-som, depende da intensidade de saída (W/cm²) do equipamento e da duração do tratamento (STARKEY, 2001).

O aquecimento tecidual ocorre devido às oscilações das partículas em torno de sua posição média, a energia cinética é convertida em energia térmica sendo esta proporcional à intensidade. O aumento da temperatura é mais facilmente obtido no modo contínuo. Para se obter efeito terapêutico, a temperatura tecidual tem que ser elevada para algo em torno de 42,5°C e mantida por pelo menos cinco minutos, segundo LEHMANN (1990).

O aquecimento local atingido pelo ultra-som depende do tipo de tecido (os tecidos altamente protéicos absorvem mais energia do que os tecidos com alto teor de gordura); do fluxo sanguíneo que irriga o local (uma vez que o calor pode ser dissipado pela corrente sanguínea); e da freqüência ultra-sônica aplicada, (as altas freqüências são absorvidas mais superficialmente) (DYSON, 1982).

O efeito térmico pode atingir 5 cm ou mais de profundidade. A resposta fisiológica atribuída a este efeito inclui o aumento da extensibilidade do colágeno, alterações no fluxo sanguíneo, (DYSON, 1982 e HAAR, 1999) mudanças na velocidade de condução nervosa, aumento da atividade enzimática e mudanças na atividade contrátil dos músculos esqueléticos (STARKEY, 2001). O aquecimento moderado produz aumento do metabolismo celular, aumento do fluxo sanguíneo, reduz a dor, reduz espasmos musculares, rigidez articular e auxilia no processo cicatricial (KITCHEN & BAZIN, 1996).

A vasodilatação em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo causado pelo uso do ultra-som, pode ser considerada em parte, como fenômeno protetor, destinado a manter a temperatura corporal dentro dos limites da normalidade, 36 a 37°C (KITCHEN & BAZIN, 1996).

As causas que levam a dilatação podem ser consideradas como: liberação de estimulantes tissulares em conseqüência da agressão celular causada pela vibração mecânica das ondas ultrasônicas, estimulação e possivelmente direta, das fibras nervosas aferentes, o que conduz à depressão pós excitatória da atividade ortossimpática, levando a uma redução do tônus muscular (LONGO, 1996).

Um aumento da temperatura associada com o efeito mecânico do ultra-som pode promover efeitos adversos (DYSON, 1982). E as intensidades acima de 1W/cm², no modo contínuo, nas freqüências de 1 ou 3 MHz, propiciam a prevalência do efeito térmico sobre o mecânico e podem ser lesivas. Além disso, os dados científicos ou clínicos não justificam a utilização do ultra-som com intensidades acima de 1W/cm².

3.2.1.2 EFEITOS NÃO TÉRMICOS

Segundo LOW e REED (1996), em alguns casos a dissipação do calor equivale à geração do calor, são considerados os efeitos não térmicos ou mecânicos, eles podem ser priorizados utilizando o modo pulsado ou baixas intensidades.

De acordo FISH (1996) e DYSON (1982) os efeitos atérmicos ocorrem devido microfluxo e à cavitação. Esses movimentos unilaterais que ocorrem em fluídos submetidos a um campo ultra-sônico originam forças e tensões que podem modificar a posição de partículas intra e extracelulares ou

mesmo a configuração normal das células, e conseqüentemente podem afetar a atividade celular. (DYSON, 1982; KITCHEN, 1990; HAAR, 1999).

Cavitação é o termo usado para descrever o fenômeno caracterizado pela formação de bolhas ou cavidades micrométricas em líquidos que contém gases. Amplitudes de baixas pressões resultam na formação de bolhas sendo que estas produzem alterações reversíveis na permeabilidade das membranas celulares e induzindo, portanto a respostas favoráveis ao tecido tratado. Amplitudes de alta pressão podem resultar em um evento cavitacional violento denominado de cavitação temporária ou transiente que é prejudicial aos tecidos. Já as micromassagens ocorrem em decorrência das ondas de compressão e rarefação (MORTIMER & DYSON, 1988).

Segundo STARKEY (1999), dependendo do tipo de célula, a movimentação iônica produzida pode desenvolver alterações na síntese e secreção celular, como por exemplo, a síntese de colágeno, com secreção de fatores quimiotáticos e aumento da atividade fibroblástica durante o processo de cicatrização tecidual.

3.2.3 ULTRA-SOM E COLÁGENO

O efeito benéfico do ultra-som tem sido demonstrado sobre diversos tecidos, inclusive a pele, destacando-se o aumento do número de fibroblastos e da síntese de colágeno, (DYSON, 1990), porém, a maioria dos estudos que referem a ação em colágeno, é em colágeno de tendões e a maioria dos estudos em pele, trata-se de tecido em reparação.

Para YOUNG (1998), HARVEY et al. (1975), há um consenso em que o ultra-som pode incrementar a síntese de fibroblastos e colágeno além de acelerar a resposta inflamatória, promovendo a liberação de histamina, macrófagos e monócitos.

Um estudo sobre os efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade (30mW/cm²) sobre a cicatrização de lesões cutâneas, realizado em ratos por MENDONÇA et al (2006), constatou que esta modalidade estimula moderadamente a cicatrização cutânea por segunda intenção em condições experimentais, com potencial para aplicação clínica em humanos. Os animais foram estimulados após a lesão, divididos em grupos de acordo com o tempo de lesão (3, 7 e 14 dias), por 10 minutos, em dias alternados. Constatado uma diminuição significativa de células inflamatórias, e um incremento na angiogênese. Porém as observações na formação de colágeno em derme e epiderme não foram diferentes significativamente, mas as análises qualitativas indicam uma estimulação.

Amâncio (2003) estudou o efeito da estimulação ultra-sônica na integração de enxertos da pele e concluiu que o ultra-som induz a alterações morfológicas nos processos biológicos, como proliferação celular da camada germinativa da epiderme, neoangiogênese, envolvidos na integração de enxertos de pele total em coelhos. Apesar dos achados positivos à reparação tissular, não observou ação importante no comportamento das fibras de colágeno, sugerindo que a disposição das fibras não se altera de maneira importante em casos de enxerto de pele. Foi utilizado ultra-som de 3 MHz e 0,5 W/cm2.

Harvey et al. (1975), relatou que cultura de pele humana de fibroblastos musculares tratados com ultra-som pulsado e contínuo sintetizou mais proteínas que os controles. Similarmente, Webster (1978) achou um aumento na síntese de colágeno e proteína em geral em fibroblastos embrionários depois da irradiação por ultra-som e diz que o ultra-som pulsado aumenta a síntese de colágeno que chega a 30% contra 20% com ultra-som contínuo, para a mesma intensidade.

Ramirez et al (1997) estudou a cultura de fibroblastos estimulada por ultra-som contínuo e pulsado e ainda associou o efeito da vitamina C e da colagenase. A cultura exposta ao ultra-som e à vitamina C apresentou um aumento do colágeno em 200%. Na cultura sem irradiação do ultra-som e somente com vitamina C, também apresentou este aumento de colágeno. Quanto à cultura que sofreu a ação da colagenase, a síntese de colágeno foi maior em 15%, quando comparada ao controle. E esse efeito perdurou por 5 dias, levando a sugestão que o ultra-som pode ser beneficial quando aplicado nas fases precoce do processo de recuperação. Quando a matriz foi restaurada, a síntese de colágeno diminuiu. Ele ainda pode indicar que o efeito do ultra-som na síntese de colágeno foi maior em modo contínuo do que pulsado, apesar de ser inconsistente estatisticamente.

Barros Jr. (2001) estudou os efeitos precoce e tardio do ultra-som pulsado (20%), sobre o processo de cicatrização de tendões flexores profundo em coelhos. Os resultados obtidos através da análise histológica demonstraram uma diminuição da reação inflamatória, menor grau de necrose, aumento da proliferação de fibroblastos e aumento da deposição de fibras de colágeno na fase tardia da cicatrização do tendão, mostrando uma ação positiva do ultra-som no período de cicatrização.

Jackson, Schwane e Starcher, 1991, usaram o ultra-som contínuo na intensidade de 1,5 W/cm2 para o tratamento de rupturas parciais do tendão de Aquiles de ratos, pelo método subaquático de irradiação, em sessões de 4 minutos, diariamente nos 8 primeiros dias. Foi constatado que houve aumento simultâneo da força dos tendões e da síntese de colágeno.

Ainda em cicatrização de tendões sob o efeito do ultra-som GAN et al (1995), utilizou ultra-som no modo pulsado de 3 MHz, com intensidade de 0,8 W/cm2 em sessões de 3 minutos, durante 10 dias, na fase precoce (7dias) da cicatrização e na fase tardia (24 dias) em tendões flexores de galinhas e detectou aumento da amplitude de movimento, bem como, em nível microscópico, alinhamento mais regular do colágeno produzido, sendo mais preconizado na fase precoce.

