

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO  
NA INTEGRAÇÃO DE ENXERTOS  
DE PELE TOTAL EM COELHOS.**

**Adriana da Costa Gonçalves Amâncio**

Ribeirão Preto

2003

**EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO  
NA INTEGRAÇÃO DE ENXERTOS  
DE PELE TOTAL EM COELHOS.**

**Adriana da Costa Gonçalves Amâncio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri

Ribeirão Preto

2003

## FICHA CATALOGRÁFICA

A484e Amâncio, Adriana da Costa Gonçalves  
Efeitos do ultra-som terapêutico na integração de enxertos de pele total em coelhos / Adriana da Costa Gonçalves Amâncio. -- Ribeirão Preto, 2003.


Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2003.

Área Interunidades: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri.

1. Enxerto de pele. 2. Ultra-som terapêutico.  
3. Proliferação Celular. 4. Angiogênese. 5. Integração.  
I. Título.

## DEDICATÓRIA



Aos meus pais, Renato (*in memoriam*) e Maria Helena, por toda uma vida de amor e dedicação. Obrigada por todos os momentos, todas as lições e lembranças, que se tornam a cada dia mais presentes em minha vida.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri, pela orientação, apoio e confiança na realização deste trabalho.

Aos meus filhos Juliana e Renato meu estímulo para continuar. Obrigada por compreenderem minha ausência.

Aos meus irmãos: Tetê, Marcelo, André e Júlio, meus cunhados e sobrinhos, todo meu carinho pelos conselhos e ajuda.

À Tetê, em especial, minha irmã, amiga e companheira, que compensou minha ausência em muitos momentos para realização deste trabalho.

Ao meu irmão Marcelo, em especial, toda minha admiração e gratidão pela ajuda, dedicação e capacidade profissional, na elaboração deste trabalho.

À toda minha família que sempre me ajudou e estimulou, em especial minha tia Leco, por tanto amor e confiança.

A Rui Sampaio Amâncio pela vivência e aceitação das ausências.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Nilton Mazzer, pela amizade, estímulo e incentivo no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Sérgio Brito Garcia, toda minha admiração pela sua competência e seriedade no trabalho histológico realizado. Agradeço também pelas lições de vida e por todas as boas lembranças.

Ao Prof. Dr. José Antônio Thomazini, pela sua capacidade profissional na captura das imagens histológicas; agradeço sua sincera amizade e seus valiosos conselhos.

Ao Dr. Marcelo de Almeida Mantilla, a pessoa mais amiga e humana que tive o prazer de conhecer e conviver, obrigada pela ajuda na realização das cirurgias experimentais.

Ao Prof. Dr. Marcos Rossi, pela atenção e competência na análise e registro da técnica histológica específica ao colágeno.

Ao Prof. Dr. Sérgio Zucoloto, que criou condições para a utilização do fotomicroscópio.

Aos professores Picado e Shimano, pelas sugestões feitas no exame de qualificação.

À todo pessoal da Bioengenharia, pela convivência e amizade, em especial à Terezinha, Chico e Luís Henrique.

Aos funcionários da Bioengenharia de São Carlos, em especial à Janete.

Aos colegas da Bioengenharia Adriana Valadares, Vítor, Marinheiro, Marcelo, Ricardo e em especial à Rosângela, minha companheira e amiga.

Ao colega Marcos Shimano, pelo auxílio na análise estatística e elaboração dos gráficos.

Às técnicas do Laboratório de Patologia, Rose, Lena e Auristela pela ajuda, dedicação e convivência.

Ao Prof. Dr. Yuri, pela atenção e dedicação na tradução dos textos em russo.

Aos amigos e coordenadores do Centro Universitário Barão de Mauá, pela compreensão e ajuda nos momentos necessários.

Aos amigos da Seção de Reabilitação do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, em especial, à Marisa e Valéria que sempre me apoiaram e incentivaram na realização deste e outros trabalhos.

Aos colegas e pacientes da Unidade de Queimados, pelo companheirismo e compreensão em todos os momentos

À todos os amigos que me ajudaram a acreditar e realizar este trabalho.

**OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Objetivo .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Arquitetura do tegumento.....</b>	<b>2</b>
<i>1.2.1 Pele.....</i>	<i>3</i>
<i>1.2.2 Tela subcutânea.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.3 Vascularização do tegumento.....</i>	<i>4</i>
<b>1.3 Reparação tecidual .....</b>	<b>5</b>
<i>1.3.1 Fase inflamatória .....</i>	<i>6</i>
<i>1.3.2 Fase proliferativa .....</i>	<i>6</i>
<i>1.3.2.1 Angiogênese .....</i>	<i>7</i>
<i>1.3.2.2 Proliferação fibroblástica.....</i>	<i>7</i>
<i>1.3.2.3 Epitelização.....</i>	<i>7</i>
<i>1.3.3 Fase de maturação .....</i>	<i>8</i>
<b>1.4 Enxertos cutâneos .....</b>	<b>8</b>
<i>1.4.1 Características do enxerto de pele total .....</i>	<i>9</i>
<i>1.4.2 Integração do enxerto.....</i>	<i>10</i>
<i>1.4.3 Vascularização ou fisiopatologia do enxerto de pele .....</i>	<i>11</i>
<i>1.4.3.1 Embebição plásmática.....</i>	<i>11</i>
<i>1.4.3.2 Inosculação dos vasos sanguíneos ou vascularização .....</i>	<i>12</i>
<b>1.5 Ultra-som.....</b>	<b>13</b>



1.5.1	<i>Bases físicas do ultra-som</i> .....	13
1.5.2	<i>Mecanismos de interação do ultra-som e tecidos biológicos</i> .....	15
1.5.2.1	<i>Efeitos térmicos</i> .....	15
1.5.2.2	<i>Efeitos não térmicos</i> .....	16
1.5.3	<i>Uso terapêutico do ultra-som na reparação tecidual</i> .....	17
1.5.3.1	<i>Efeitos do US na reparação do tecido tegumentar</i> .....	17
1.5.3.2	<i>Efeitos do US na angiogênese, síntese de colágeno e proliferação celular</i> :.....	19
1.5.3.3	<i>Aplicação do UST em enxertos cutâneos e outros</i> .....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>22</b>
2.1	<b>Animal utilizado</b> .....	<b>22</b>
2.2	<b>Procedimento cirúrgico</b> .....	<b>22</b>
2.3	<b>Aplicação do ultra-som</b> .....	<b>25</b>
2.4	<b>Sacrifício do animal</b> .....	<b>26</b>
2.5	<b>Análise histológica</b> .....	<b>26</b>
2.6	<b>Análise estatística</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
3.1	<b>Análise macroscópica</b> .....	<b>29</b>
3.2	<b>Análise histológica</b> .....	<b>30</b>
3.2.1	<i>Morfometria</i> .....	30
3.2.2	<i>Proliferação celular</i> .....	30
3.2.3	<i>Angiogênese</i> .....	31
3.2.4	<i>Direcionamento das fibras de colágeno</i> .....	32
3.3	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>33</b>
3.3.1	<i>Morfometria</i> .....	33
3.3.2	<i>Contagem de células em proliferação</i> .....	36
3.3.3	<i>Contagem de vasos neoformados</i> .....	38
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Divisão do tegumento .....	3
FIGURA 2 Vascularização do tegumento.....	5
FIGURA 3 Espessura dos vários tipos de enxerto de pele livre.....	9
FIGURA 4 Influência da imobilização na vascularização do enxerto de pele livre .....	11
FIGURA 5 Diagrama do processo de integração do enxerto de pele livre .....	12
FIGURA 6 Fotografias ilustrativas das etapas do procedimento cirúrgico.....	24
FIGURA 7 Fotografias ilustrativas das etapas de aplicação do ultra-som e preparação do material para análise histológica .....	26
FIGURA 8 Fotografias ilustrativas dos resultados macroscópicos .....	29
FIGURA 9 Fotomicrografia corada com Tricrômico de Gomori em secção longitudinal de pele de coelho após enxerto de pele total para morfometria das áreas ..	30
FIGURA 10 Fotomicrografia corada com PCNA (imunohistoquímica) em secção longitudinal de pele de coelho após enxerto de pele total.....	31
FIGURA 11 Fotomicrografia corada com Tricrômico de Gomori em secção longitudinal de pele de coelho após enxerto de pele total para contagem de vasos. ....	32
FIGURA 12 Fotomicrografia corada com Picrosirius em secção longitudinal de pele de coelho após enxerto de pele total para análise do direcionamento das fibras de colágeno .....	33
FIGURA 13 Representação gráfica da área da epiderme.....	34
FIGURA 14 Representação gráfica da área da derme .....	36
FIGURA 15 Representação gráfica da contagem de células em proliferação .....	38
FIGURA 16 Representação gráfica da contagem de vasos neoformados.....	39

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 Valores da morfometria da área da epiderme .....	34
TABELA 2 Valores da morfometria da área da derme.....	35
TABELA 3 Valores percentuais médios da contagem das células em proliferação.....	37
TABELA 4 Valores médios da contagem de vasos neoformados.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EESC. - Escola de Engenharia de São Carlos

Et al. - Colaboradores

Ltda - Limitada

PCNA - *Proliferation cell nuclear antigen*

PO - Pós-operatório

SATA - *Spatial Average and Temporal Average*

US - Ultra-som

USP - Universidade de São Paulo

UST - Ultra-som terapêutico

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{cm}^2$  - Centímetro quadrado (unidade de medida de área)

Hz - Hertz (unidade de medida de frequência)

KHz - Kiloherz (unidade de medida de frequência igual à mil Hertz)

MHz -Megahertz (unidade de medida de frequência igual à um milhão de Hertz)

$\text{W}/\text{cm}^2$  - Watts por centímetro quadrado (quantidade de energia por unidade de área em uma unidade de tempo)

$\mu\text{m}$  - Micrômetro (unidade de medida usada em histologia,  $1\mu\text{m}=0,001$  milímetro)

$\mu\text{m}^2$  - Micrômetros quadrados (unidade de área)

## RESUMO

O ultra-som terapêutico é um recurso físico muito empregado como coadjuvante na promoção do reparo tecidual. Neste trabalho, foi estudada a influência do ultra-som terapêutico na integração dos enxertos de pele total num modelo experimental em coelhos. Foram utilizados 20 coelhos adultos, fêmeas, nos quais foram realizadas cirurgias de enxerto autógeno de pele total nas regiões escapulares, pela ressecção de dois retalhos quadrados de pele de 2 cm de lado, invertendo sua posição, o enxerto retirado do lado direito sendo colocado na área receptora esquerda e vice-versa. O enxerto do lado direito era submetido ao tratamento efetivo com o ultra-som (3 MHz, 0,5 W/cm<sup>2</sup>, 5 minutos) e o enxerto do lado esquerdo, a tratamento placebo, iniciado no 3<sup>o</sup> dia pós-operatório e aplicado diariamente por sete dias. Os animais eram sacrificados no 11<sup>o</sup> dia pós-operatório e os enxertos, ressecados com uma margem de segurança, para análise histopatológica, com cortes de 5 µm. Foram obtidos cortes histológicos corados com técnicas específicas (Tricrômico de Gomori, PCNA e Picrosirius) e analisados ao microscópio de luz, sendo realizada a contagem das células em proliferação e dos vasos neoformados e a morfometria das áreas da epiderme e derme. Os resultados mostraram um significativo aumento no número de células em proliferação na epiderme e vasos neoformados na camada reticular da derme, mas isto não implicou em uma diferença entre as áreas da epiderme e derme, nos enxertos irradiados e não irradiados. Concluímos que o ultra-som terapêutico induz alterações morfológicas nos processos biológicos, como proliferação celular da camada germinativa da epiderme e neoangiogênese, envolvidos na integração de enxertos de pele total, com um potencial de aplicação clínica em humanos.

**Palavras-chave:** enxerto de pele; ultra-som terapêutico; proliferação celular; angiogênese; integração

## ABSTRACT

Therapeutic ultrasound is a widely used co-adjuvant physical mean to promote tissue repair. In the present investigation, the influence of therapeutic ultrasound on the integration of full-thickness skin graft was studied in rabbits. Twenty female adult rabbits were used, two 2x2 cm square-shaped full-thickness skin grafts being obtained from both scapular regions and swapped, the one cut out on the right being placed on the left and vice-versa. The graft on the right was effectively irradiated with the therapeutic ultrasound (3 MHz, 0,5 W/cm<sup>2</sup>, 5 minutes) for seven days beginning on the third postoperative day. The graft on the left was submitted to a sham irradiation. The animals were killed on the 11<sup>th</sup> day and the grafted areas were resected (graft + safety margin) for histologic examination by means of 5 µm-thick sections alternatively stained with Gomori's trichrome, PCNA and Picosirius and examined on the light microscope. Eider proliferating cells and new blood vessels were counted, as well as the epidermic and dermic areas were measured. The results showed a significant increase in the number of epidermic proliferating cells and new blood vessels, but this did not imply any difference between the epidermic and dermic areas between irradiated and non-irradiated grafts. We conclude that the therapeutic ultrasound induces morphologic alterations in the biologic processes, as epidermic germinative layer cell proliferation and neo-angiogenesis, involved in the integration of full-thickness skin grafts and this has a potential for clinical use in humans.

**Keywords:** skin graft; therapeutic ultrasound irradiation; germinative cell proliferation; angiogenesis; integration.

## 1 INTRODUÇÃO

As queimaduras extensas representam um dos quadros clínicos mais graves pelos seus efeitos locais e sistêmicos, e constituem uma afecção de tratamento demorado. O tratamento das queimaduras é eminentemente cirúrgico (PINTO, 1997; ALVES, 1988), sendo as cirurgias de enxertia de pele o recurso necessário para a sobrevivência destes pacientes.