Cunha et al. 2001, demonstraram que o uso do Ultra-som em ratos após a tendinotomia do tendão de Aquiles estimula a produção de tecido de reparação, aumentando a síntese de colágeno, com melhor agregação e alinhamento das fibras de colágeno no eixo do tendão. Foi utilizado Ultra-som no modo pulsátil, intensidade de 0,5 W/cm2, na freqüência de 1 MHz, por 5 minutos durante 14 dias consecutivos, sendo que no modo contínuo, não foram encontrados efeitos benéficos no tecido de reparação dos tendões.

Baker, Robertson e Duck (2001) também menciona um aumento na extensibilidade do colágeno como efeito térmico adicional aos demais efeitos biofísicos resultantes da estimulação ultrasônica. Segundo eles há uma discrepância entre o pequeno número de estudos *in vivo* realizados em contraste com o grande número de estudos *in vitro*, geralmente em ratos. Eles comentam o estudo de REED e ASHIKAGA (1997) sugerem que o aumento da extensibilidade dos ligamentos pelo aquecimento foi pequeno e acreditam ser duvidosa a relevância para humanos..

Reed e Ashikaga (1997) realizaram um estudo *in vivo*, onde estudaram o efeito do ultra-som em joelhos humanos e registraram que o ultra-som em doses clinicamente aceitas (1,5 W/cm² em 1 MHz, por 8 minutos) aumenta ligeiramente a extensibilidade dos ligamentos colaterais medial e lateral, apesar de este aumento não ser considerado significante. Eles sugerem que a diferença entre os resultados de experimentos *in vitro* com os estudos *in vivo* deve-se aos efeitos da disseminação do calor pelo fluxo sanguíneo.

Estudos como JOHANSEN; GAM; KARLSMARK, (1998) vem mostrando efeitos da terapia ultra-sônica em tratamentos de úlceras cutâneas crônicas, nos quais tem sido apontado um 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.

Conforme CAMPANELLI (2004), a utilização de ultra-som de baixa intensidade em tratamento de manifestações cutâneas de Mal Perfurante Plantar, em pacientes de Mal de Hansen que apresentavam úlceras de tegumento, obteve resultado satisfatório na cicatrização destas lesões com o modo pulsado.

O emprego do ultra-som como acelerador da cicatrização cutânea em feridas de diversas origens, mostra evidências de que sua correta aplicação numa fase precoce da inflamação, pode contribuir para o reparo de tecidos moles (HART, 1993).

Referente à estimulação de tecido muscular, pode-se citar BASSOLI (2001) o qual notou em seu estudo com ultra-som de baixa intensidade (16mW/cm2) e freqüência de 1,5 MHz, a ação positiva do ultra-som pulsado de baixa intensidade na aceleração da regeneração de fibras musculares e relaciona este efeito a neoformação vascular e formação de mioblastos.

Poucos estudos sobre a influência do ultra-som em tecido sadio foram encontrados. Dentre eles pode-se citar LOPES (2005), onde estudou o efeito do ultra-som pulsado e contínuo de 1 MHz na morfometria do tecido muscular, onde não encontrou relação na influência do ultra-som na variação da área da célula muscular. Foi utilizada intensidade máxima de 3W/cm², em tecido muscular sadio do músculo vasto lateral de coelhos, em 10 aplicações consecutivas. Com esta metodologia concluiu-se que o Ultra-som não produz efeitos morfométricos no tecido muscular sadio de coelhos.

Efeitos benéficos da irradiação ultra-sônica pulsada sobre o processo de cicatrização e regeneração de diferentes tipos de tecido foram relacionados à baixa intensidade, com uso de equipamentos especificamente construídos com essas características (DUARTE & XAVIER, 1983).

Os efeitos e a eficácia do ultra-som de baixa intensidade foi comprovado em vários estudos sobre o reparo de tecidos como a pele (ANASTÁCIO, 2000; CAMPANELLI, 2004; PESCHEN, 1997) e sobre o músculo (BASSOLI, 2001 e GUIRRO & GUIRRO, 1995).

Xavier e Duarte 1983 supõe que a onda ultra-sônica é absorvida pelo tropocolágeno e transforma a energia mecânica em energia elétrica, criando assim um campo elétrico na região, isso se deve à capacidade piezelétrica do colágeno.

Silva 1987 demonstrou teoricamente que a aplicação de um campo acústico no tecido ósseo causa um campo elétrico na região da membrana celular e supõe que este efeito deva ocorrer em todo tecido que contenha colágeno, o que pode ser um dos mecanismos do efeito do ultra-som na pele.

Dyson et al. (1990) conclui que o ultra-som usado na fase aguda de uma lesão, pode estimular a liberação de agentes quimiotáxicos e a degranulação celular. Já durante a fase de proliferação celular, que se inicia aproximadamente no terceiro dia após a lesão, os fibroblastos expostos a níveis terapêuticos de ultra-som seriam estimulados a sintetizar maior quantidade de colágeno, possibilitando assim um tecido cicatricial mais forte e elástico, já que o colágeno é a proteína que confere resistência à tração aos tecidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todo o procedimento metodológico foi previamente submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, CEUA (anexo A).

O modelo animal deste estudo foi o rato macho da linhagem wistar, com massa corporal aproximadamente de 300 gramas, fornecidos pelo biotério da Unesp de Araraquara. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório da Bioengenharia da EESC, com livre acesso à água e alimentação, sob condições de higiene, em gaiolas de polipropileno padrão forradas com serragem, mantidos em grupos de 3 e de 2 animais por gaiola, sob iluminação natural e temperatura ambiente.

Foram utilizados 15 animais, divididos randomicamente em 3 grupos:

- Grupo Ultra-som (US);
- Grupo Placebo (PL);
- Grupo Controle (C).

O grupo de ultra-som (US) composto de 5 animais foi submetido à irradiação ultra-sônica.

O grupo placebo (PL) também constituído de 5 animais foi submetido à irradiação simulada com o equipamento desligado.

O grupo controle (C) foi mantido sob as mesmas condições dos grupos anteriores, porém não foi submetido ao tratamento, também composto por 5 animais.

4.2 Tratamento

O equipamento utilizado foi o ultra-som de baixa intensidade 30 mW/cm² (SATA), modo pulsado com largura de pulso de 200 ms (200/800 ms), desenvolvido pelo laboratório de Bioengenharia da EESC, com freqüência de 1,5 MHz e com área do transdutor de 3,8 cm² (Figura 11).



Figura 11. Aparelho de Ultra-som terapêutico de baixa intensidade, desenvolvido pelo Laboratório de Bioengenharia da EESC utilizado neste estudo.

O aparelho foi submetido a dosimetria através do dosímetro de precisão Ultra Sonic Power Meter, modelo UPM-DT-1, no Laboratório do Programa de Interunidades Bioengenharia da EESC/USP, antes de iniciar o tratamento e após a quinta aplicação. Antes de submeter os animais às irradiações, eles foram tricotomizados pela técnica de depilação digital, na região do dorso. Esta depilação consiste na retirada dos pêlos do animal, realizada com os dedos, com o animal sob sedação, conforme PINFILDI (2005) (Figura 12).



Figura 12. Depilação digital do animal

A irradiação foi aplicada na região central do dorso (área de 5 cm²) do animal (Figura 13), durante 10 minutos no período de 10 dias, com o intervalo de 2 dias após a quinta aplicação. Durante a aplicação do ultra-som, o animal era contido pelas próprias mãos do aplicador, em decúbito ventral, mantidos despertos, sem utilização de drogas, nem uso de imobilizadores (Figura 13).



Figura 13. (A) Demonstração da área tratada e (B) da aplicação do ultra-som no dorso do animal.

O ultra-som foi aplicado pelo método direto, com movimentos circulares e uniformes por toda a área pré-definida na pele do dorso do animal (Figura 14). Foi utilizado um gel hidrossolúvel como meio acoplador do transdutor, para assegurar a transmissão das ondas para a pele do animal, evitando presença de bolhas de ar (CASAROTTO, 2000; WILLIANS, 1987).

Ao final do tratamento (um dia após a última aplicação) foi realizada uma biópsia da pele tratada para coletar material para análise.

4.3 Coleta de material

O dia da coleta foi também o dia do sacrifício dos animais. Cada animal recebeu uma injeção de Ketamina, cloridrato de xylasina 2% e cetomina 10%, aplicado intra-muscular, na dosagem de 1:1, com 0,5 cc/300 gramas de peso corpóreo (Figura 14). Sob efeito anestésico, o animal foi novamente tricotomizado pela técnica digital com a finalidade de se retirar os pêlos que haviam crescido a partir do dia da primeira tricotomia.



Figura 14. Anestesia intramuscular do animal

Foi retirado um retalho de pele da área tratada e deste retalho, foram extraído 2 punchs de 5mm com uso de material apropriado para biopsia por punch (Figura 15).



Figura 15. (A) Demonstração do retalho da pele do dorso do animal e (B) detalhe do retalho

Também foi retirado um punch de 5 mm numa área adjacente à área tratada, situada na região do pescoço do animal. Esta última amostra foi incluída num sub grupo denominado USpescoço com o objetivo de se comparar 2 amostras de pele do mesmo animal, sendo uma da área tratada e outra de uma área não irradiada pelo ultra-som, servindo como controle do mesmo animal (NORONHA et al, 2001) e também pra averiguar se há efeito do US na área adjacente.

As amostras do grupo PL foram retiradas de maneira idêntica às amostras do grupo Ultra-som, e o subgrupo correspondente à área adjacente à área tratada, foi denominado de PLpescoço.

Para o grupo controle, as amostras foram retiradas na forma de 2 punchs da área central do dorso.

As amostras de pele foram colocadas em soro fisiológico, em frascos individuais, devidamente identificados e armazenados até iniciar a rotina de preparação de lâminas.

4.4 Preparação das lâminas

Ao iniciar a rotina histológica, o material passou pelas etapas de descrição, desidratação, difusão do tecido em xilol e impregnação por meio de parafina com a inclusão do material em bloco de parafina para posterior microtomia.

Os procedimentos descritos acima foram executados no Laboratório do Programa de Interunidades em Bioengenharia da EESC. Os cortes histológicos foram realizados no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraguara.

Os cortes histológicos foram confeccionados no sentido transversal, para melhor interpretação do comportamento das fibras de colágeno conforme a profundidade da derme. Os cortes histológicos destinados à análise histológica foram executados na espessura de 5 μ m, enquanto os cortes destinados à análise de birrefringência foram executados na espessura de 7 μ m, e todos foram fixados em lâminas.

4.5 Análise Histológica

As lâminas histológicas foram coradas com 2 tipos de corantes: Hematoxilina-Eosina e Tricômio de Masson (apêndice A) e submetidas à análise descritiva de um patologista, através de um microscópio de transmissão de luz (Zeiss, modelo Axiophot) no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara. Em anexo B encontra-se a descrição da rotina de preparação para as duas colorações.

As fotomicrografias das lâminas histológicas foram realizadas com uma câmara digital Olimpus Camedia C 5060, de 5 megapixels, acopladas a um microscópio de transmissão de luz (Zeiss, modelo Axiophot) e a um microcomputador dotado de programa de análise computacional de imagens (Camedia).

4.6 Análise da Birrefringência

A análise de birrefringência foi realizada no Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar, no Laboratório de Materiais Vítreos (Lamav).

As medidas foram realizadas num microscópio de luz polarizada LEICA, com objetiva Pol (ex 10X/0,22), condensador (0,0), compensador (sénarmosnt's λ /4), com luz monocromática λ 546 nm obtida por meio de filtro de interferência "Zeiss", do Lamav.

Antes do início das medidas, todas as lâminas, com cortes histológicos de 7 micras, ficaram imersas em água destilada por 30 minutos para a hidratação. A lâmina foi coberta com uma lamínula, contendo água destilada nas interfaces, durante a realização das medidas, conforme Vidal (1987).

Foram realizadas medidas de Retardo Óptico das lâminas de todos os grupos, inclusive os subgrupos. Dos grupos US e Uspescoço, foram obtidas 450 medidas de RO para cada grupo, e dos grupos C, PL e PLpescoço foram obtidos 270 medidas de cada grupo. Em todos os grupos foram diferenciadas as medidas realizadas nas duas camadas da derme: papilar e reticular e para análise específica para cada camada foram utilizadas 135 medidas.

Os resultados relativos à birrefringência total constituirão de observação semiquantitativa das fibras de colágeno a qual será mostrada pela medida do Retardo Óptico em nm, enquanto a análise qualitativa será apresentada por fotomicrografias das imagens obtidas pelo microscópio de polarização.

4.7 Análise Estatística

As medidas de Retardo Óptico (RO) foram submetidas à análise estatística.

O teste utilizado foi o teste de variância ANOVA (amostras independentes, uma variável e com dados numéricos) e complementado pelo Tukey, para examinar a diferença entre as médias dos grupos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo ideal para se estudar a ação do ultra-som sobre o colágeno da pele seria em humanos, uma vez que no mercado da Medicina Estética, encontram-se equipamentos de ultra-som que podem ser adquiridos diretamente pelo consumidor para efetuar tratamentos estéticos em domicílio. No entanto, para seguir os padrões apropriados ao Comitê de Ética ao qual este estudo foi submetido (anexo A), optou-se por utilizar o rato como modelo experimental.

O rato é um animal de fácil aquisição, transporte, manipulação e condicionamento e o animal mais utilizado nos estudos encontrados na literatura. Este modelo animal também é o mais utilizado para avaliação de birrefringência em colágeno de tendão (CUNHA, 2001).

A área do corpo do animal escolhida para realização do tratamento foi o dorso seguindo trabalhos realizados em pele, tais como BARROS (2002); MENDONÇA et al. (2006) e SILVA (2002) já que é uma área de fácil acesso.

A técnica para depilação da região do dorso do animal, foi de início com o uso de lâmina para barbear, no entanto, esta técnica agride de maneira suave a epiderme do animal. Por sugestão de pesquisadores da Escola Paulista de Medicina e seguindo PINFILDI et al (2005), optou-se pela depilação digital, que consiste na retirada dos pêlos com os dedos (Figura 12), estando o animal sob um efeito sedativo.

Dyson (1982), defende a importância de se ter grupo controle, e mostra algumas evidências que muitas vezes o método de tratamento pode conter efeito placebo. E HASHISH (1996) ainda sugere que esses efeitos placebos podem ser medidos através de processos fisiológicos. Diante disso, foi optado por ter neste estudo grupo controle e grupo placebo.

Segundo VIDAL (2003), a melhor forma de analisar e descrever a orientação das fibras de colágeno é através de suas propriedades físicas tal como a birrefringência, inicialmente proposto por VIDAL (1964), a qual permite medir de modo acurado através do RO, interpretar e validar a organização dessas fibras. Quanto maior o brilho de birrefringência, melhor a organização e o estado de agregação macromolecular.

Baseado na experiência do autor acima com esta metodologia para a análise de colágeno, este estudo tentou fugir dos métodos convencionais utilizados para observar o efeito do ultra-som em fibras de colágeno os quais consistem em análises quantitativas, sem avaliar o comportamento da fibra de colágeno, sua orientação e organização. A avaliação dos valores de RO pode ser traduzida em melhora da organização e orientação das fibras de colágenos.

KOEKE (2003) em estudo em tendões de rato, utiliza a análise de birrefringência de colágeno para observar seu grau de concentração, estado de agregação, orientação e deposição de fibras de colágeno no local de tenotomia, além de observar a morfologia do crimp e do brilho característico. E nota-se que esta metodologia empregada é de grande significância para avaliar fibras de colágeno.

Em água destilada, os feixes apresentam os maiores valores de birrefringência, correspondendo aos valores de birrefringência total, ou seja, representam com objetividade a morfologia das moléculas de colágeno, o diâmetro e grau de empacotamento das fibras (VIDAL, 1987). Sendo assim, as lâminas ficaram imersas em água destilada por 30 minutos antes de serem submetidas às medidas de RO.

Segundo PIMENTEL (1981), apesar do conhecimento já existente sobre os aspectos de birrefringência da molécula do colágeno, ainda pode-se conseguir maiores informações sobre estes aspectos de ordem molecular quando nos encontramos frente a diferentes processos fisiológicos. Daí, a relevância de se pesquisar a birrefringência do colágeno da pele, diferente tecido, e sendo pele sadia, encaixando-se também numa diferente condição fisiológica dos demais estudos relatados.

O período de 10 dias consecutivos de tratamento, com intervalo de dois dias após o quinto dia de aplicação, foi escolhido para simular condições clínicas (KOEKE, 2003 e CUNHA, 2001).

5.1 Análise da birrefringência

A representação quantitativa por meio da análise de birrefringência deu-se por meio das medidas de Retardo Óptico (RO) em nanômetros (nm) realizados ao microscópio de luz polarizada, nos cortes histológicos de todos os grupos.

A observação qualitativa por meio da análise de birrefringência está apresentada em forma de microfotografias das imagens da pele, tomadas durante a realização das medidas de Retardo Óptico.

Para verificar se houve diferença estatisticamente significante entre os grupos estudados, as medidas de RO foram submetidas à análise estatística utilizando-se o teste ANOVA com nível de significância de 5%, seguido do teste Tukey para verificar a diferença entre os grupos.