O tratamento do paciente queimado, além de trabalhoso, causa sofrimento, devido ao longo período de internação, com vivência de momentos de dor e sofrimento, até que as cirurgias de enxertia tenham sido realizadas e todas regiões comprometidas epitelizadas.

A necessidade de uma equipe multidisciplinar, o longo período de internação, os cuidados rigorosos quanto ao controle de infecções e os inúmeros procedimentos cirúrgicos são alguns dos fatores que implicam no alto custo do tratamento destes pacientes.

Estudos realizados sobre a ação da energia ultra-sônica na regeneração de pele animal (DYSON et al., 1968; YOUNG; DYSON, 1990a) originaram novos procedimentos no tratamento de úlceras varicosas (DYSON; SUCKLING, 1978; ROCHE; WEST, 1984), úlceras de pressão (RIET et al., 1996), fraturas ósseas (GEBAUER et al., 2002; XAVIER; DUARTE, 1983) entre outros. Alves (1988) desenvolveu pesquisas sobre os efeitos da energia ultra-sônica na reparação da pele animal com queimadura por calor.



Estudos clínicos recentes mostram que o ultra-som pode reduzir edemas, favorecer a circulação sanguínea, relaxar a musculatura, aliviar a dor, acelerar o reparo tecidual e modificar a formação de cicatriz (COAKLEY, 1978; DYSON, 1985; DYSON; SUCKLING, 1978; HAAR, 1999; HOOGLAND, 1986; MAXWELL, 1992; YOUNG; DYSON, 1990a).

Estudos específicos do uso do ultra-som em enxertos de pele são escassos, mas há evidências de que seus efeitos sejam benéficos, acelerando e melhorando a qualidade da integração (AYANACI et al., 2002; IVANOVV, 1987).

Estes trabalhos estimularam-nos a estudar os efeitos do ultra-som terapêutico na integração dos enxertos de pele, sendo os objetivos da presente investigação demonstrar a aceleração ou melhoria da integração dos enxertos, podendo originar um novo procedimento clínico, com benefícios para os pacientes queimados, diminuição do tempo de internação, antecipação do processo de reabilitação e melhoria das possíveis seqüelas funcionais e estéticas.

## **1.1 Objetivo**

O objetivo deste trabalho é estudar os efeitos da estimulação ultra-sônica na integração de enxertos de pele total em coelhos, mediante uma análise histológica.

## **1.2 Arquitetura do tegumento**

A pele e a tela subcutânea constituem uma unidade morfológica chamada tegumento, constituído de vários estratos, em uma típica construção estratigráfica, que recobre toda a superfície do corpo (Figura 1).

É um órgão complexo, muitas vezes esquecido, que é essencial para manutenção da vida (FERREIRA; DUARTE, 1995; JOHNSON; NELSON, 1995), com funções específicas como: proteção, comunicação, sensibilidade, regulação da temperatura corpórea, excreção, reserva energética, síntese de vitamina D e função plástica (GONÇALVES et al., 1980; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

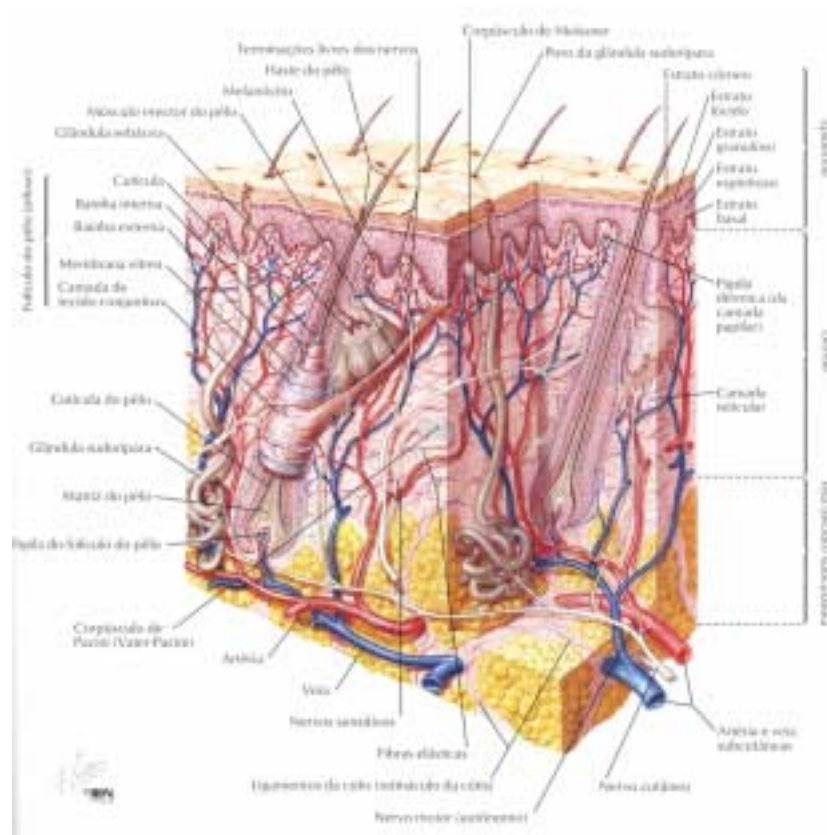


Figura 1 - Divisão do tegumento (NETTER, 2001)

### 1.2.1 Pele

A pele é o conjunto de estruturas mais superficiais do tegumento, sendo elástica, áspera e, em condições normais, auto-regeneradora (GONÇALVES et al., 1980; JACOB; FRANCONI, 1974). É constituída de dois estratos principais que se superpõem: a epiderme, ou cútis e a derme, ou cório.

A epiderme é a camada mais superficial, avascular e segundo Jacob; Francone (1974), composta de cinco camadas (do interior para a superfície): germinativa (atividade mitótica); espinhosa; granulosa; lúcida e córnea (células mortas).

A população celular é mantida constante pela multiplicação das células da camada basal ou germinativa. A partir desta camada, as células são empurradas para a superfície em um processo de maturação, que culmina com a morte celular.

A derme é a segunda camada da pele, representando mais de 90% da espessura total do tegumento. É composta predominantemente por fibras colágenas e elásticas (CASTRO et al., 1994) e dividida em duas camadas: papilar (mais superficial e delgada), e reticular (profunda e mais espessa).

Algumas camadas podem não estar presentes em algumas regiões, com exceção do estrato córneo e o estrato germinativo, que são constantes na pele em todas as regiões do corpo (DOCKHORN et al., 1992).

### ***1.2.2 Tela subcutânea***

A tela subcutânea ou hipoderme se interpõe entre a pele e os planos profundos subjacentes, apresentando três estratos superpostos: areolar (contém tecido fibroso e adiposo); fascia superficial (tecido conjuntivo denso) e lamelar ("plano de escorregamento do tegumento") (GONÇALVES et al., 1983).

### ***1.2.3 Vascularização do tegumento***

Os vasos arteriais do tegumento se dispõem em três plexos que se localizam em diferentes planos. O mais profundo está localizado no estrato lamelar (plexo

subcutâneo), dele partindo ramos que nutrem a tela subcutânea e formam um segundo plexo, no limite entre a tela e a derme. Os ramos deste segundo plexo (plexo subdermal) nutrem a derme e se dirigem às papilas dérmicas, onde formam um terceiro plexo, chamado subpapilar, localizado entre as camadas papilar e reticular da derme. Deste último plexo partem finos ramos que penetram nas papilas e nutrem a epiderme por difusão, pois esta é avascular (CORMACK, 1991; GONÇALVES et al., 1983; HAN; MUSTOE, 2000) (Figura 2).

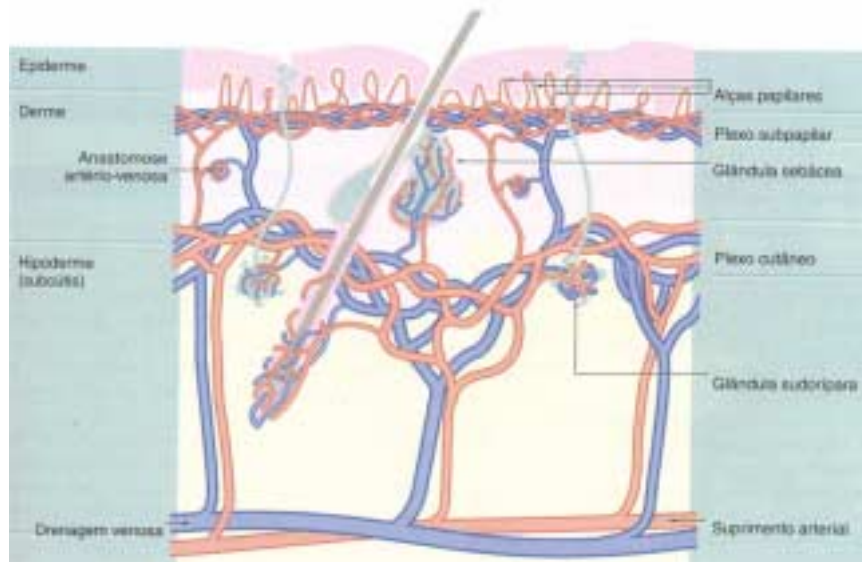


Figura 2 - Vascularização do tegumento. (YOUNG; HEATH, 2001)

### 1.3 Reparação tecidual

Carrel (1910) reconheceu três fases nos eventos da cicatrização, aceitos até hoje, a saber: 1) fase inflamatória ou inicial (até o 4<sup>o</sup> dia); 2) fase fibroblástica ou proliferativa (até o 14<sup>o</sup> dia) e 3) fase de maturação (a partir do 14<sup>o</sup> dia).

### ***1.3.1 Fase inflamatória***

A reparação tecidual começa no momento em que a integridade do tecido é rompida. Nesta fase, as reações inflamatórias agudas estão intimamente associadas a respostas vasculares (aumento da permeabilidade capilar) e respostas celulares, provocadas pela ação de mediadores químicos (MODOLIN; KAMAKURA, 1981).

A resposta celular inicia-se com a chegada dos leucócitos que junto ao plasma, eritrócitos, tecido desvitalizado, constituem o exsudato inflamatório, que se forma horas após a lesão, preenchendo o espaço da ferida.

Outras células entram em cena para estabilizar a inflamação aguda e prevenir a infecção, atuando como fator direcional da cicatrização, preparando a ferida para a fase de proliferação e estimulando também a angiogênese (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998).

### ***1.3.2 Fase proliferativa***

Segundo Modolin; Bevilacqua (1988), essa fase inicia-se de três a cinco dias após o ferimento, podendo estender-se até o décimo dia após a lesão (MODOLIN; KAMAKURA, 1981).

Como o número de macrófagos na lesão começa a diminuir, outras células (fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos) começam a sintetizar e secretar fatores de crescimento que estimulam a proliferação e síntese de matriz proteica extracelular e também angiogênese (MAST; COHEN, 2000). Esta fase envolve a angiogênese, a proliferação fibroblástica e a epitelização.

### *1.3.2.1 Angiogênese*

Na angiogênese, os macrófagos levam as células inflamatórias a secretarem substâncias conhecidas como fatores angiogênicos, os quais passam a atrair células mesoteliais e endoteliais, que proliferam e formam botões capilares. A nova superfície capilar invade o plano da derme e conecta-o aos outros capilares intactos do tecido subjacente.

### *1.3.2.2 Proliferação fibroblástica*

A migração de fibroblastos para o interior da ferida se faz ao longo de malhas de fibrina, que atuam como moldes para os elementos de reparação, formando "andaimos" para a deposição dos fibroblastos. A fibrina é originada do exsudato inflamatório da ferida, tendo também propriedades hemostáticas.

O fibroblasto é a célula que produz colágeno, fibras elásticas e substância fundamental, responsável pela aderência das feridas cirúrgicas nos primeiros 6 dias de cicatrização (MODOLIN; KAMAKURA, 1981).

### *1.3.2.3 Epitelização*

A reparação epitelial é uma fase precoce no processo de cicatrização. Já nas primeiras 24 horas após a lesão começa a proliferação celular nas bordas da ferida, levando a um espessamento do epitélio marginal. Ao mesmo tempo, inicia-se a migração das células epiteliais proliferadas, que, perdendo sua aderência às demais, deslizam sobre o tecido constituinte do assoalho da ferida (no caso da pele será sobre a derme), a partir da camada basal (GOLDENBERG; BEVILACQUA, 1981; JANKAUKAS et al., 1991).

Tanto para a migração como para a proliferação celular, os estímulos não são precisamente conhecidos.

### ***1.3.3 Fase de maturação***

É a última fase da cicatrização e a mais longa. Começa na terceira semana após o trauma e persiste por meses e até anos. Durante este período, o tecido de granulação retrocede, o colágeno depositado se remodela e uma cicatriz madura se forma (COTRAN et al., 1994).

## **1.4 Enxertos cutâneos**

“A enxertia cutânea consiste no transplante de uma porção do tegumento, constituída de epiderme e derme, completamente destacada de seu local de origem (área doadora) e transferida para outra região (área receptora), onde adquire novo suprimento sangüíneo, assegurando a viabilidade das células transplantadas” (CASTRO et al., 1994).

Os enxertos cutâneos podem ser classificados de várias maneiras, mas quanto à sua espessura pode-se citar: a) enxertos cutâneos de espessura total ou de Wolf e Krause (contêm a epiderme e a espessura total da derme do local de origem), b) enxertos cutâneos de espessura parcial (contêm a epiderme e uma porção do componente dérmico). São subdivididos em fino, intermediário e espesso (CASTRO et al., 1994; FERREIRA; DUARTE, 1995; MILAN et al., 2001) (Figura 3).

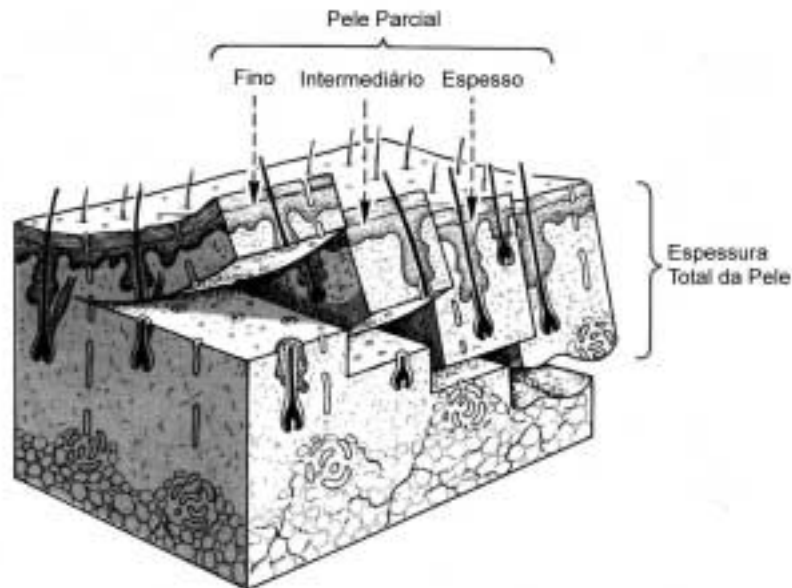


Figura 3 - Espessura dos vários tipos de enxerto de pele livre (MCGREGOR, 1995).

#### 1.4.1 Características do enxerto de pele total

Após o transplante, estes enxertos apresentam maior semelhança com a pele normal em pigmentação e textura, menor contração secundária e melhor resultado estético e funcional. Conservam as estruturas cutâneas acessórias, permitindo o crescimento de pêlos e o funcionamento glandular na área receptora.

Ely (1965) cita que os enxertos de pele total são mais resistentes, mas têm como desvantagens a integração sofrível, a maior tendência a infecção (CARMO et al., 2001) e a limitação na sua aplicação, devido principalmente a área doadora, que não epiteliza espontaneamente pois não sobram estruturas cutâneas acessórias. Esta região deve ser fechada primariamente ou enxertada com pele. Isso limita o tamanho do enxerto de pele total, que fica restrito aos defeitos pequenos (GLOGAU; HAAS, 1995).



### ***1.4.2 Integração do enxerto***

O enxerto de pele, colocado sobre a área cruenta, recebe inicialmente nutrição por osmose. Gradualmente se desenvolvem os capilares, que penetram e vão progressivamente revascularizá-lo (ELY, 1965).

Nas primeiras oito horas o enxerto apresenta importante adesão, com um vagaroso aumento da aderência em torno do quarto dia.

O enxerto de pele total integra-se menos prontamente que o enxerto de pele parcial, necessitando de condições ótimas para ser usado com sucesso.

A escolha da área doadora, o preparo rigoroso do leito receptor e a fixação do enxerto são fatores determinantes na integração do enxerto (DOCKHORN et al., 1992).

Segundo Castro et al. (1994) os enxertos de pele total necessitam de excelente vascularização do leito receptor para sobreviverem. A vascularização deve ser rápida e a distância entre os brotos capilares deve ser curta.

As causas mais freqüentes de perda do enxerto são a presença de hematoma que separa o enxerto do leito e os movimentos de cisalhamento que impedem a adesão do enxerto, ambas impedindo a ligação entre os capilares e a vascularização (MCGREGOR, 1995) (Figura 4).

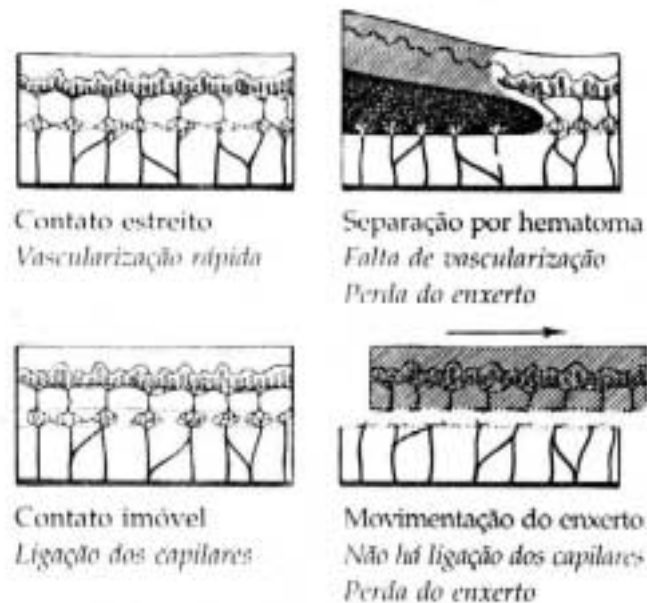


Figura 4 - Influência da imobilização na vascularização do enxerto de pele livre (MCGREGOR, 1995).

### 1.4.3 Vascularização ou fisiopatologia do enxerto de pele

Segundo Castro et al., 1994 os mecanismos básicos de vascularização dos enxertos de pele são:

#### 1.4.3.1 Embebição plasmática

Imediatamente após a enxertia, inicia-se a formação de um líquido de aspecto plasmático que é absorvido pelo enxerto. Forma-se uma malha entre o enxerto e o leito receptor, que serve para mantê-lo em posição. O enxerto se nutre nas primeiras 48 horas por embebição no plasma do leito receptor (DOCKHORN et al., 1992; JANKAUKAS et al., 1991).

Segundo Modolin (1988) nas primeiras vinte e quatro horas a nutrição do enxerto dá-se às custas de dois mecanismos: 1) os vasos remanescentes no enxerto apresentam-se dilatados, com uma pressão quase nula no seu interior, permitindo a

entrada de plasma da área receptora para o interior do enxerto; 2) pela própria estrutura do colágeno do enxerto, há uma diferença de pressão osmótica entre esse e a área receptora, ocorrendo a passagem de água e eletrólitos para o enxerto.

#### 1.4.3.2 *Inosculação dos vasos sangüíneos ou vascularização*

Após 48 horas, estabelecem-se condutos vasculares na rede de fibrina entre o enxerto e seu leito. O sangue penetra nos vasos do enxerto produzindo uma verdadeira circulação (neovascularização) entre o quarto e sétimo dia pós operatório (PO), sendo que o desague linfático se instaura no quinto dia. Estes resultados confirmam que a vascularização do enxerto de pele total é acompanhada através de precoces anastomoses entre os vasos pequenos originais do enxerto e o leito receptor (FERREIRA; DUARTE, 1995).

O enxerto inicialmente adere ao seu novo leito através da fibrina e a revascularização é feita mediante crescimento de brotos capilares da região receptora que se unem aos da superfície profunda do enxerto (Figura 5).

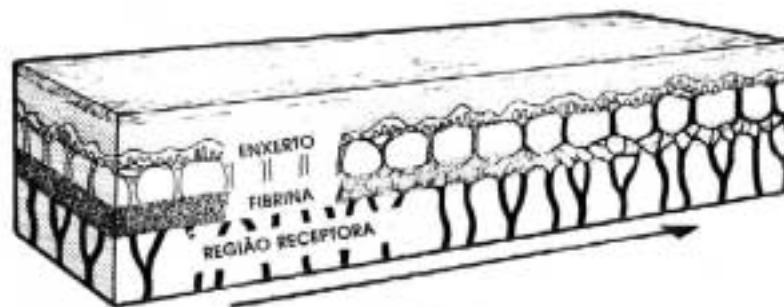


Figura 5 - Diagrama do processo de integração do enxerto de pele livre (MCGREGOR, 1995).

Concomitante com a ligação vascular, a fibrina é infiltrada por fibroblastos que transformam a adesão tênue feita pelo coágulo de fibrina em uma conexão definitiva por tecido fibroso. Com quatro dias de enxerto há uma firmeza nesta conexão, o que permite o manuseio seguro do enxerto (MCGREGOR, 1995).

No nono dia, já há cicatrização entre o enxerto e o leito receptor e o infiltrado começa a desaparecer. A epiderme começa a apresentar alterações regenerativas evidentes e a derme apresenta grande quantidade de vasos de neoformação (FERREIRA; DUARTE, 1995). Novos canais são formados do leito para o enxerto, constituindo assim a nova circulação do transplante, a qual, pelo décimo dia, está completa (BADIM, 1971).

Como a vascularização é mais lenta quanto mais espesso for o enxerto, os enxertos finos em geral se integram mais facilmente do que os enxertos espessos (MCGREGOR, 1995).

Quando o enxerto não se vasculariza, ocorre necrose, podendo haver perda parcial ou total do enxerto. A necrose parcial epidérmica (epidermólise) no pós-operatório dos enxertos de pele total corresponde a 25% dos casos (VILALBA et al., 1995).

## **1.5 Ultra-som**

### ***1.5.1 Bases físicas do ultra-som***

O som pode ser definido fisicamente como uma perturbação mecânica que se desloca através de ondas em um meio material. Quando a frequência destas ondas ultrapassa 20 KHz elas são chamadas de ultra-sônicas, sendo que na prática são

utilizadas frequências entre 0,7 e 3,0 MHz (HOOGLAND, 1986; LOW; REED, 2001).

As vibrações ultra-sônicas são ondas mecânicas que transferem energia de um ponto a outro. As ondas podem se propagar longitudinal ou transversalmente (DYSON, 1990), no caso do ultra-som (US) a onda se propaga longitudinalmente (direção de oscilação igual a direção de propagação).

As ondas ultra-sônicas são geradas por meio de um transdutor que converte energia elétrica em energia mecânica e vice-versa, graças a capacidade piezoelétrica dos materiais de que são feitos (DYSON, 1985; DYSON, 1990; HAAR, 1978; HAAR, 1998; LOW; REED, 2001).

Para ocorrer a transmissão de ondas nos tecidos biológicos é necessário um meio acoplador, com a função de eliminar o ar entre o transdutor e o tecido, assegurando que a energia ultra-sônica chegue ao tecido alvo. Em geral, os meios mais utilizados são água, géis e alguns tipos de óleos, como a vaselina (DOCKER et al., 1982; DRAPER et al., 1993; DYSON, 1990; HAAR, 1998).

O ultra-som pode ser produzido na forma de ondas contínuas ou pulsadas, sendo que a diferença entre elas está na interrupção ou não da propagação de energia.

Na interação do ultra-som e tecidos biológicos, ocorre a formação de um campo de perturbações mecânicas, com efeitos biológicos associados, sendo estes efeitos classificados como térmicos e não térmicos (mecânicos).

## ***1.5.2 Mecanismos de interação do ultra-som com os tecidos biológicos***

### ***1.5.2.1 Efeitos térmicos***

Os efeitos térmicos caracterizam-se pela transformação de energia mecânica em calor (YOUNG, 1998). Quando o ultra-som desloca-se através dos tecidos, uma parte dele é absorvida ou atenuada, e isto conduz à geração de calor dentro do tecido. A quantidade de absorção depende da natureza do tecido, seu grau de vascularização e frequência do ultra-som (quanto maior a frequência, maior a absorção). Quanto maior a intensidade, maior a produção de calor nos tecidos (GARAVELLO et al., 1997).

Estima-se que para uma saída de  $1 \text{ W/cm}^2$  haja um aumento de temperatura de  $0,8 \text{ }^\circ\text{C/min}$  se os efeitos do resfriamento vascular forem ignorados (DYSON, 1990; LOW; REED, 2001).

Como a atenuação aumenta com a elevação da frequência, as frequências mais baixas penetram mais, portanto a energia emitida em um ultra-som de 3 MHz é absorvida nos tecidos superficiais enquanto o ultra-som de 0,75 MHz penetra profundamente através dos tecidos.

O aquecimento controlado pode produzir efeitos desejáveis como alívio da dor, diminuição da rigidez articular e aumento do fluxo sanguíneo. Temperaturas entre  $40^\circ\text{C}$  -  $45^\circ\text{C}$  podem contribuir para melhorar a vascularização dos tecidos, mas temperaturas mais elevadas podem causar dano tecidual (COAKLEY, 1978; DYSON, 1990).

Os efeitos térmicos do ultra-som são de menor importância do que os não térmicos (DYSON et al., 1968).

### *1.5.2.2 Efeitos não térmicos*

Em relação aos efeitos não térmicos podemos citar: o aumento da permeabilidade celular, aumento da síntese protéica, aumento do fluxo de íons de cálcio e metabólitos através da membrana celular afetando de forma positiva a reparação tecidual. Os efeitos físicos não térmicos do ultra-som terapêutico (UST) são produzidos pela cavitação, correntes acústicas, ondas estacionárias e micromassagem (LOW; REED, 2001).

O ultra-som pode provocar a formação de bolhas ou cavidades micrométricas nos líquidos contendo gás, que vibram num certo grau de tensão, sendo então produzidas alterações reversíveis na permeabilidade das membranas celulares nas proximidades onde está ocorrendo o evento de cavitação (DYSON, 1985; DYSON, 1990; DYSON; SUCKLING, 1978). Amplitudes de alta pressão podem resultar num evento cavitacional mais violento, podendo ser lesivo.

As vibrações acústicas induzem mudanças celulares, alterando o gradiente de concentração das moléculas e íons (cálcio e potássio), estimulando a atividade celular, caso esta vibração ocorra nos limites da membrana celular com o líquido circunjacente (HAAR, 1999). Esse fenômeno pode resultar num aumento da síntese protéica, aumento da secreção de mastócitos, alterações na mobilidade dos fibroblastos, entre outros (HAAR, 1998).