Apenas uma referência bibliográfica sobre medidas de birrefringência em pele foi encontrada, na qual SILVA (2002) compara pele queimada com pele sadia para estudar o efeito do laser de He-Ne sobre a recuperação da pele queimada. E este estudo também se fundamentou nos trabalhos de VIDAL (1986).

Como não foi encontrado referências científicas que estabelecessem parâmetros sobre medidas de birrefringência do colágeno da pele, exceto por SILVA (2002), os parâmetros utilizados para o nível de organização das fibras de colágeno foi o próprio comportamento das fibras do grupo controle.

5.1.1 Análise Quantitativa

Avaliando as medidas de RO das amostras de pele deste estudo, de acordo com teste ANOVA, pode-se observar que o grupo que apresentou a maior média de RO foi o grupo C (31,09), sendo a menor média a do grupo US (26,03), e grupo PL apresentou o valor intermediário entre os outros dois grupos (29,07). Sendo as médias diferentes entre si estatisticamente, pois p<0,01.

Na Tabela 1, pode-se observar a análise do dois testes estatísticos empregados entre os grupos US, C e PL, sendo GL: grau de liberdade, SQ: a soma dos quadrados, QM: quadrado médio, Q: quadrado e (p): probabilidade.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	42.1 e+02	21.1 e+02
Erro	921	30.3 e+03	32.906
F =	63.9902		
(p) =	< 0.0001		
Média C	31.0935		
Média US	26.0373		
Média PL	29.0703		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias C e US	5.0562	15.6187	< 0.01
Médias C e PL	2.0232	5.7409	< 0.01
Médias US e PL	3.033	9.4539	< 0.01

Tabela 1. Análise das médias de RO em nm da derme por meio dos testes estatísticos Anovae Tukey

Sendo o grupo C o que apresentou maior média de RO (31,09) interpreta-se que este grupo apresenta o maior nível de organização das fibras de colágeno, quando comparado com o grupo US (26,03) e PL (29,07) uma vez que a diferença entre os grupos é estatisticamente significante, pois p<0,01 (Tab 1). Esses dados permitem sugerir que a aplicação de US pode alterar a organização e a agregação das fibras de colágeno, quando aplicado nas condições deste estudo.

A média dos valores de RO do grupo US (26,03), sendo a menor média, revela uma menor organização das fibras de colágeno, uma vez que o retardo óptico (RO) está diretamente relacionado com a birrefringência do colágeno: quanto maior o retardo óptico, maior a birrefringência dessa proteína e maior sua organização no tecido conjuntivo (VIDAL, 1986).

O grupo PL apresentou o valor intermediário de média de RO (29,07) e este dado revela que o efeito da irradiação simulada sobre a pele altera a organização das fibras de colágeno, porém não ao nível da ação apresentada no grupo US. Era esperado encontrar neste estudo um efeito da ação simulada da irradiação com ultra-som conforme HASHISH (1996).

O comportamento das médias dos grupos está representado na Figura 16. Pode-se observar que o grupo US apresentou o maior desvio padrão.



Figura 16. Gráfico Box Plot para representação das médias de RO em nm dos grupos C, US e PL, com desvio padrão e valores máximos e mínimos.

Para uma análise mais localizada do efeito do ultra-som de baixa intensidade nas diferentes camadas da derme, foi realizado a estatística das medidas das camadas papilar e reticular separadamente.

A realização das medidas separadamente por camadas na pele foi de fácil execução, uma vez que a própria disposição das fibras de colágeno descrevem as camadas tornando fácil de serem observadas pela microscopia de luz polarizada.

Na análise das médias dos valores de RO realizadas especificamente na camada papilar da derme pode-se observar que os grupos apresentaram o mesmo comportamento da análise das médias de RO realizada na derme completa. O grupo US, apresentou a menor média (24,04). O grupo C

apresentou a maior média de RO (31,01) e o grupo PL apresentou um valor intermediário (28,47). Aqui

também as médias dos grupos são diferentes entre si estatisticamente (p<0,01) (Tabela 2).

Tabela 2	. Análise	das médias	de RO ei	n nm da	derme	papilar,	por meio	dos testes	Anova e
			-	Fukey					

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	28.6 e+02	14.3 e+02
Erro	367	92.0 e+02	25.061
F =	57.0474		
(p) =	< 0.0001		
Média C	31.0153		
Média US	24.0438		
Média PL	28.4716		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (CeUS) =	6.9715	15.0355	< 0.01
Médias (CePL) =	2.5436	5.8484	< 0.01
Médias (US e PL) =	4.4278	9.5975	< 0.01

O comportamento das medidas de RO realizadas na camada papilar da derme pode ser observado na Figura 17. Pode-se observar que o grupo C apresentou o maior desvio padrão.



Figura 17. Gráfico Box-Plot para representação das médias de RO em nm da camada papilar da derme dos grupos C, US e PL, com desvio padrão e valores máximos e mínimos.

O ultra-som de baixa intensidade altera a organização das fibras de colágeno da derme papilar

com o mesmo comportamento da alteração na derme em geral.

Na análise das médias dos valores de RO realizadas especificamente na camada reticular da derme, observou-se que a menor média dos valores de RO pertence ao grupo US (22,51). O grupo C apresentou a maior méida (30,78) e o grupo PL, o valor intermediário (29,30) (Tabela 3).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	47.1 e+02	23.5 e+02
Erro	379	78.7 e+02	20.763
F =	113.3441		
(p) =	< 0.0001		
Média C =	30.7895		
Média US=	22.5130		
Média PL =	29.3060		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (CeUS) =	8.2764	20.1725	< 0.01
Médias (C e PL)	1.4835	3.7616	< 0.05
Médias (US e PL) =	6.7929	16.5854	< 0.01

Tabela 3. Análise das médias de RO em nm da camada reticular da derme por meio do testeAnova e Tukey

A análise das medidas de RO realizadas na camada reticular da derme dos grupos C, US e PL apresenta o mesmo comportamento das análises realizadas na derme papilar e na derme geral, como pode ser observado na Figura 18.



Figura 18. Gráfico Box-Plot para representação das médias de RO em nm da camada reticular da derme dos grupos C, US e PL, com desvio padrão e valores máximos e mínimos

A média de RO da camada reticular da derme do grupo US (22,51) é menor quando comparada com a média do grupo US na derme geral (26,06) e à média do grupo US na derme papilar (24,04). Esse dado permite sugerir que quanto maior a profundidade da derme, maior a ação do Ultrasom de baixa intensidade na organização das fibras de colágeno.

Esse efeito mais pronunciado na camada reticular pode ter relação com a freqüência do equipamento utilizado neste estudo (1,5 MHz), (FISH, 1996) e também com o conceito de campo acústico próximo e distante exposto por ZEMANECK (1970).

A média do grupo C (31,78) na camada reticular é a menor quando comparada com a média do grupo C na derme papilar (31,01) e na derme geral (31,09), apesar de não apresentar diferença estatisticamente. Assim sendo, pode-se sugerir uma menor organização das fibras de colágeno na camada mais profunda da derme do grupo C de acordo com a análise de Birrefringência.