As ondas estacionárias podem ser lesivas, podendo ser evitadas com a movimentação contínua do aplicador durante todo o período de tratamento, e também pela utilização de baixas intensidades.

No modo pulsátil os efeitos mecânicos (não térmicos) são mais pronunciados e os efeitos térmicos mínimos (HOOGLAND, 1986; PATRICK, 1978).

### ***1.5.3 Uso terapêutico do ultra-som na reparação tecidual***

Embora os mecanismos não sejam ainda perfeitamente conhecidos, há evidências demonstrando a influência do ultra-som terapêutico na reparação tecidual, pelas alterações provocadas na permeabilidade da membrana das células. Trabalhos sugerem que estes efeitos ocorram devido a cavitação (HOOGLAND, 1986; LOW; REED, 2001; MAXWELL, 1992). Dyson; Pond (1973) referem que o US produz modificações hemodinâmicas microvasculares, aumentando a perfusão e o tecido de granulação, estimulando assim a reparação.

#### ***1.5.3.1 Efeitos do US na reparação do tecido tegumentar***

Dyson et al. (1968) relatam sobre o uso do UST em lesões nas orelhas de coelhos, sendo o tratamento iniciado no 14<sup>o</sup> dia após a lesão, com o uso de diversas e diferentes intensidades de aplicação do ultra-som. A intensidade que apresentou melhores resultados foi com o UST pulsátil,  $0,5 \text{ W/cm}^2$ , por 5 minutos, em lesões de pele com espessura total na orelha com  $1 \text{ cm}^2$  de área. A aplicação ocorreu 3 vezes por semana, durante 21 dias. Houve diferença da cicatrização entre o grupo controle e o estimulado principalmente nas fases iniciais do processo, sendo que após 35 dias esta diferença foi menos significativa. Os autores concluíram que o UST acelera a cicatrização, mas os melhores resultados ocorrem na fase inicial.

Dyson; Suckling (1978) utilizaram o UST em úlceras varicosas no membro inferior de pacientes, no modo pulsátil, 3 MHz,  $0,2 \text{ W/cm}^2$ , por 5 minutos, com uma



redução significativa do tamanho das lesões, da mesma maneira Roche; West (1984) referem que o uso do ultra-som na periferia de úlceras varicosas, na frequência de 3 MHz,  $1 \text{ W/cm}^2$ , durante 5 minutos, em áreas menores que  $5 \text{ cm}^2$ , apresentando resultados significativos, com redução da área das úlceras.

Alves (1988) refere efeitos benéficos do US no tratamento de queimaduras em ratos, por outro lado, Cambier; Vanderstraeten (1997) não encontraram efeitos estimulantes do US em ratos utilizando o modo contínuo ( $0,3 \text{ W/cm}^2$ ), nem no modo pulsátil ( $0,25 \text{ W/cm}^2$ ), discordando da aplicação clínica do US na cicatrização de queimaduras.

Young; Dyson (1990a) analisaram os efeitos do US em lesões de pele total em ratos, utilizando o UST pulsátil, 0,75 ou 3 MHz,  $0,1 \text{ W/cm}^2$ , por 5 dias, encontrando maior tecido de granulação, leucócitos, macrófagos e fibroblastos no grupo estimulado que no grupo controle. Após 7 dias havia uma diferença significativa de celularidade entre os grupos, sugerindo que o UST pode ser usado acelerando o processo inflamatório e a proliferação celular.

Byl et al. (1993) realizaram lesões na pele de porcos e aplicaram UST contínuo (1 MHz,  $1,5 \text{ W/cm}^2$ , por 5 minutos) e o UST pulsátil (1 MHz,  $0,5 \text{ W/cm}^2$ , por 5 minutos), encontrando níveis de hidroxiprolina significativamente mais elevados com o uso de intensidade menor após 5 dias de tratamento, sendo que significativa diferença na cicatrização foi encontrada neste mesmo grupo somente após 10 dias de tratamento.

Barros (2002) estudou os efeitos do UST nas lesões da epiderme em coelhos, utilizando modo pulsátil, na frequência de 3 MHz, nas intensidades de 0,4 e  $0,8 \text{ W/cm}^2$ , por 6 minutos, 24 horas após as lesões, durante sete dias consecutivos.

Demonstrou que o US pode induzir alterações na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos, com efeitos benéficos na reepitelização.

#### *1.5.3.2 Efeitos do US na angiogênese, síntese de colágeno e proliferação celular*

Young; Dyson (1990b) referem aumento na formação de vasos sanguíneos na fase mais precoce de reparação com o uso do UST. Dionísio (1998) em seus estudos não encontrou diferenças no padrão de vascularização após lesão muscular em coelhos com aplicação do ultra-som terapêutico modo pulsátil (1 MHz, 0,5 W/cm<sup>2</sup>, 5 minutos, 10 dias consecutivos).

Ramirez et al. (1997) investigaram os efeitos do US na síntese de colágeno e proliferação celular usando cultura de fibroblastos derivados do tendão de Aquiles de ratos recém-nascidos. Seus resultados indicaram que o US estimula a síntese de colágeno e divisão celular durante os períodos de proliferação celular.

Doan et al. (1999) utilizaram UST em gengiva humana e verificaram que o uso do UST pulsátil (1 MHz) nas intensidades 0,1 e 0,4 W/cm<sup>2</sup> induziram in vitro a proliferação celular, produção de colágeno, formação óssea e angiogênese.

Rantanen et al. (1999) realizaram estudos sobre os efeitos do UST na regeneração de fibras musculares esqueléticas após lesão do músculo gastrocnêmio de ratos. A velocidade de regeneração muscular nos animais tratados com ultra-som pulsado foi comparada com o grupo controle, utilizando técnicas de imunohistoquímica e morfometria. Foi encontrado que a proliferação de células satélites foi bastante significativa (96%) com o uso do UST modo pulsátil durante os primeiros estágios de reparação em comparação com o grupo controle.

Cunha et al. (2001) demonstram que o uso do UST em ratos após tenotomia do tendão de Aquiles estimula a formação de tecido de reparação, aumentando a síntese de colágeno, com melhor agregação e alinhamento das fibras de colágeno no eixo do tendão. Estes resultados foram encontrados com o uso do UST no modo pulsátil (frequência de 1 MHz, intensidade de  $0,5 \text{ W/cm}^2$ , por 5 minutos, durante 14 dias consecutivos), sendo que no modo contínuo não foram encontrados resultados benéficos no tecido de reparação destes tendões.

Gebaeur et al. (2002) utilizaram US de baixa intensidade (1,5 MHz,  $3 \text{ W/cm}^2$ , 20 minutos, no dia da fratura) no calo ósseo de fraturas em ratos com Diabetes mellitus e avaliaram a proliferação celular após 2, 4 e 7 dias, utilizando imunohistoquímica corada com PCNA (aumento de 40x, em 12 áreas). O autor não encontrou diferença significativa na proliferação celular do grupo estimulado, nem no grupo controle.

#### *1.5.3.3 Aplicação do UST em enxertos cutâneos e outros*

Em relação a trabalhos específicos do US em enxertos cutâneos foi encontrado apenas o trabalho de Ivanovv (1987) que cita o uso do ultra-som na fixação de enxertos autólogos associado ao uso de colas cirúrgicas (cianoacrílicas) no tratamento de úlceras tróficas, com diminuição do tempo cirúrgico, ausência de deslocamento do enxerto, assim como diminuição do sangramento e formação de hematoma.

Aynaci et al. (2002) referem ter realizado o primeiro estudo sobre os efeitos do US na cicatrização de enxerto ósseo pediculado em músculo, na coluna vertebral. Foram utilizados 20 coelhos, sendo aplicado o US durante 20 minutos a partir do

terceiro dia PO com uma frequência de 1,5 MHz. Os coelhos foram sacrificados após 6 semanas de cirurgia, ocorrendo aceleração da reparação óssea, com aumento da velocidade e qualidade da fusão espinhal com o uso do UST.

Embora de aplicação corrente na fisioterapia, o ultra-som é um recurso físico ainda controverso, quanto aos seus efeitos e à sua interação com o meio biológico. Estudos específicos com ultra-som em enxertos de pele são escassos.

## **2 MATERIAL E MÉTODO**

O experimento foi realizado no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

### **2.1 Animal utilizado**

Foram utilizados 20 coelhos albinos fêmeas da raça Nova Zelândia, de idade adulta, com peso médio de 2,5 Kg, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram operados e mantidos no Biotério do Laboratório de Bioengenharia, onde receberam todos os cuidados necessários durante o experimento (ração e água).

### **2.2 Procedimento cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico com diluição de 1 g em 40 ml de soro. A aplicação foi endovenosa, sendo o acesso a veia marginal da orelha do coelho (GHIRALDINI et al., 1998). Foi feita uma aplicação inicial de 2,5 ml do anestésico, seguida de doses adicionais, conforme a necessidade, para manutenção do plano anestésico. Toda região dorsal do animal era tricotomizada para abrir o espaço para o procedimento operatório, que constou dos seguintes passos técnicos:

1. Posicionamento do animal em decúbito ventral, com fixação dos membros;

2. Antissepsia da pele com álcool iodado a 4% por cerca de 5 minutos e colocação de campos fenestrados;
3. Ressecção de um quadrado de pele de 2 cm de lado em ambos os lados da região dorsal, medialmente às escápulas, utilizando um molde de aço inoxidável quadrado especialmente confeccionado e bisturi lâmina 15 (Figura 6A);
4. Retirada dos segmentos cutâneos (Figura 6B) e colocação em solução de soro fisiológico;
5. Hemostasia dos leitos doadores por pinçamento dos vasos, por 5 minutos, no mínimo;
6. Desengorduramento dos enxertos com tesoura delicada (Figura 6C);
7. Colocação dos enxertos nas áreas receptoras, invertendo os locais de origem, o enxerto retirado do lado direito sendo colocado na área receptora esquerda e vice-versa;
8. Fixação do enxerto com pontos simples de fio de nylon monofilamento de calibre 6.0 nos cantos e de nylon monofilamento de calibre 5.0 ao longo das bordas, para melhor fixação do curativo (Figura 6D);
9. Colocação de uma lâmina de tecido tipo *rayon* impregnado com Furacin (Figura 6E) e quatro camadas de gaze sobre o enxerto, seguido de amarração dos fios de calibre 5.0 sobre o curativo (curativo de Brown, ou tipo *tie-over*) (Figura 6F).

Todos os procedimentos citados foram realizados bilateralmente e, em seguida, o animal foi colocado em gaiola individual e identificado.

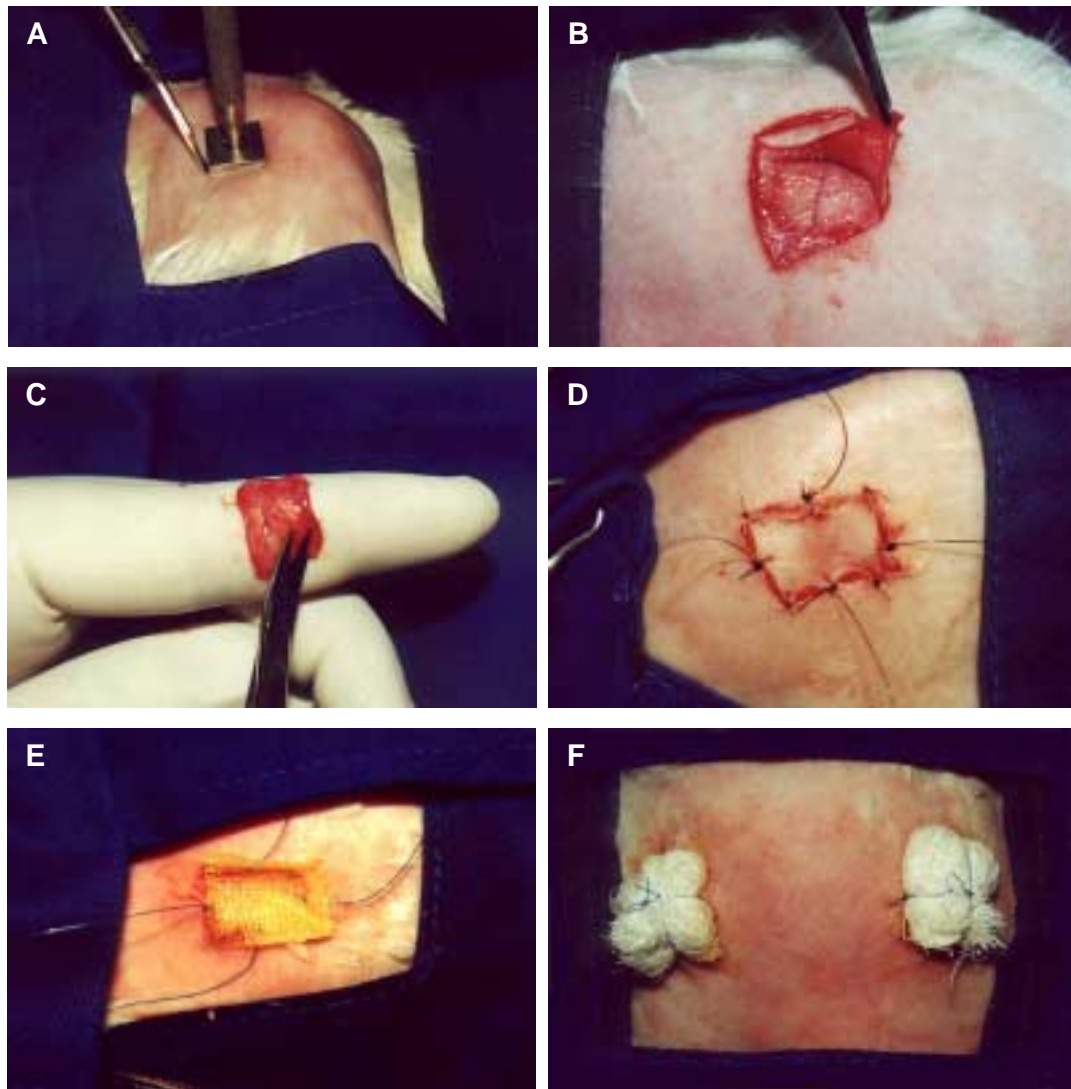


Figura 6 - Fotografias ilustrativas das etapas do procedimento cirúrgico. A) Ressecção de um quadrado de pele de 2 cm de lado na região escapular, utilizando um molde de aço inoxidável. B) Retirada dos segmentos cutâneos. C) Desengorduramento do enxerto utilizando uma tesoura delicada. D) Fixação do enxerto com pontos simples de fio de nylon monofilamento de calibre 6.0 nos cantos, e de nylon monofilamento de calibre 5.0 ao longo das bordas. E) Colocação de rayon furacinado. F) Curativo de Brown, ou tipo *tie-over*.