Regiões adjacentes ao dorso dos animais também foram analisadas. Amostras dos subgrupos USpescoço e PLpescoço (regiões adjacentes à área irradiada com ultra-som e à área submetida à irradiação simulada respectivamente) apresentaram médias muito próximas da média do grupo C. O subgrupo USpescoço com a média 30,47 e o subgrupo PLpescoço com a média 30.98 não foram estatisticamente diferentes ao grupo C (31,09). Portanto, nas áreas adjacentes às áreas irradiadas não houve alteração das medidas de RO (Tabela 4).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	4	63.5 e+02	15.9 e+02
Erro	1583	49.1 e+03	30.998
F =	51.2481		
(p) =	< 0.0001		
Média C	31.0935		
Média US	26.0373		
Média Uspescoço	30.4713		
Média PL	29.0703		
Média Plpescoço	30.9852		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Tukey: Médias C e US	Diferença 5.0562	Q 16.0923	(p) < 0.01
Tukey: Médias C e US Médias C e Uspescoço	Diferença 5.0562 0.6222	Q 16.0923 1.9802	(p) < 0.01 ns
Tukey: Médias C e US Médias C e Uspescoço Médias C e PL	Diferença 5.0562 0.6222 2.0232	Q 16.0923 1.9802 5.9149	(p) < 0.01 ns < 0.01
Tukey: Médias C e US Médias C e Uspescoço Médias C e PL Médias C e PLpescoço	Diferença 5.0562 0.6222 2.0232 0.1083	Q 16.0923 1.9802 5.9149 0.3169	(p) < 0.01 ns < 0.01 ns
Tukey: Médias C e US Médias C e Uspescoço Médias C e PL Médias C e PLpescoço Médias US e Uspescoço	Diferença 5.0562 0.6222 2.0232 0.1083 4.434	Q 16.0923 1.9802 5.9149 0.3169 15.808	(p) < 0.01 ns < 0.01 ns < 0.01
Tukey: Médias C e US Médias C e Uspescoço Médias C e PL Médias C e PLpescoço Médias US e Uspescoço Médias US e PL	Diferença 5.0562 0.6222 2.0232 0.1083 4.434 3.033	Q 16.0923 1.9802 5.9149 0.3169 15.808 9.7405	(p) < 0.01 ns < 0.01 < 0.01 < 0.01
Tukey: Médias C e US Médias C e Uspescoço Médias C e PL Médias C e PLpescoço Médias US e Uspescoço Médias US e PL Médias US e PLpescoço	Diferença 5.0562 0.6222 2.0232 0.1083 4.434 3.033 4.9479	Q 16.0923 1.9802 5.9149 0.3169 15.808 9.7405 15.9079	(p) < 0.01 ns < 0.01 ns < 0.01 < 0.01 < 0.01
Tukey: Médias C e US Médias C e Uspescoço Médias C e PL Médias C e PLpescoço Médias US e Uspescoço Médias US e PL Médias US e PLpescoço Médias Uspescoço e PL	Diferença 5.0562 0.6222 2.0232 0.1083 4.434 3.033 4.9479 1.4011	Q 16.0923 1.9802 5.9149 0.3169 15.808 9.7405 15.9079 4.4996	(p) < 0.01 ns < 0.01 < 0.01 < 0.01 < 0.01 < 0.05
Tukey: Médias C e US Médias C e Uspescoço Médias C e PL Médias US e Uspescoço Médias US e Uspescoço Médias US e PL Médias US e PLpescoço Médias Uspescoço e PL	Diferença 5.0562 0.6222 2.0232 0.1083 4.434 3.033 4.9479 1.4011 0.5139	Q 16.0923 1.9802 5.9149 0.3169 15.808 9.7405 15.9079 4.4996 1.6521	(p) < 0.01 ns < 0.01 < 0.01 < 0.01 < 0.05 ns

Tabela 4. Análise das médias de RO em nm dos grupos C, US, PL incluindo os subgruposUSpescoço e PLpescoço, da derme por meio do teste Anova e Tukey

O comportamento das medidas de RO em todos os grupos deste trabalho, incluindo os subgrupos USpescoço e PLpescoço pode ser observado na Figura 19. Nota-se que os subgrupos comportam-se similarmente ao grupo C. Estes dados sugerem que o ultra-som de baixa intensidade não interferiu na organização das fibras de colágeno nas áreas adjacentes às áreas irradiadas.



Figura 19. Gráfico Box-Plot para representação das médias de RO em nm da derme dos grupos C, US e PL, incluindo os subgrupos USpescoço e PLpescoço com desvio padrão e valores máximos e mínimos

De acordo com os resultados encontrados na análise da birrefringência, este estudo mostra que o ultra-som de baixa intensidade interfere nos valores de RO das fibras de colágeno da pele. O grupo US apresentou a menor média dos valores de RO, em relação ao grupo C e ao grupo PL e esta diferença foi estatisticamente diferente. Conforme VIDAL, 1987, a organização das fibras de colágeno é diretamente proporcional com o valor de RO, ou seja, quanto maior o RO, maior a organização das fibras de colágeno. Assim sendo, a ação do ultra-som nas amostras deste estudo promoveu uma

desorganização das fibras de colágeno, em toda a derme, a nível papilar e reticular. Pode-se acrescentar que esta ação foi acentuada a nível reticular, pois nesta camada a média de RO foi a menor de todas e que nas regiões adjacentes a irradiação (efetiva e simulada), não houve alteração na organização das fibras de colágeno.

5.1.2 Análise Qualitativa

As microfotografias referem-se às observações qualitativas da análise de birrefringência total das fibras de colágeno da pele, realizadas por meio da microscopia de luz polarizada nos grupos deste estudo. A barra vermelha das microfotografias corresponde a 500 μ.

Por meio das microfotografias pode-se observar a disposição das fibras de colágeno na derme, apresentando-se em todas as direções. É possível distinguir as duas camadas da pele, papilar e reticular, devido à disposição, ao tamanho e à grossura das fibras. Porém a observação não permitiu determinar um padrão de comportamento das fibras de colágeno para cada grupo estudado.

Na Figura 20, pode-se observar o brilho de birrefringência das fibras de colágeno (grupo US) distribuídas em várias direções da pele apresentado em todos os grupos deste estudo.



Figura 20. Imagem referente à observação qualitativa da análise de Birrefringência total por meio de microscopia de luz polarizada da pele do grupo US

Em todos os grupos é possível distinguir as 2 camadas da derme, a camada papilar e a camada reticular. Esse fato possibilitou a realização das medidas de RO para cada camada. (Fig. 21).



Figura 21. Imagem referente à observação qualitativa da análise de Birrefringência total por meio de microscopia de luz polarizada da pele (a) derme papilar, (b) derme reticular. (A) grupo C; (B) Grupo US; (C) Grupo PL.



Figura 22. Imagens referentes à observação qualitativa da análise de Birrefringência total por meio de microscopia de luz polarizada da pele. Derme papilar (A) grupo C, (C) grupo US e (E) grupo PL. Derme reticular (B) grupo C, (D) grupo US e (F) grupo PL.

As fibras mais grossas apresentam maior brilho, o que pode ser observada na Figura 22 (C) e (D).

Não foi possível estabelecer padrões de diferenças entre os grupos, no comportamento das fibras de colágeno na camada papilar e também na camada reticular, conforme demonstrado na Figura 22.

Por meio da análise qualitativa das microfotografias de birrefringência, não foi possível estabelecer diferenças entre os grupos US e Uspescoço, e entre os grupos PL e PLpescoço. (Figura 23).



Figura 23. Imagem referente à observação qualitativa da análise de Birrefringência total por meio de microscopia de luz polarizada da pele. (A). grupo USpescoço; (B). grupo US; (C). grupo PLpescoço; (D). grupo PL.
5.2 Análise Histológica

As observações foram relatadas conforme a observação qualitativa e descritiva dos preparados histológicos das amostras deste estudo, realizadas por um patologista. Foi considerado a distribuição, disposição e integridade das fibras de colágeno coradas por Hematoxilina-Eosina e Tricômio de Masson.

Nas microfotografias coradas com Hematolina-Eosina, é possível observar o tecido conjuntivo, na cor rosa, já o Tricômio de Masson, cora especificamente o colágeno na cor azul.

Os achados histológicos permitiram observar claramente a disposição das fibras de colágeno em todas as camadas da pele, permitiram identificar o comportamento, a disposição e constituição inerente a cada camada, porém não foi possível detectar diferenças fortemente marcantes entre os grupos analisados.

Em todas as lâminas examinadas observou-se o estrato epitelial pavimentoso estratificado com hiperqueratose, camada basal íntegra e camada granulosa ampla (Figura 24). Em geral o aspecto do tecido conjuntivo apresenta-se com densidade de colágeno variável, observando fibras dispostas longitudinalmente e ora dispostas transversalmente ao corte (Figura 25). Há presença de inúmeros folículos pilosos em todas as amostras (Figura 24).



Figura 24. Grupo C, aumento 100 X, (a) estrato epitelial, (b) folículo piloso. Coloração Tricômio de Massom



Figura 25. Grupo C, 400X, fibras de colágeno na disposição (a) longitudinal e (b) transversal, (c) fibroblasto. Coloração Tricômio de Masson

A distribuição das fibras de colágeno do grupo C foi homogênea em toda extensão da derme papilar e reticular, observando feixes de colágenos grossos e compactos com tecido ao redor (estroma) separando as fibras. Nos cortes histológicos deste grupo também pode-se observar a continuidade das fibras longitudinalmente (Figura 26).



Figura 26. Grupo C. (A) – aumento 100X , (B) - aumento 200X, (C) - aumento 400X. Coloração Hematoxilina-Eosina

Na camada papilar, em todos os grupos, pode-se observar fibras de colágeno dispostas predominantemente no sentido longitudinal. Nesta camada parece ter maior concentração de colágeno, mas não organizado em fibras, e os fibroblastos apresentam-se mais arredondados, que podem ser vistas nas fotos do grupo C (Figura. 27). Isto sugere uma idade mais jovem, provavelmente colágeno tipo III que posteriormente se transformará em tipo I. (ROOK, 1998 e LEVER e SHAUMBURG-LEVER, 1991).

Ainda nesta área, o colágeno parece estar mais organizado apresentando uma cor mais clara, indicando fibras mais finas. Enquanto na camada reticular, as fibras são mais grossas e não apresentam predominância na disposição, apresentando-se em várias direções.



Figura 27. Grupo C. (**A**) –200X –, derme papilar e reticular. (**B**) - 400X, derme papilar e reticular. (**C**) - 400X, derme reticular. Coloração Tricômio de Masson

O grupo US apresenta suas fibras de colágeno com aspecto mais compacto, num nível moderado, quando comparado com grupo C. Isso pode ser observado nas duas colorações (Figura 28).



Figura 28. (A) e (B) - Grupo US, aumento 200X, (C) e (D) – Grupo C, aumento 200X. (A) e (C) coloração Hematoxilina-Eosina, (B) e (D) coloração Tricômio de Masson.

Porém, este padrão de comportamento não se manteve em todas as amostras do grupo US. Em algumas lâminas pode-se observar os feixes de colágeno com um aspecto mais delgado e menos compacto.

Em alguns casos o padrão de distribuição das fibras de colágeno na derme deste grupo mostrou heterogêneo, alternando em zonas de tecido mais compacto e zonas de tecido mais relaxado, dando um aspecto de mosaico. (Fig 29 e 30).



Figura 29. Grupo US. Coloração Hematoxilina-Eosina. (A) e (B) - aumento 400X .



Figura 30. (A), (B) e (C) Grupo US, coloração Tricômio de Masson, (A) e (B) aumento 200X e (C) aumento 400X.

Comparando os grupos US e PL através das lâminas histológicas, não foi possível estabelecer diferenças no comportamento das fibras de colágeno de cada grupo. (Figura 31).



Figura 31. (A) Grupo PL, 400X; (B) Grupo PL 400X; (C) Grupo PL, 200X; (D) Grupo US 400X; (E) grupo US 400X; (F) Grupo US 200X. (A) e (D) coloração Tricômio de Masson, (B), (C), (E) e (F) coloração Hematoxilina-Eosina

O comportamento das fibras de colágeno do grupo US da região adjacente (USpescoço) ao dorso (grupo US) apresenta-se, ao corte histológico, levemente com um aspecto de fibras mais curtas, como se fossem interrompidas, ou fragmentadas, o que pode ser interpretado como uma disposição levemente mais ondulada, e retorcida das fibras de colágeno da região do pescoço, quando comparadas com as fibras da região do dorso do animal. (Fig. 32).



Figura 32. (A) grupo US pescoço, 400X; (B) grupo US pescoço, 400X; (C) grupo US pescoço, 200X;
(D) grupo US, 400X; (E) grupo US, 400X; (F) grupo US, 200X. (A), (B), (D) e (E) coloração Tricômio de Masson, (C) e (F) coloração Hematoxilina-Eosina

A apresentação das fibras de colágeno das áreas adjacentes ao dorso (subgrupos USpescoço e PLpescoço) em forma mais onduladas, ou retorcidas, ou mais curvas do que na região do dorso,pode ser devido, a heterogenidade da pele, onde cada parte é unicamente construída (LEVER SHAUMBURG-LEVER, 1991), e se tratando do dorso e da área adjacente, que corresponde próximo

ao pescoço, duas áreas diferentes, isso explicaria tal diferença. Ainda de acordo com RODRIGUES, 2004, há uma diferença na resistência cicatricial da pele da parte cranial e caudal do corpo do rato, onde demonstra ter maior resistência na parte cranial.

Diferenças na disposição das fibras de colágeno nos diferentes grupos deste estudo, podem ser apontadas num grau de moderado a leve, pois não foram muito evidenciadas, podendo-se dizer que o grupo US apresenta-se com suas fibras de colágeno num aspecto mais compacto quando comparados com os grupos C e PL, num grau de leve sob a descrição do patologista. Esse aspecto de compactação, não se apresenta em todas as amostras do grupo, oscilando com áreas onde as fibras se apresentam mais frouxas, formando o desenho de mosaico.

Por meio das observações da histologia não foi possível estabelecer uma diferença nítida entre o comportamento das fibras de colágeno entre os grupos US e PL, como em PL e C.

Em todos os grupos é possível observar claramente a disposição das fibras de colágeno nas diferentes camadas da derme: papilar e reticular.

Uma questão levantada por PUGLIESSE et al, 2003, o colágeno tipo I e tipo III são sintetizados no tecido cutâneo especialmente por fibroblastos ativados pelo fator de crescimento presente numa situação específica denominada de micro meio ambiente de cicatrização. Assim sendo, em situação diferente deste micro meio, o qual encontra-se a pele sadia, surgiu a questão se o ultra-som conseguiria estimular um aumento da produção do colágeno pelos fibroblastos sem estar num meio ambiente de cicatrização. Esses autores ainda sugerem que o aumento das fibras de colágeno pode ocorrer por dois mecanismos: aumento da proliferação dos fibroblastos, células responsáveis pela síntese e secreção desta proteína, ou através do aumento da atividade celular anabólica. Alguns recursos terapêuticos podem estimular um destes mecanismos individualmente ou ambos. O recurso por eles estudados foi o laser de baixa potência. E este estudo incentivou o questionamento da ação de outros recursos físicos, dentre eles o do ultra-som, no colágeno do tecido sadio.

A hipótese de que o ultra-som exerça real efeito sobre as propriedades físicas da pele sadia, pode ser considerada, levando em conta sua ação em outras estruturas também responsáveis pelas propriedades físicas da pele, que não as fibras de colágeno, as quais comportam-se como estruturas interrelacionadas, quando se considera a mútua interdependência de seus componentes conforme exposto por HERMANNS (2004). Além disso, segundo FREEDBERG et al (2005), os componentes da matriz da pele normal sofrem reorganização e remodelamento em processos patológicos e em resposta à estímulos externos

Apesar dos vários trabalhos apresentarem ação do ultra-som pulsado de baixa intensidade em colágeno, poucas são as referências em colágeno de pele, os estudos se concentraram em colágeno de tecido tendíneo. Nos estudos sobre pele, a ação do ultra-som era para colaborar com o processo de reparação. Não foram encontrados estudos sobre a ação do colágeno diretamente sobre o colágeno da pele sadia, que embasariam a utilização do ultra-som terapêutico na medicina estética proporcionando um efeito de rejuvenescimento.

Com os resultados alcançados com este trabalho dá-se o início à compreensão da ação do ultra-som no colágeno da pele sadia, é preciso dar continuidade, como verificar a ação do ultra-som numa fase tardia para acompanhar a evolução da alteração nas fibras de colágeno.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo por meio da Análise Histológica não demonstraram ação do ultra-som de baixa intensidade nas fibras de colágeno. Já os achados através da Análise de Birrefringência permitem admitir que o ultra-som de baixa intensidade altera o comportamento das fibras de colágeno da pele sadia de ratos quando aplicado sob as condições deste estudo, promovendo uma desorganização das fibras, sendo este efeito mais acentuado na camada mais profunda da derme.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGACHE et al. Physiologie de la peau et exploitations fonctionalles cutaneés. In: KHATYR, F.; et al. Model of the viscoelastic behaviour of skin in vivo and study of anisotropy. **Skin Research and Thecnology**, v. 10, p. 96-103, **2004**.

ALBERTS, B. Molecular biology of the cell. New York: Garland, 1994. p. 971-995.

ALVES, J. M. **Efeitos da energia ultra-sônica na regeneração de pele de animal com queimadura por calor**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química 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**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química 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 de baixa intensidade.** Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

ANGELO Jr, P. R. **Análise das alterações da agregação Molecular das Fibras de Colágeno por FTIR**. Dissertação (Mestrado) - Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BABBIT, A. **Anti-aging: New use for external ultrasound in skin rejuvenation**. The American Society for Aesthetic Plastic Surgery, 07 august 2007. Disponível em: <<u>http://www.surgery.org/press/news-release.php?iid=229§ion=news-skin</u> >. Acesso em 07 agosto 2007.

BARROS, A. R. S. B. **Os Efeitos do Ultra-Som terapêutico nas lesões da epiderme de coelhos**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

BARROS, Jr, E. A. **Os efeitos do ultra-som na cicatrização de tendões flexores de coelhos após tenorrafia**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

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. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

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

CAMPANELLI, F. Efeitos da radiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade sobre o mal perfurante plantar (MPP), manifestação cutânea decorrente da hanseníase. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 2004.

CASAROTTO, R. A. Agentes acoplantes em fisioterapia perdas acústicas e térmicas. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, v. 7, n. ½, p. 34-35, 2000.

CLARKE, G. R., STENNER, L. Use of therpapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, v. 62, n. 6, p.185-190, 1976.

COLOMBO et al. Efeitos da variação da intensidade acústica na consolidação ultra-sônica de fraturas experimentais. **Revista de Ciência e Tecnologia**, 73-81, 1991.