### 2.3 Aplicação do ultra-som

No terceiro dia PO era retirado o curativo de sobre o enxerto, para início do tratamento com o ultra-som. Era feita antissepsia do local com solução de álcool iodado a 2% e aplicada vaselina líquida sobre o enxerto, para funcionar como meio de condução para o ultra-som.

Sobre a vaselina era colocado um filme plástico de cerca de 0,01 mm de espessura e sobre o filme, o gel para aplicação do ultra-som. Com esses procedimentos procurava-se evitar a mobilização do enxerto sobre o leito pelo cabeçote do aparelho de ultra-som.

Os animais foram submetidos a sete aplicações diárias seguidas de ultra-som, a partir do terceiro dia pós-operatório, no modo pulsado, com frequência de 3 MHz e intensidade de  $0,5 \text{ W/cm}^2$  (SATA), por 5 minutos, com o cabeçote em movimento. O cabeçote empregado foi modificado com a adição de um acessório que reduzia a área efetiva de aplicação para  $1 \text{ cm}^2$  (Figura 7A). Antes das aplicações, o aparelho de ultra-som (SONACEL PLUS, modelo S. 1050<sup>®</sup>, Bioset-Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda) foi calibrado no Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) – USP, utilizando dosímetro de precisão (ULTRASONIC POWER METER<sup>®</sup>, modelo UPM-DT-1).

Todo o procedimento de irradiação foi realizado com o aparelho ligado no lado direito do animal. No lado esquerdo, era realizado o mesmo procedimento, mas com o aparelho desligado (placebo).



## 2.4 Sacrifício do animal

Os animais foram sacrificados no 11<sup>o</sup> dia pós-operatório com uma dose excessiva de anestésico endovenoso e toda a área enxertada foi ressecada, compreendendo um segmento quadrado de pele de  $\pm 4$  cm de lado. Os espécimes eram fixados em molduras de papelão, identificados adequadamente (Figura 7B), mergulhados em um recipiente com solução de formol a 10% e processados para análise histológica.

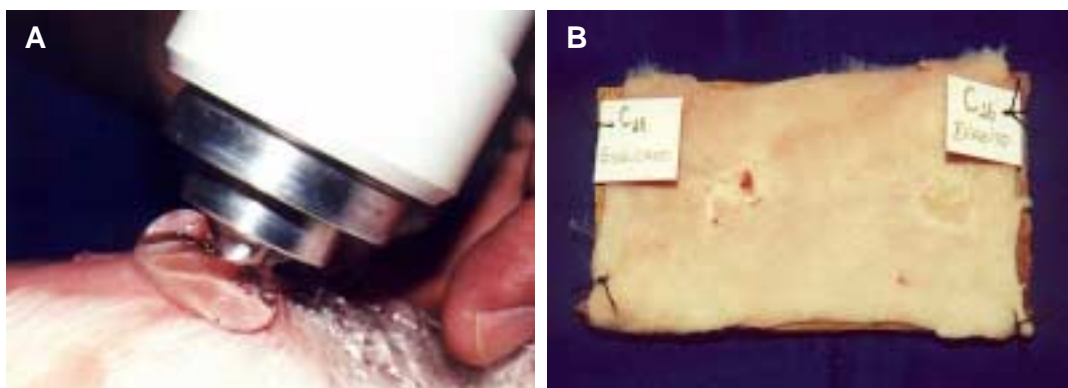


Figura 7 - Fotografias ilustrativas das etapas de aplicação do ultra-som e preparação do material para análise histológica. A) Aplicação do UST na área enxertada sobre o filme plástico. B) Fixação e identificação das peças em molduras de papelão.

## 2.5 Análise histológica

Foram obtidos cortes de 5  $\mu$ m de espessura, coradas por métodos diferentes: Tricrômico de Gomori, PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*) e Picosirius.

Nas lâminas coradas com o Tricrômico de Gomori, que permite visualizar os limites de epiderme e derme, foi feita a morfometria das áreas específicas de cada um desses estratos. As lâminas eram analisadas em microscópio Axiophot Carl Zeiss® (ocular 10x e objetiva 2.5x) dotado de câmara de vídeo, com a qual era feita a captura das imagens para análise, com o auxílio do programa *Snappy*® (Vídeo *Snapshot*). Cada lâmina continha dois cortes, um de espécime do lado direito (irradiado com o ultra-som) e outro do lado esquerdo (placebo), sendo que de cada corte foram selecionados três campos diferentes, devidamente identificados, totalizando 120 campos. A morfometria foi realizada utilizando o programa *Scion Image 402*, onde as áreas específicas da epiderme e derme eram contornadas à mão livre e mensuradas em uma escala pré-determinada, em micrômetros quadrados. A medida dessas áreas era baseada na pré-fixação do comprimento do estrato no corte histológico, de modo que a única variável era sua espessura.

O método Tricrômico de Gomori foi utilizado também para contagem de vasos neoformados ou com capacidade para até cinco hemácias, encontrados na derme reticular. Foi utilizado um fotomicroscópio Zeiss® com ocular de 10x e objetiva de 40x, fotografando 5 campos de cada lâmina, de cada lado. Foram analisadas apenas as lâminas onde era possível a perfeita identificação da transição do tecido muscular para derme reticular (transição do leito receptor e doador do enxerto), num total de 11 lâminas (110 campos).

O PCNA é uma proteína nuclear associada ao ciclo celular (HALL et al., 1990) que detecta o antígeno nuclear de células em proliferação nas fases "G1" e "S", quando elas ficam fortemente marcadas. Aqui, foi realizada a contagem do número de células positivas ao PCNA por campo, nos espécimes de cada lado de cada

animal, utilizando microscópio de luz direta (Jenamed 2) com ocular 10x e objetiva 40x. Inicialmente, foram contadas todas as células do campo e, posteriormente, somente as células fortemente marcadas pelo PCNA, cuja frequência foi expressa em termos percentuais em relação ao total. Foram analisadas nove lâminas marcadas por este método imunohistoquímico (PCNA).

O método Picrosirius foi utilizado por promover um aumento da birefringência específico para a estrutura do colágeno (MONTES; JUNQUEIRA, 1991), sendo analisado o direcionamento das fibras num microscópio de luz polarizada com aumento de 100x (ocular 10x e objetiva 10x).

## **2.6 Análise estatística**

Foi realizada a análise estatística dos resultados pelo método não-paramétrico de *Wilcoxon* para dados não pareados, na morfometria das áreas da epiderme e derme, e pelo teste *t de Student* para dados pareados na análise da proliferação celular (contagem de células) e angiogênese (contagem de vasos), ambos com nível de significância de 5% ( $p \leq 0.05$ ).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise macroscópica

Não foi encontrada diferença macroscópica entre os enxertos estimulado e placebo, principalmente na fase final do experimento, no 11<sup>o</sup> pós-operatório (Figura 8A), sendo que pequenas lesões eram encontradas principalmente nas extremidades dos enxertos, bilateralmente.

Epidermólise parcial (Figura 8B) ocorreu em cinco animais, sendo bilateral em quatro. Nos animais que apresentaram epidermólise parcial observou-se um melhor resultado estético em relação a hipertrofia, que apresentava-se diminuída e em relação a sua coloração, que encontrava-se mais rosada e muito semelhante a pele do animal. Infecção ocorreu em dois animais, que foram substituídos.

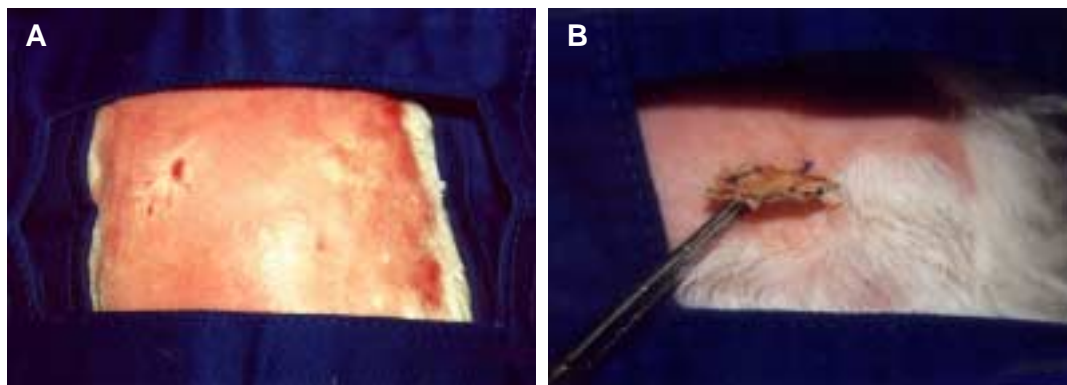


Figura 8 - Fotografias ilustrativas dos resultados macroscópicos. A) Resultado final dos enxertos, sem diferenças significativas entre os lados e presença de pequenas lesões. B) Epidermólise parcial, com bom aspecto do leito abaixo da necrose.

## 3.2 Análise histológica

### 3.2.1 Morfometria

Na análise morfométrica das áreas da epiderme e derme dos animais, não ocorreu diferença significativa entre os lados esquerdo e direito dos respectivos campos (Figuras 9A e 9B). Notou-se um grande aumento da espessura da epiderme bilateralmente e uma tendência a aumento desta área no lado direito, estimulado pelo UST. Na morfometria da área da derme não foi encontrada diferença significativa entre o lado estimulado (direito) e o placebo (esquerdo), observando-se muitas variações nas áreas mensuradas, tanto da epiderme, como da derme.

Para adequada análise estatística em relação a morfometria da epiderme foram excluídos os animais que tiveram epidermólise (parcial e total).

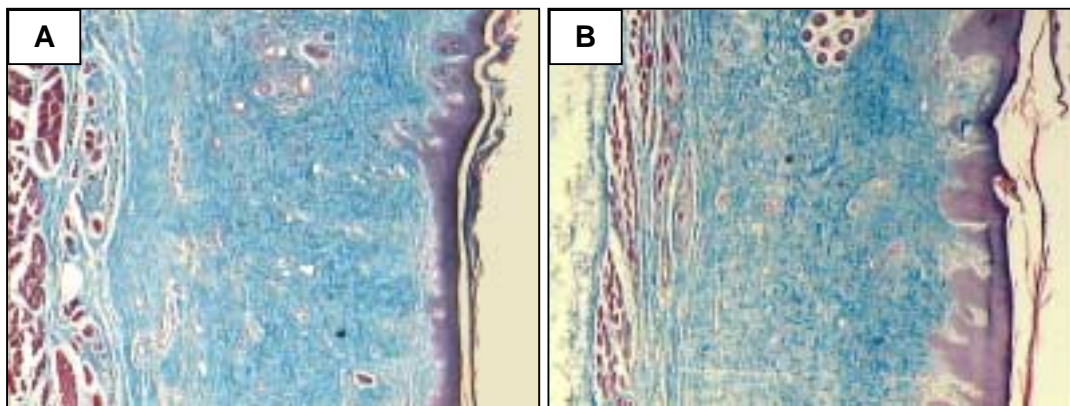


FIGURA 9 - Fotomicrografia corada com Tricrômico de Gomori em secção longitudinal de pele de coelho após enxerto de pele total para morfometria das áreas. A) Lado esquerdo (placebo). B) Lado direito (estimulado), mostrando uma tendência a aumento da área da epiderme. Aumento 25x.

### 3.2.2 Proliferação celular

Na contagem de células em proliferação foi observado um aumento significativo no número de células positivamente marcadas com PCNA na camada

germinativa do tegumento, no lado direito, estimulado (Figura 10B), em relação ao lado esquerdo, placebo (Figura 10A). Nos anexos dérmicos também foi encontrado aumento da proliferação celular, principalmente das glândulas e pêlos, com alterações estruturais significativas.

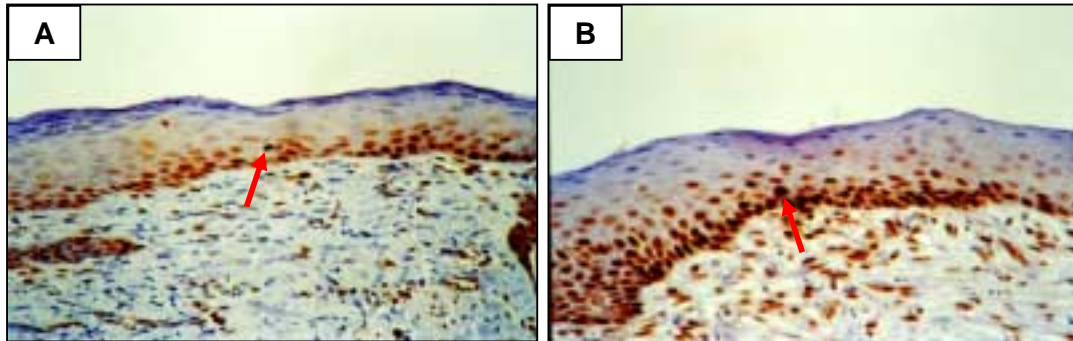


FIGURA 10 - Fotomicrografia corada com PCNA (imunohistoquímica) em secção longitudinal de pele de coelho após enxerto de pele total. A) Lado esquerdo (placebo). B) Lado direito (estimulado), observando-se aumento significativo das células em proliferação, positivamente marcadas principalmente no lado estimulado. Aumento 400x.

### 3.2.3 Angiogênese

Na contagem do número de vasos neoformados, utilizando Tricrômico de Gomori, mostrando o lado placebo e estimulado (Figura 11A e 11B) foi encontrado um aumento significativo do número de vasos no lado estimulado, direito, em relação ao grupo controle do mesmo animal, lado esquerdo. Foi encontrado também um aumento no número de hemácias na região intersticial da derme (papilar e reticular), no lado estimulado pelo UST.

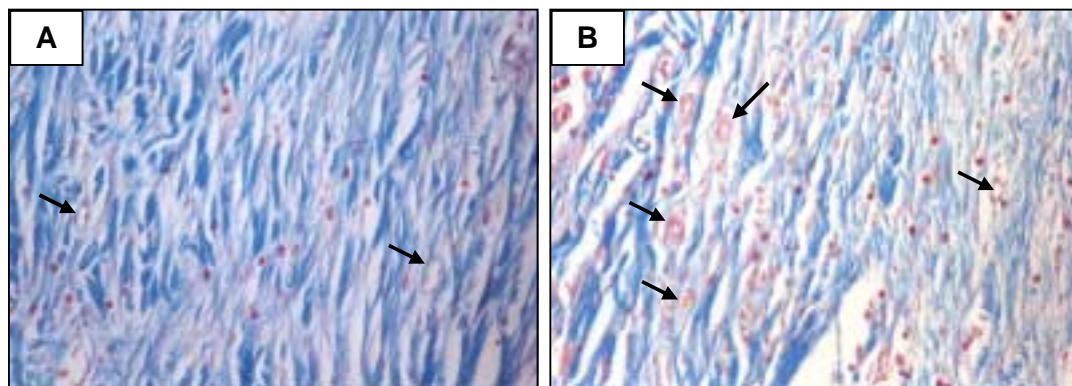


FIGURA 11 - Fotomicrografia corada com Tricrômico de Gomori em secção longitudinal de pele de coelho após enxerto de pele total para contagem de vasos. A) Lado esquerdo (placebo). B) Lado direito (estimulado), mostrando aumento do número de vasos neoformados do lado estimulado. Aumento 400x.

#### 3.2.4 *Direcionamento das fibras de colágeno*

Na análise do direcionamento das fibras de colágeno não foi encontrada diferença entre os lados, estimulado e placebo do mesmo animal, sendo estes resultados ilustrados com as imagens obtidas com microscópio de luz direta em relação ao de luz polarizada (Figuras 12 A, 12B, 12C e 12D).



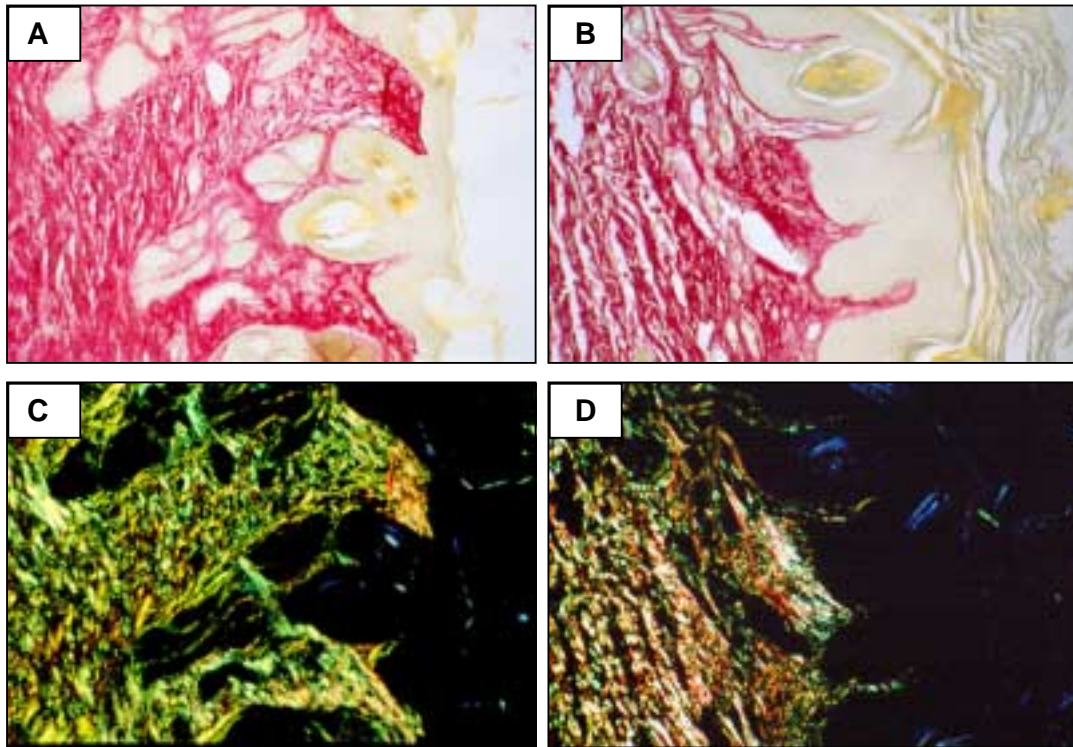


FIGURA 12 - Fotomicrografia corada com Picrosirius em secção longitudinal de pele de coelho após enxerto de pele total para análise do direcionamento das fibras de colágeno. A) Lado esquerdo (placebo) em luz direta. B) Lado direito (estimulado) em luz direta. C) Lado esquerdo (placebo) em luz polarizada. D) Lado direito (estimulado) em luz polarizada. Não mostrando diferença entre o direcionamento das fibras colágenas.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

#### 3.3.1 Morfometria

Na morfometria da área da epiderme a média encontrada foi de 246.392,00  $\mu\text{m}^2$  no lado direito (estimulado), para 200.626,66  $\mu\text{m}^2$  no lado esquerdo (placebo) e a mediana foi de 220.641,66  $\mu\text{m}^2$  no lado direito, para 173.664,33  $\mu\text{m}^2$  no lado esquerdo, não apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p=0,07$ ) entre os lados estimulado e placebo. O desvio padrão encontrado do lado direito foi de



92.394,92  $\mu\text{m}^2$ , em relação ao lado esquerdo 77.576,66  $\mu\text{m}^2$ , sendo estes dados expressos na tabela 1.

Tabela 1 – Valores da morfometria da área da epiderme, medida nos cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Gomori (25x,  $\mu\text{m}^2$ )

	Epiderme	
	Lado esquerdo (placebo)	Lado direito (estimulado)
Mediana	173.664,33	220.641,67
Média	200.626,67	246.392,00
Desvio Padrão	77.576,66	92.394,92

A figura 13, traz a representação gráfica dos valores obtidos na morfometria das áreas da epiderme.

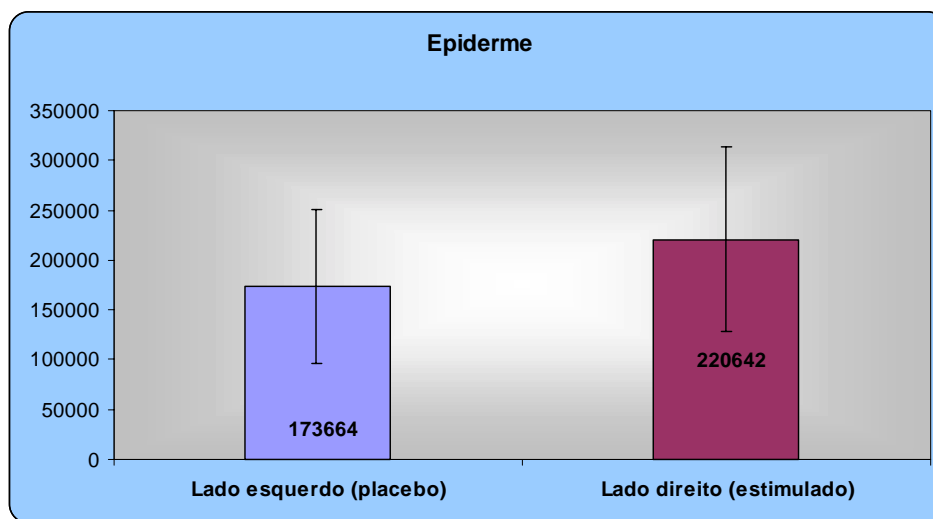


FIGURA 13 - Representação gráfica da área da epiderme

Na morfometria da área da derme a média encontrada foi de 2.157.730,00  $\mu\text{m}^2$  no lado direito (estimulado), para 2.109.150,00  $\mu\text{m}^2$  no lado esquerdo (placebo),

e a mediana foi de 2.164.660,00  $\mu\text{m}^2$  no lado direito, para 2.101.330,00  $\mu\text{m}^2$  no lado esquerdo, não apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p=0,21$ ) entre os lados estimulado e placebo. O desvio padrão encontrado do lado direito foi de 411.701,01  $\mu\text{m}^2$ , em relação ao lado esquerdo 501.475,57  $\mu\text{m}^2$ , sendo estes dados expressos na tabela 2.

Tabela 2 – Valores da morfometria da área da derme, medida nos cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Gomori (25x,  $\mu\text{m}^2$ )

	Derme	
	Lado esquerdo (placebo)	Lado direito (estimulado)
Mediana	2.102.330,00	2.164.660,00
Média	2.109.150,00	2.157.730,00
Desvio Padrão	501.475,57	411.701,01

A figura 14, traz a representação gráfica dos valores obtidos na morfometria das áreas da derme.

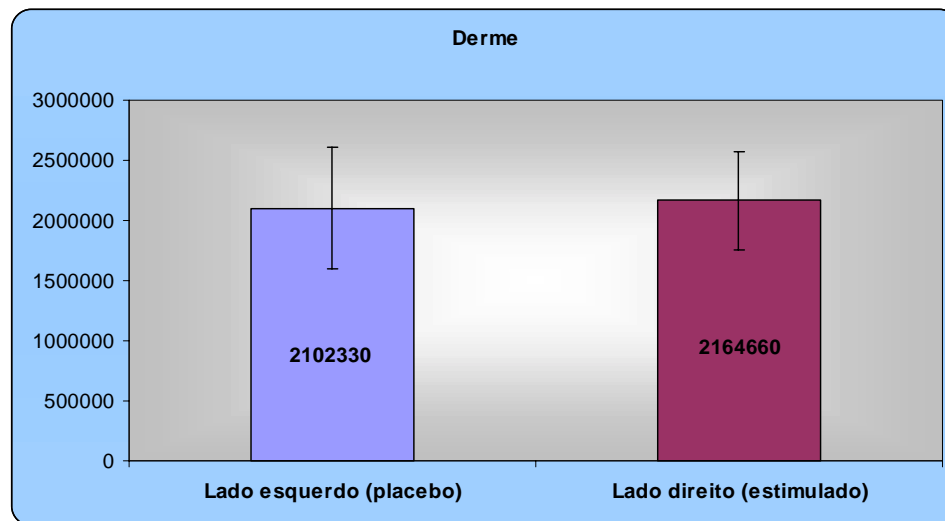


FIGURA 14 - Representação gráfica da área da derme.

### 3.3.2 Contagem de células em proliferação

Na contagem de células em proliferação na camada germinativa da epiderme, quantificadas em termos percentuais em relação ao número total de células, foi encontrado um aumento percentual no lado estimulado com o UST, com uma média de 12,18% células positivamente marcadas no lado direito, em relação ao lado esquerdo 7,34%, apresentando uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0007$ ). O desvio padrão encontrado do lado direito foi de 3,01% em relação ao lado esquerdo 1,90%, sendo estes dados expressos na tabela 3.

Tabela 3 - Valores percentuais médios da contagem das células em proliferação por campo, nos cortes histológicos corados pelo PCNA (400x), em relação ao número total de células.

	Lado esquerdo (placebo)		Lado direito (estimulado)	
	Média (%)	Desvio Padrão	Média (%)	Desvio Padrão
Animal 4	3,84	0,93	7,71	2,94
Animal 8	6,73	2,05	8,80	2,01
Animal 10	5,74	2,39	10,65	3,18
Animal 11	7,87	2,39	11,45	3,12
Animal 13	10,68	2,61	11,42	3,50
Animal 17	7,94	2,94	12,87	3,64
Animal 18	7,19	3,02	16,98	3,87
Animal 19	8,74	3,75	14,98	2,99
Animal 20	7,32	1,54	14,73	4,39
<b>Média</b>	<b>7,34</b>		<b>12,18</b>	
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,90</b>		<b>3,01</b>	

A figura 15, traz a representação gráfica dos valores obtidos na contagem de células em proliferação na camada germinativa da epiderme.