CUNHA, A.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B.C., The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. **Ultrasound in Medicine and biology**, v. 27, n. 12, p. 1691-1696, 2001.

DIONISIO, V. C. **O efeito do ultra-som terapêutico na vascularização pós lesão muscular experimental em coelhos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

DUARTE, L. R., XAVIER, C. A. M. Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.18, p. 73-80, 1983.

DURIGAN, J. L.Q; et al. Mecanismos de interação do ultra-som terapêutico com tecidos biológicos. **Fisioterapia Brasil**, vol. 7, n. 2, p. 142-148, 2006.

DYSON, M. Nontermal cellular effects of ultrasound. **British Journal of Cancer**, v. 45, n. 5, p. 165-171, 1982.

DYSON, M. Role of ultrasound in wound healing. In: KLOTH, L.C. et al (Ed). **Wound healing:** alternativies management. Phyladelphia: F.A. Davis, 1990, p. 259-284.

EBAY. **Ultrasound skin body therapy and facial massager**. 2007 Disponível em:< (<u>http://cgi.ebay.com/Ultrasonic-Ultrasound-Beauty-Therapy-Facial-</u> <u>Massager_W0QQitemZ270146657301QqcmdZViewItem</u>>. Acesso em: 07 agosto 2007.

FISH, P. **Physics and Instrumentation of diagnostic medical ultrasound**. New York: Wiley Editorial Offices, 1996.

FRANÇA,J. M.; WASCZCYNSKYJ, N. **Teor de hifroxiprolina em peles de frango submetidos a tratamento térmico**. B.CEPPA, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 19-28, 2002.

FIELDHOUSE, C. Ultrasound for relief of painful epistomy scars. **Physiotherapy**, v. 65, p. 207, 1979.

FREEDBERG, I.M.; et al. **Fitzpatrick Tratado de Dermatologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2005. p. 88-259.

GAM, A. N., JOHANNSEN, F. Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: a meta-analysis. **Elsevier Sciense**, v. 63, n.1, p. 85-91, 1995.

GAN, B.S. et al. The effects of ultrasound treatment on flexor tendon healing in the chicken limb. **Journal Hands Surgery**, vol. 20, n. 6, p. 809-814, 1995.

GIBSON T. The physical properties of skin. In: Saunders, W.B, **Reconstructive Plastic Surgery**, 2. ed. General Principles, 1977, v. 1. cap. 2, p. 69-77.

GOTTRUP. F. Healing of incision wounds in stomach and duodenum collagen distribution and relation to mechanical strength. **American Journal Surgery**, v. 141, p. 222-227, 1981.

GUIDO, V.; et al. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor a domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain; **Journal of Biological Chemistry**; vol. 28, n.6, p. 3494-3504, 2006.

GUIRRO, R.; GUIRRO, E. Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial: estudo experimental em ratos. **Ciência e Tecnologia**, v. 8, p. 37-42, 1995.

GUIRRO, R.; GUIRRO E. **Fisioterapia Dermato-Funcional**, Fundamentos Recurso Patologias, 3^a ed., Barueri: Ed. Manole, 2002.

HAAR et al. Ultrasonically induced cavitation in vivo. **British Journal of Cancer**, v. 45, n. 5, p.151, 1982.

HAAR, G. Therapeutic ultrasound – Review. European Journal of Ultrasound. v. 9, p. 3-9, 1999.

HART, J. The effect of therapeutic ultrasound on dermal repair with emphasis on fibroblast activity. Tese (Doutorado) - University of London, London, 1993.

HARVEY et al., R. The in vivo stimulation of proteins synthesis in human fibroblastos, by therpapeutic levels of ultrasound. Proceedings of Second European Congress on Ultrasonics in Medicine, Excerpta Medica, Amsterdam: 10-21, 1975.

HASHISH, I. HARWEY, W., HARRIS, M. Anti-inflamatory effects of ultrasound therapy: evidency for a major placebo effect. **British Journal Reumathology**, v. 25, p. 77-81, 1996.

HERMANNS, L.T, et al. Skin tensile properties revisited ageing. Where now, where next? **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 3, p. 35-40, 2004.

HORIBE, E. K. Estética Clínica & Cirúrgica. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, p. 6, 2000.

JACKSON, B. A. ,SCHWANE, J.A. STARCHER, B.C., Effect of ultrasound therapy on the repair of Achiles tendon injuries in rats. **Medicine Science Sports Exercises**. vol. 23, n. 2, p. 171-176, 1991.

JOHANSEN, F.; GAM, A.N.; KARLSMARK, T. Ultrasound Therapy in cronic leg ulceration: a meta analysis. **Wound repair and regeneration**, v. 6, p. 121-126, 1998.

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

KITCHEN S., PATRIGE, C. J., A Review of Therapeutic Ultrasound Part 1: background and Physiological Effects. **Physiotherapy**, v. 76, n. 10, p. 593-599, 1990.

KOEKE, P.U., **Estudo comparativo da eficácia da fonoforese, do ultra-som terapêutico e da aplicação tópica de hidrocortisona no tratamento de tendão de rato em processo de reparo tecidual**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

LEHMANN, J. F.; LATEUR, B.J. de, **Therapeutic Heat and cold**. 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990.

LEVER, F. W.; SHAUMBURG-LEVER, G., **Histopatologia da Pele**, v. 1, 7 ed., São Paulo Ed. Manole, 1991, cap. 3, p. 27-29.

LONGO, G.J.; FUIRINI Jr. N. Ultra-som. São Paulo: Camanducaia; 1996.

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

LOW, J.; REED, A. Eletroterapia Explicada. São Paulo. Ed Manole, 1996.

MACDIARMID, T., BURNS, P. N., LEWITH, G. T. Ultrasound and the treatment of pressure sores. **Physiotherapy**, v. 71, p. 66-77, 1985.

MARKHAM, D. E.; WOOD, M. R. Ultrasound for dupuytren's contracture. **Physiotherapy**, v. 66, n. 2, p. 55-58, 1980.

MENDONÇA et al. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**. v.14, n. 3, p. 153-157, 2006.

MENEZES, D. F. de. **Aplicação do Ultra-som Terapêutico em Lesão Muscular Experimental Aguda**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 1997.

MILLER, K. S., KROCHTA, J. M. Oxigen and aroma barrier properties of edible films: a reviw. **Food Science and Tecnology**, v. 8, n. 7, p. 228-237, 1997.

MINOR, R.R.; A Comparison of diseases of collagen and Diseases Affecting Collagen. Collagen Metabolism. *American Journal of Pathology*. v. 98, n. 1, 1980.

MORTIMER, A. J., DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. **Ultrasound Medicine and Biology**, v. 14, n. 6, p. 499-506, 1988.

NIMNI, M. E. Collagen. Boca Raton, CRC Press, v. 1, p. 1-86, 1988a

NIMNI, M. E. Collagen. Boca Raton, CRC Press, v.2, p. 25-50, 1988b.

NORONHA, L. et al., Estudo comparativo das alterações histológicas imediatas causadas pelo uso do laser de CO2 e do laser de erbium na pele de ratos wistar, **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, n. 4, p. 273-278, 2001.

OKUNO, E., CALDAS, I.L., CHOW, C. **Física para Ciências Biológicas e Biomédicas**. São Paulo: Harba, 1986.

ORIÁ, R.B., FERNANDES, M.R., FERREIRA, F.V.A., BRITO, G.A.C., SANTANA, E.N., Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofuorescência. **Anuais Brasileiro de Dermatologia**, vol. 78, n. 4, p. 425-434, 2003.

PATRICK, M. K. Applications of therapeutic pulsed ultrasound. **Physiotherapy**, v. 64, n.4, p. 103-104, 1978.

PESCHEN, M.; et al. Low-frequency ultrasound treatment of chronic venous leg ulcers in an outpatient therapy. **Acta Dermto-Venereologia**, v. 77, n. 4, p. 311-314, 1997.

PIMENTEL, E. R. Form birrefringence of collagen bundles. Acta Histochemistry and Citochemistry. v. 14, p. 35-40, 1981.

PINFILDI, et al. O Laser de He-Ne na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. Laser Surgery Medicine, v. 37, p. 74-77, 2005.

PUGLIESE, L. S.; et al.. The influence of Low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontologia Brasileira**, v. 17, n.4, p. 307-314, 2003.

RAMIREZ et al. The effect of ultrasound on collagen syntesis and fibroblast proliferation in vitro. **Medicine Science Sports Exercises**., v. 29, n. 3 p. 326-332, 1997.

REED, B., ASHIKAGA, T. The effects of heating with ultrasound on knee joint displacent. **Journal Orthopedic Sports Physical Theray.** v. 26, p. 131-137, 1997.