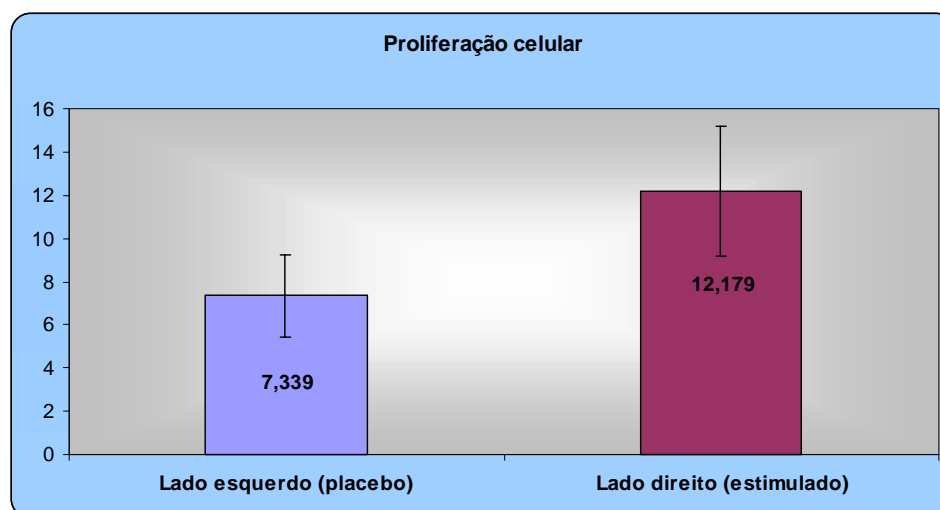


FIGURA 15 - Representação gráfica da contagem de células em proliferação.

### 3.3.3 Contagem de vasos neoformados

Na contagem de vasos neoformados na camada reticular da derme, quantificados nos campos específicos, foi encontrado um aumento no número de vasos no lado estimulado com o UST, com uma média de 6,27 vasos no lado direito, em relação ao lado esquerdo 3,07 vasos, apresentando uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0001$ ). O desvio padrão encontrado do lado direito foi de 2,59 em relação ao lado esquerdo 1,75, sendo estes dados expressos na tabela 4.

Tabela 4 - Valores médios da contagem de vasos neoformados por campo, nos cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Gomori (400x).

	Direito	Esquerdo
Média	6,27	3,07
Desvio Padrão	2,59	1,75

A figura 16, traz a representação gráfica dos valores obtidos na contagem de vasos neoformados na camada reticular da derme.

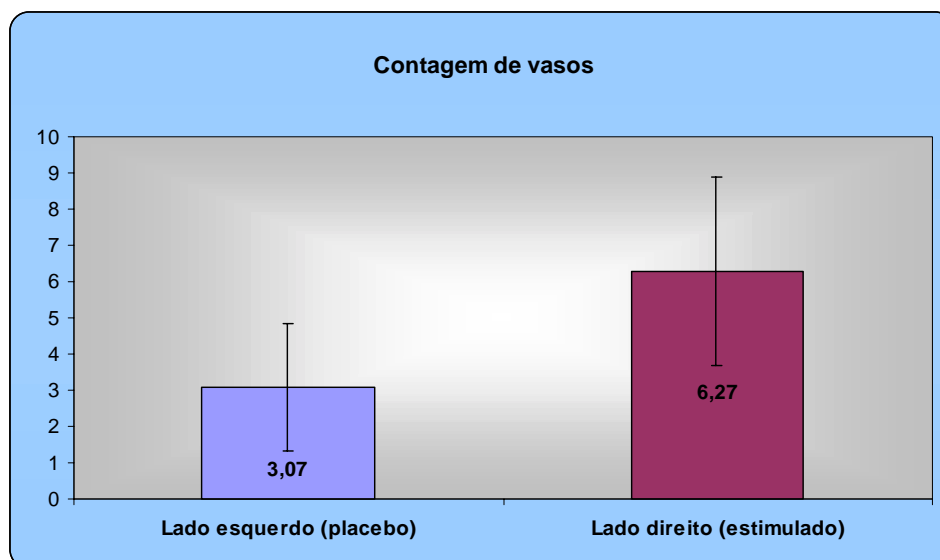


FIGURA 16 - Representação gráfica da contagem de vasos neoformados

## 4 DISCUSSÃO

O ultra-som é um recurso terapêutico de utilização universal na reabilitação pós-traumática e pós-operatória, principalmente do aparelho locomotor, mas também em outros campos em que a reparação tecidual seja necessária (DYSON; SUCKLING, 1978).

Apesar da referência de Ivanovv (1985), trabalhos específicos sobre a utilização do UST como coadjuvante na estimulação da integração de enxertos de pele são praticamente inexistentes na literatura especializada, o que motivou à realização da presente investigação, cujo objetivo foi avaliar a integração e possíveis alterações histológicas do enxerto de pele total induzidas pelo UST, em coelhos.

O coelho foi escolhido por ser um animal de fácil obtenção e manuseio, a região dorsal foi selecionada para o procedimento cirúrgico (CARDOSO, 1981), por ser de fácil acesso, apresentar melhores características tegumentares, inclusive a derme espessa (JOHNSON; NELSON, 1995) e por encontrar-se relativamente mais protegida de contaminações, pelo menor contato com as fezes e saliva do animal, diminuindo os riscos de infecção (BARROS, 2002).

Foi preferido o enxerto de pele total ao de parcial por ser mais fácil de padronizar a espessura e porque é o enxerto de mais difícil integração, que demanda maior resposta do leito receptor, no qual as diferenças de comportamento induzidas pelo UST seriam mais evidentes.

O preparo do leito receptor para os enxertos foi feito conforme recomendação de outros autores (DOCKHORN et al., 1992; MCGREGOR, 1995), incluindo a rigorosa hemostasia, para evitar a formação de hematomas que pudessem

impedir a adesão do enxerto. O molde utilizado para o recorte dos enxertos foi idealizado para que todos tivessem sempre as mesmas dimensões, correspondendo àquelas dos leitos receptores, o que facilita a integração (ELY, 1965). Também, a remoção de todo o tecido gorduroso remanescente, do modo como realizado neste trabalho, é um passo importante no preparo dos enxertos, visto que a gordura necrosa e liquefaz, formando um caldo que impede a integração e facilita a infecção (MILAN et al., 2001; RUDOLPH; BALLANTYNE, 1990).

A fixação dos enxertos com pontos simples de fio de nylon nos cantos teve o objetivo de impedir a contração primária que ocorre nos enxertos de pele total. Ao mesmo tempo em que os mantiveram estendidos até o limite das suas dimensões originais, os pontos também impediam o seu deslizamento sobre o leito, quando da aplicação da irradiação ultra-sônica, numa fase ainda precoce da integração. Igualmente, o curativo atado de Brown (*tie over*) foi empregado até o terceiro dia, porque garante a coalescência entre o enxerto e o leito receptor, visto que ele aplica uma pressão uniforme que atua como hemostático, evitando a formação de hematomas e imobiliza o enxerto, prevenindo deslocamentos (JANKAUKAS et al., 1991; MCGREGOR, 1995). Em condições clínicas, o curativo de Brown é retirado somente com sete dias de pós-operatório (RUDOLPH; BALLANTYNE, 1990), mas neste experimento foi retirado precocemente para permitir a aplicação do UST, o que não interfere significativamente com a integração do enxerto, desde que não se produzam movimentos de cisalhamento (JANKAUKAS et al., 1991).

O início da aplicação do UST no terceiro dia foi propositalmente precoce, pois a integração dos enxertos de pele, mesmo totais, também é precoce e é nesta fase que os eventuais processos de reparação tecidual poderiam ser estimulados



(DYSON et al., 1968). O cabeçote do aparelho de UST foi adaptado para pequenas áreas e o próprio aparelho foi calibrado e submetido a dosimetria antes do início do tratamento, para evitar erros de dosagem, como sugerem outros autores (GUIRRO; SANTOS, 1997; PYE, 1996).

Normalmente, o UST é aplicado na periferia das feridas (ROCHE; WEST, 1984), de forma a estimular principalmente o processo de epitelização a partir das bordas. O contato direto do cabeçote sobre a ferida normalmente é contra-indicado, pelo risco de infecção e pela possível irritação e lesão da pele pela movimentação (BRUETON; CAMPBELL, 1987). Neste experimento, o UST foi aplicado diretamente sobre o enxerto, o qual foi protegido com uma película de filme plástico, cujo contato com o enxerto era promovido por uma camada de vaselina líquida e cujo contato com o cabeçote era facilitado por uma camada gel acoplador, formando um verdadeiro coxim que impedia a mobilização do enxerto, ao mesmo tempo em que promovia a transmissão das ondas do UST. A vaselina líquida é rotineiramente empregada para a proteção de enxertos de pele (ELY, 1965) e como meio acoplador para a aplicação do UST, sem provocar alterações metabólicas. O gel é utilizado para aplicação do UST por apresentar menor coeficiente de reflexão (CASAROTTO, 2000). Este método foi eficiente na prevenção de mobilização do enxerto pela movimentação do cabeçote, visto que epidermólise ocorreu em somente cinco casos, tendo sido total em apenas um. Além de proteger o enxerto e garantir a transmissão do US, esse método também foi benéfico na profilaxia de infecções, pois esta ocorreu em apenas dois casos, índice muito baixo principalmente se for levado em consideração que o enxerto de pele total tem maior tendência à infecção (CARMO et

al., 2001) e que não foi utilizado nenhum antibiótico sistêmico durante o experimento.

Antes da sua utilização, o filme plástico foi analisado quanto à sua capacidade de transmitir as ondas ultra-sônicas, tendo sido comprovado que ele não induz alterações nem na condução, nem nas características da onda. Tal fato corroborou o achado anterior de que curativos de filme de poliuretano, utilizados na proteção de feridas, têm alta transmissividade para o UST (LOW; REED, 2001).

A aplicação do UST era feita com uma pressão homogênea do cabeçote, para evitar alterações nas transmissões das ondas ultra-sônicas (WARREN et al., 1976) e com movimentação lenta e contínua do cabeçote, para evitar "zonas de calor". Além disso, o cabeçote era mantido na posição vertical, em 90° em relação à área de irradiação, como forma de evitar exacerbação dos efeitos térmicos (COAKEY, 1978). A frequência de 3 MHz foi a escolhida, pois o objetivo era atingir os tecidos mais superficiais (LOW; REED, 2001), no caso, a pele; já a intensidade de 0,5 W/cm<sup>2</sup> foi utilizada por ser a mais indicada na fase precoce de reparação tecidual, bem como o modo pulsado, que diminui os efeitos térmicos do UST, facilitando os demais efeitos (DYSON et al., 1968). O tempo de aplicação de cinco minutos tem sido o mais recomendado em literatura (CUNHA et al., 2001; DIONÍSIO, 1998; REHER, 1997).

O período de 10 dias para o sacrifício dos animais e análise histopatológica do enxerto foi escolhido porque o processo de integração dos enxertos cutâneos, assim como de cicatrização da pele, é rápido (GOLDENBERG; BEVILACQUA, 1981) e o objetivo do trabalho era justamente detectar as alterações precoces eventualmente induzidas pelo UST, inclusive a neoangiogênese (BADIM, 1971).

Depois da integração já estar garantida, a análise histopatológica dos enxertos tenderia a mostrar um quadro mais homogêneo, sem grandes diferenças entre os irradiados e os não irradiados.

Em relação à estimulação da proliferação celular pelo UST, ainda há muitas controvérsias na literatura, havendo autores que afirmam haver até um efeito inibitório (LOCH et al., 1971). Outros autores, entretanto, referem significativo aumento na quantidade de células no leito da ferida (DYSON, 1990). Nossos resultados foram conclusivos em demonstrar que o UST efetivamente estimulou a proliferação celular na camada germinativa da epiderme, conforme comprovado nos cortes corados pela técnica PCNA, utilizada em trabalhos mais recentes (GEBAUER et al., 2002). Além disso, houve incremento da neoangiogênese no leito receptor e deste para o enxerto, em consonância com o que foi relatado por outros autores (YOUNG; DYSON, 1990b), sendo este um fator que certamente influencia na integração dos enxertos cutâneos.

Todavia, o aumento da proliferação celular, que foi altamente significativo ( $p=0,0007$ ), não implicou em aumento da área total da epiderme do enxerto, conforme demonstrado na morfometria, que mostrou apenas tendência a um aumento no lado estimulado ( $p=0,07$ ). Isto demonstra que outros fatores devem interferir na integração do enxerto, sendo provável um aumento da frequência da apoptose neste tecido.

No referente à derme, a morfometria da área não mostrou diferenças significativas entre os lados estimulados e não estimulados ( $p=0,21$ ), mesmo com o aumento significativo da angiogênese ( $p=0,0001$ ) no lado estimulado. As características estruturais da derme (tecido conjuntivo frouxo e denso) podem

justificar o não aumento da área, mas uma probabilidade de aumento na densidade do tecido, tendo em vista o aumento observado do número de vasos.

Não foi encontrada diferença no direcionamento das fibras de colágeno na coloração pelo Picosirius, o que parece ser justificado pela precocidade da análise.

## **5 CONCLUSÃO**

Os achados obtidos neste trabalho permitem concluir que a irradiação com o ultra-som terapêutico efetivamente induz alterações morfológicas em nível celular, como o aumento da proliferação celular da camada germinativa da epiderme e da neoangiogênese, com aceleração e melhoria na integração dos enxertos de pele total em coelhos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. M. **Efeitos da energia ultra-sônica na regeneração de pele animal com queimadura por calor**. 1988. 12 p. Dissertação (Mestrado 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, São Paulo. 1988.

AYNACI, O.; ONDER, C.; PISKIN, A.; OZORAN, Y. The effect of ultrasound on the healing of muscle-pediculated bone graft in spinal fusion. **Spine**, Hagerstown, v. 27, n. 14, p. 1531-5, July 2002.

BADIM, J. Transplante livre de pele. In: \_\_\_\_\_. **Introdução à cirurgia plástica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1971. p. 29-36.

BARROS, A. R. S. B. **Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões da epiderme em coelhos**. 2002. 22 p. . Dissertação (Mestrado 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, São Paulo. 2002.

BRUETON, R. N.; CAMPBELL, B. The use of geliperm as a sterile coupling agent for therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, London, v. 73, n. 12, p. 653-4, Dec. 1987.

BYL, N. N.; MCKENZIE, A.; WONG, T.; WEST, J.; HUNT, T. K. Incisional wound healing: a controlled study of low and high dose ultrasound. **Journal of Orthopaedic Sports and Physical Therapy**., Washington, v. 18, n. 5, p. 619-28, Nov.1993.

CAMBIER, D. C.; VANDERSTRAETEN, G. G. Failure of therapeutic ultrasound in healing burn injuries. **Burns**, Guildford, v. 23, n. 3, p. 248-9, May 1997.

CARDOSO, A. D. Transplante livre de pele. In: SUCENA, R. C. **Cirurgia plástica: contribuição para o ensino da especialidade**. São Paulo: Fundo Editorial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, 1981. cap. 5, p. 33-59.

CARMO, J. M. M.; SOUZA, S. C. A.; FERNANDES, M. A. S. Retalhos microcirúrgicos de membros superiores. In: FREIRE, E. **Trauma: a doença dos séculos**. São Paulo: Atheneu, 2001. cap. 142, p. 1923-1925.

CARREL, A. The treatment of wounds. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 55, n. 25, p. 2148-50, Dec. 1910.

CASAROTTO, R. A. Agentes acoplantes em fisioterapia: perdas acústicas e térmicas. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 7, n. 1/2, p. 34-5, jan./dez. 2000.

CASTRO, C. C.; MOTA, D. S. C.; SILVA, M. L. A. Enxertos cutâneos em cirurgia plástica. In: AVELAR, J. M. **Ensino da cirurgia plástica nas Faculdades de Medicina**. São Paulo: Ed. Hipócrates, 1994. cap. 5, p. 41-43.

COAKLEY, W. T. Biophysical effects of ultrasound at therapeutic intensities. **Physiotherapy**, London, v. 64, n. 6, p. 166-69, June 1978.

CORMACK, D. C. O sistema tegumentar. In: \_\_\_\_\_ **Ham histologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 17, p. 352-71.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Inflammation and repair. In: \_\_\_\_\_. **Robbins pathologic basis of disease**. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1994. chap. 3, p. 51-92.

CUNHA, A.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Aquilles tendon (*tendo calcaneus*) of the rat. **Ultrasound in Medicine & Biology**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 1691-96, Oct. 2001.

DIONÍSIO, V. C. **O efeito do ultra-som terapêutico na vascularização pós lesão muscular experimental em coelhos**. 1998. 43p. Dissertação (Mestrado 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, São Paulo, 1998.

DOAN, N.; REHER, P.; MEGHJI, S.; HARRIS, M. In vitro effects of therapeutics ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, vol. 57, n. 4, p. 409-19, Apr. 1999.

DOCKER, M. F.; PATRICK, M. K.; FOULKES, D. J. Ultrasound couplants for physiotherapy. **Physiotherapy**, London, v. 68, n. 4, p. 124-25, Apr. 1982.

DOCKHORN, L. F.; ZANINI, S. A.; MÉLEGA, J. M. Enxertos de pele. In: MÉLEGA, J. M.; ZANINI, S.A.; PSILLAKIS, J. M. **Cirurgia plástica: reparadora e estética**. São Paulo: Medsi, 1992. cap. 5, p. 35-48.

DRAPER, D. O.; SUNDERLAND, S.; KIRKENDALL, D. T. A comparison of temperature rise in human calf muscle following applications of underwater and topical gel ultrasound. **Journal of Orthopaedic Sports and Physical Therapy**, Washington, v. 17, n. 5, p. 247-51, May 1993.

DYSON, M. Role of ultrasound in wound healing. In: KLOTH, L. C.; MILLER, K. H. **Wound healing**. 1990. chap. 13, p. 259-85.

DYSON, M. Therapeutic applications of ultrasound. In: NYBORG, W. L.; ZISKIN, M. C. **Biological effects of ultrasound**. New York: Churchill Livingstone, 1985. chap. 11, p. 121-33.

DYSON, M.; POND, J. B. The effects of ultrasound on circulation. **Physiotherapy**, London, v. 59, n. 9, p. 284-7, Sept. 1973.

DYSON, M.; POND, J. P.; JOSEPH, J.; WARWICK, R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. **Clinical Science**, London, v. 35, n. 2, p. 273-85, Apr. 1968.

DYSON, M.; SUCKLING, J. Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. **Physiotherapy**, London, v. 64, n. 4, p. 105-08, Apr. 1978.

ELY, J. F. Enxerto de pele. In:\_\_\_\_\_. **Cirurgia plástica**. São Paulo: Prociencx, 1965. cap. 4, p. 37-49.

FERREIRA, L. M.; DUARTE, I. S. Enxertos de pele. In: FERREIRA, L. M. **Manual de cirurgia plástica**. São Paulo: Atheneu, 1995. cap. 3, p. 28-33.

GARAVELLO, I.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; ANDRADE, J. M. Efeitos térmicos do ultra-som terapêutico sobre os tecidos ósseo e muscular e sobre placa metálica implantada. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 473-9, jun. 1997.

GEBAUER, G. P.; LIN, S. S.; BEAM, H. A.; VIEIRA, P.; PARSONS, R. Low intensity pulsed ultrasound increases the fractures callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect celular proliferation. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 20, n. 3, p. 587-92, May 2002.

GHIRALDINI, M.; TONINI, K.; GOLDENBERG, S. Animais de experimentação. In: : SILVA JR., O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER JR., A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Robe Editorial, 1988. cap. 4, p. 81.

GLOGAU, R. G.; HAAS, A. F. Skin graft. In: BAKER, S. R.; SWANSON, N. A. **Local flaps in facial reconstruction**. St Luis: Mosby 1995. chap. 15, p. 247-271.

GOLDENBERG, S.; BEVILACQUA, R. G. Cicatrização. In:\_\_\_\_\_. **Bases da cirurgia**. São Paulo: EPU, 1981. cap. 7, p. 101-17.

PINTO, W. S. Enxertia de pele autógena no paciente queimado. In: GOMES, D.;SERRA, M. C. ; PELLON, M. A. **Queimaduras**. Rio de Janeiro: Revinter, 1997. cap. 14, p. 143-148.

GONÇALVES, G.; PARIZOTO, N. A. Fisiopatologia da reparação cutânea: atuação da fisioterapia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 3, n. 1, p. 5-13, 1998.

GONÇALVES, R. P.; FERREIRA, A. L.; MELO, V. R. Sistema tegumentar. In:\_\_\_\_\_. **Anatomia para enfermagem**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. cap. 2, p. 9-14.



GONÇALVES, R. P.; FERREIRA, A. L.; MELO, V. R.; POMPOLO, S.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A. Tegumento. In:\_\_\_\_\_. **Anatomia geral**. São Paulo, 1980. cap. 9, p. 105-113.

GUIRRO, R.; SANTOS, S. C. B. A realidade da potência acústica emitida pelos equipamentos de ultra-som terapêutico: uma revisão. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 76-82, jul./dez. 1997.

HAAR, G. Basic Physics of Therapeutic Ultrasound. **Physiotherapy**, London, v. 64, n. 4, p. 100-03, Apr. 1978.

HAAR, G. Princípios eletrofísicos. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, 1998. cap. 1, p. 3-30.

HAAR, G. Therapeutic ultrasound. **European Journal of Ultrasound**, Shannon, v. 9, n. 1, p. 3-9. Mar. 1999.

HALL, P. A.; LEVISON, D. A.; WOODS, A. L.; YU, C. C.; KELLOCK, D. B. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in parafin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **The Journal of Pathology**, London, v. 162, n. 4, p. 258-94, Dec. 1990.

HAN, H.; MUSTOE, T. A. Structure and function of skin. In: ACHAUER, B. M.; ERIKSSON, E. **Plastic surgery: indications, operations and outcomes**. St. Luis: Mosby, 2000. chap. 4, p. 23-35.

HOOGLAND, R. **Manual de terapia ultrasônica**. ENRAF NONIUS, 1986

IVANOVV, V. V. Use of ultrasonics in the fixation of autologous skin transplants. **Vestnik Khirurgii Imeni I I Grekova**, Leningrad, v. 139, n. 8, p. 110-1, Aug. 1987.

JACOB, S. W.; FRANCONI, C. A. Pele. In:\_\_\_\_\_. **Anatomia e fisiologia humana**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1974. cap. 4, p. 64-72.

JANKAUKAS, S.; COHEN, I. K.; GRABB, W. C. Basic technique of plastic surgery. In: SMITH, J. W., ASTON, S. J. **Plastic surgery**. Boston: Little, Brown and Company, 1991. p. 26-30.

JOHNSON, T. M.; NELSON, B. R. Anatomy of the skin. In: BAKER, S. R.; SWANSON, N. A. **Local flaps in facial reconstruction**. St Luis: Mosby 1995. chap. 1, p. 3-14.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In:\_\_\_\_\_. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 18, p. 303-14.

LOCH, E. G.; FISHER, A. B.; KUWERT, E. Effect of diagnostic and therapeutic intensities of ultrasonics on normal and malignant human cells in vitro. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St Louis, v. 110, n. 4, p. 457-60, June 1971.

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

MAST, B. A.; COHEN, I. K. Normal wound healing. In: ACHAUER, B. M.; ERIKSSON, E. **Plastic surgery: indications, operations and outcomes**. St. Luis: Mosby, 2000. chap. 5, p. 37-51.

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

MCGREGOR, I. A., MCGREGOR, A. D. Skin graft. In:\_\_\_\_\_. **Fundamental techniques of plastic surgery: and their surgical applications**. London: Churchill Livingstone, 1995. chap. 3, p. 35-59.

MILLAN, R. A. O.; QUEIROZ, E. I. M.; PEREIRA F<sup>o</sup>, G. V. Enxertos de pele. In: GOFFI, F. S. **Técnica cirúrgica: bases anatômicas, fisiológicas e técnicas da cirurgia**. São Paulo: Atheneu, 2001 cap. 35, p. 272-276.

MODOLIN, M.; BEVILACQUA, R. G. Cicatrização das feridas. In: RAIÁ, A. A. **Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto**. São Paulo: Sarvier, 1988. cap. 13, p. 133-7.

MODOLIN, M. Enxertos de pele. In: RAIÁ, A. A. **Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto**. São Paulo: Sarvier, 1988. cap. 17, p. 153-7.

MODOLIN, M.; KAMAKURA, L. Aspectos gerais da cicatrização das feridas. In: SUCENA, R. C. **Cirurgia plástica: contribuição para o ensino da especialidade**. São Paulo: Fundo Editorial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, 1981. cap. 9, p. 91-02.

MONTES G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1-11, jan. 1991.

NETTER, F. H. **Atlas de anatomia humana**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 511., il. color.

PATRICK, M. K. Applications of therapeutic pulsed ultrasound. **Physiotherapy**, London, v. 64, n. 4, p. 103-05, Apr. 1978.

PYE, S. Ultrasound therapy equipment: does it perform? **Physiotherapy**, London, v. 82, n. 1, p. 39-43, Jan. 1996.

RAMIREZ, A.; SCHWANE, J. A.; MCFARLAND, C.; STARCHER, B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, vol. 29, n. 3, p. 326-32, Mar.1997.

RANTANEN, J.; THORSSON, O.; WOLLMER, P.; HURME, T.; KALIMO, H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibres after experimental muscle injury. **The American Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v. 27, n. 1, p. 54-9, Jan/Feb. 1999.

REHER, R. P. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Medicine & Biology**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 1251-8, 1997.

RIET, G.; KESSELS, A. G.; KNIPPSCHILD, P. A randomized clinical trial of ultrasound in the treatment of pressure ulcers. **Physical Therapy**, Albany, v. 76, n. 12, p. 1301-11, Dec. 1996.

ROCHE, C.; WEST, J. A controlled trial investigating the effect of ultrasound on venous ulcers referred from general practitioners. **Physiotherapy**, London, v. 70, n. 12, p. 475-77, Dec. 1984.

RUDOLPH, R.; BALLANTYNE JR, D. L. Skin graft. In: MCCARTHY, J. G. **Plastic surgery: general principles**. W.B. Saunders Company, 1990. cap. 8, p. 221-267.

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

VILALBA, L. I.; RAMOS, M. C. G.; GALIMBERT, R. Injerto libre de piel total. **Archivos Argentinos de Dermatologia**, Buenos Aires, v. 45, n. 4, p. 155-63, jul.-agosto 1995.

WARREN, C. G., KOBLASKI, J. N.; SIGELMANN, R. A. Ultrasound coupling media: their relative transmissivity. **Archives of Physical Medicine & Rehabilitation**, Chicago, v. 57, n. 5, p. 218-22, May 1976.

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

XAVIER, C.; DUARTE, L. R. Estimulação ultra-sônica no calo ósseo. *Revista Brasileira de Ortopedia*. São Paulo, v. 18, p. 73-80, 1983.

YOUNG, B., HEATH, J. W. Pele In:\_\_\_\_\_. **Wheater - Histologia funcional: texto e atlas em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 9, p. 171., il. color.

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

YOUNG, S. R.; DYSON, M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. **Ultrasonics**, London, v. 28, n. 3, p. 175-80, May 1990a.

YOUNG, S. R.; DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis.  
**Ultrasound in Medicine & Biology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 251-9. 1990 b.