ROBERTS, M. RUTHERFORK, J. H. HARRIS, D. The effect of ultrasound on flexor tendon repairs in the rabbit. **Hand**, v. 14, n. 1, p. 17-20, 1982.

ROOK, WILKINSON, EBLING, **Textbook of Dermatology**, vol. 1, 6 ed., Ed. Blackwell Science, 1998, p. 59-121.

ROSA, R. S. **Avaliação morfológica do colágeno após aquecimento induzido in vivo**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SASAKI, N., ODAJIMA, S., Stress-strain curve and young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique, **Journal Biomechanics**, vol. 29, n. 5, p. 655-658, 1996.

SAVASSI-ROCHA, P.R.; LOPES, R.L.C. Anastomoses intestinais: bases da cicatrização e análise dos diferentes tipos. In: CASTRO, L.P.: SAVASSI-ROCHA, P.R.: CUNHA-MELLO, J.R. **Tópicos em gastroenterologia**, número 5, Rio de Janeiro, 1994, p. 493-521.

SILVA, D.F.T., Análise da birrefringência do colágeno e do coeficiente de atenuação de amostras de pele sadia e queimada irradiadas pelo laser de He-Ne linearmente polarizado. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticase Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo ,2002.

SILVA, O.L.. **Estudo do mecanismo da ação do ultra-som na estimulação do tecido ósseo**.. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1987.

SOUSA, M. A. J.; VARGAS, T.J.S. Anatomia, Fisiologia e Histologia da Pele. In: KEDE, M. P. V; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. Rio de Janeiro: Ed Atheneu, 2004. p. 5-7.

STARKEY, C. Recursos Terapêuticos em Fisioterapia. São Paulo: Manole, 2001.

STARKEY, C. Ultrasound In: **Therapeutic Modalities**. 2 Ed. Philadelphia: F.A. Davis, 1999, cap. 6, p. 269-302,.

STEVENSON, et al. Function, mechanical, and biochemical assessment of ultrasound therapy on tendon healing in the chicken toe. **Plastic Reconstrutive Surgery**, v. 77, n. 6, p. 965-972, 1986.

THORTON, F.J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. In: BARBUL, A. Wound healing, **Surgery Clinical North American**, v. 77, n. 3, p. 1997.

TURNER, S., POWELL, E., NG, S.. The effect of ultrasound on the healing of repaired cockered tendon. **Journal of hand surgery**, v. 14, n. 4, 1989.

VIDAL, B.C.The part played by the micopolysaccharides in the form birefringence of collagen. **Protoplasma**, v. 59. p. 472-479, 1964.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S.; PIMENTEL, E. R. Polarization microscopy and microspectrophometry of Sirius Red, Picosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. **Histochemical Journal**, v. 14, p. 857-878, 1982.

VIDAL, B.C., Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: Microphotometric Measurements of textural birefringence. **Cellular and Molecular Biology**, v. 32, n. 5, p. 527-535, 1986. VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. Biologia Celular. Livraria Atheneu, 1987.

VIDAL, B. C., CARVALHO, H. F., Aggregational state na molecular order of tendons as a function of age. **Matrix**, v. 10, p. 48-57, 1990.

VIDAL, B.C., Image analyses of tendon helical superstructurre using interference and polarized light microscopy. 2003, **Micron**, in press.

WEBSTER, D.F., et al. The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein syntesis in human fibroblasts by ultrasound. **Ultrasound Medicine and Biology**, v. 4, p. 343-345, 1978. WELLS, P.N.T., Ultrasonics in medicine and Biology . **Physical Medicine**, v. 22, p. 629-669, 1977.

WILLIANS; A. R. Trasnduction and transmission for ultrasound. **Physiotherapy**. v. 73, n. 3 p. 113 - 116, 1987.

XAVIER, C., DUARTE, L.R., Estimulação ultrasônica do calo ósseo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, vol 18, n. 3, 1983.

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

YOUNG, S. R., Terapia por ultra-som. In KITCHEN, S. et al. **Eletroterapia de Clayton**., São Paulo: Manole, cap. 15, p. 235-58, 1998.

ZEMANECH, J. Beam behavior within the nearfield of a vibrating piston. **Journal of Acoustical society of America**, v. 49, n.1, p.181-191, 1970.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – ROTINA HISTOLÓGICA E COLORAÇÕES

DESCRIÇÃO DA ROTINA HISTOLÓGICA

- As peças permaneceram no fixador até iniciar a desidratação.
- banho em água corrente por 24 horas.

Desidratação

• O material passou por banhos de soluções crescentes de álcool etílico

70%, por 1 hora, 90% por 1 hora 95% por 1 hora

 Em seguida o material passou por 3 banhos com álcool etílico a 100% com duração de 1 hora cada banho

Diafanização

- em solução de álcool/xilol 1:1 por 1 hora
- em seguida em 3 banhos de xilol puro com duração de 1 hora cada banho
- O material foi retirado do xilol e colocado imediatamente na parafina líquida (60°), onde foi submetido a 3 banhos de parafina líquida por 1 hora cada banho.

Inclusão em blocos de parafina

Após os banhos de diafanização, as amostras foram inclusas em blocos de parafina para o procedimento dos cortes das peças.

COLORAÇÃO - HEMATOXILINA & EOSINA

Desparafinar e hidratar (3 min. cada etapa):

- 1. Xilol I
- 2. Xilol II
- 3. Álcool / Xilol (partes iguais)
- 4. Álcool absoluto
- 5. Álcool 90%
- 6. Álcool 70%
- 7. Água destilada
- A Hematoxilina deve ser filtrada em papel filtro e corada por 1,5 min. tecidos moles e 3,5 a 4 min. tecidos descalcificados (tempo variável de acordo com o uso anterior do corante)
- 9. Lavar em água de torneira tirando o excesso de corante e deixar na água por 3 min.
- 10. Agitar o frasco de Eosina (NÃO FILTRAR) e corar por 2 min. (tempo variável) Se a solução for nova, apenas alguns segundos.
- 11. Lavar rapidamente em água de torneira até tirar o excesso de corante.
- 12. Passar rapidamente no álcool 5% (os passos seguintes serão de 3 min. cada para desidratar, diafanizar e montar)
- 13. Álcool absoluto I
- 14. Álcool absoluto II
- 15. Álcool / Xilol (partes iguais)
- 16. Xilol I
- 17. Xilol II as lâminas ficam imersas no xilol enquanto vão sendo montadas.

Montar com lamínula e PermounT

COLORAÇÃO - TRICRÔMICO DE MASSOM

Desparafinar e hidratar (4 min. cada etapa):

- 18. Xilol I
- 19. Xilol II
- 20. Álcool / Xilol (partes iguais)
- 21. Álcool absoluto
- 22. Álcool 90%
- 23. Álcool 70%
- 24. Água destilada
- 25. A Hematoxilina deve ser filtrada em papel filtro e corada por 1,5 min. para tecidos moles e 3 a 4 min. para tecidos descalcificados (tempo variável de acordo com o tempo de uso anterior da solução)
- 26. Lavar em água de torneira tirando o excesso de corante e deixar na água por 4 min.
- 27. Lavar em água acética a 1% (1 minuto)
- 28. Mergulhar rapidamente em água destilada
- 29. Corar na Solução A por aproximadamente 10 seg. (observação1)
- 30. Lavar rapidamente em água de torneira até tirar o excesso de corante.
- 31. Lavar em água acética a 1% (1 minuto)
- 32. Lavar em água destilada (2 minutos)
- 33. Lavar em ácido fosfomolibídico a 1% durante 5 a 8 minutos, controlando a cor dos cortes que passaram de uma cor carmim intensa para um rosa/carmim mais claro.
- 34. Passar por água destilada

- 35. Corar na Solução B por aproximadamente 25 seg. (observação 2)
- 36. Lavar em água de torneira para tirar o excesso de corante
- 37. Lavar em água acética a 1% (1 min.)
- 38. Passar por água destilada
- 39. Banho em ácido fosfomolibídico por 5 min. para fixar a cor azul da solução B.
- 40. Lavar rapidamente em água de torneira
- 41. Passar rapidamente no álcool 95% (os passos seguintes serão de 4 min. cada para desidratar, diafanizar e montar)
- 42. Álcool absoluto I
- 43. Álcool absoluto II
- 44. Álcool / Xilol (partes iguais)
- 45. Xilol I
- 46. Xilol II

Montar com lamínula e Permount

(observação 1) Solução A do tricromico de Masson

Fucsina ácida	1g
Biebricht	1g
Água Destilada	200ml
Ácido acético	1ml

(observação 2) Solução B do tricromico de Masson

Azul de anilina	2g
Água destilada	100ml
Ácido acético	2,5ml

APÊNDICE B – MEDIDAS DE RO (nm) DOS GRUPOS























9. ANEXOS

ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA

