



Acta Ortopédica Brasileira

ISSN: 1413-7852

actaortopedicasociedade@uol.com.br

Sociedade Brasileira de Ortopedia e

Traumatologia

Brasil

Clemente Mendonça, Adriana; da Silva Ferreira, Adriana; Barbieri, Cláudio Henrique; Thomazine, José Antônio; Mazzer, Nilton

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

Acta Ortopédica Brasileira, vol. 14, núm. 3, 2006, pp. 152-157

Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia

São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65714307>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

 redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS TOTAIS EM RATOS

**EFFECTS OF LOW-POWER PULSED ULTRASOUND ON SECOND-INTENTION HEALING OF TOTAL SKIN INJURIES IN RATS**

---

ADRIANA CLEMENTE MENDONÇA<sup>1</sup>, ADRIANA DA SILVA FERREIRA<sup>2</sup>, CLAUDIO HENRIQUE BARBIERI<sup>3</sup>, JOSÉ ANTÔNIO THOMAZINE<sup>4</sup>, NILTON MAZZER<sup>5</sup>

---

## RESUMO

Avaliamos os efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização de lesão cutânea produzida na região dorsal de ratos. Utilizamos 60 ratos machos (Wistar, peso médio de 300g) divididos em dois grupos, sendo: 1) irradiação simulada; 2) irradiação efetiva (freqüência fundamental de 1,5MHz, freqüência de repetição de pulsos de 1KHz, largura de pulso de 200  $\mu$ s, intensidade de 30mW/cm<sup>2</sup> –SATA, 10 minutos de aplicação em dias alternados). Estes foram subdivididos em subgrupos, de acordo com o tempo de avaliação da lesão, de 3, 7 e 14 dias, e a cicatrização foi avaliada através de análises planimétrica e histo-morfométrica. Aumento significante ( $p<0,05$ ) da área cicatrizada foi observado no Grupo 2 ( $141,88\pm18,50$  mm<sup>2</sup>) em relação ao Grupo 1 ( $117,38\pm15,14$  mm<sup>2</sup>), no 14º dia. Houve diminuição significante do número de células inflamatórias ( $p<0,05$ ), associada a um incremento da angiogênese, no Grupo 2 ( $2196,56$  cel/mm<sup>2</sup> $\pm234,93$ ) em relação ao Grupo 1 ( $2611,68$  cel/mm<sup>2</sup> $\pm423,82$ ), no 3º dia. Não observamos diferenças significantes na formação de colágeno, área de derme e epiderme entre os grupos. Concluiu-se que o ultra-som pulsado de baixa intensidade não apresenta efeitos deletérios e estimula moderadamente a cicatrização cutânea por segunda intenção em condições experimentais, com potencial para aplicação clínica em humanos.

**Descritores:** Lesões cutâneas totais; Ultra-som de baixa intensidade; Cicatrização por segunda intenção.

## SUMMARY

We evaluated the effects of low-power pulsed ultrasound on skin injury healing at dorsal region of rats. Sixty male rats were used (Wistar, mean weight: 300 g) divided into two groups, namely: 1) simulated irradiation; 2) effective irradiation (basic rate of 1.5MHz, pulse cycle rate of 1KHz, pulse width of 200  $\mu$ s, power of 30mW/cm<sup>2</sup> –SATA, 10 minutes of application in alternate days). These were further divided into subgroups, according to the time of injury assessment, as 3, 7, and 14 days, and healing was assessed by planimetric and histomorphometrical analysis. A significant increase ( $p<0.05$ ) of the healing area was seen for Group 2 ( $141.88\pm18.50$  mm<sup>2</sup>) compared to Group 1 ( $117.38\pm15.14$  mm<sup>2</sup>), at the 14th day. There was a significant reduction of the number of inflammatory cells ( $p<0.05$ ), associated to an increment of angiogenesis for Group 2 ( $2196.56$  cel/mm<sup>2</sup> $\pm234.93$ ) in comparison to Group 1 ( $2611.68$  cel/mm<sup>2</sup> $\pm423.82$ ), at the 3rd day. No significant differences were seen in collagen formation, or on dermis and epidermis area between groups. It was concluded that low-power pulsed ultrasound does not cause any deleterious effects and can moderately stimulate skin second-intention healing in experimental environments, showing a potential to clinical use in human beings.

**Keywords:** Total skin lesion; Low intensity ultrasound; Secondary healing.

Trabalho realizado no Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Programa de Pós-graduação Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação.

Endereço para correspondência: Claudio Henrique Barbieri - Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP - Campus Universitário - CEP 14049-900 - Ribeirão Preto - SP - BRAZIL - E-mail: chbarbie@fmrp.usp.br

1 - Fisioterapeuta, estudante de pós-graduação nível doutorado.

2 - Fisioterapeuta, estudante de pós-graduação nível mestrado.

3 - Professor titular, orientador.

4 - Professor doutor, Departamento de Cirurgia e Anatomia. Co-orientador.

5 - Professor associado, Co-orientador.

## INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização ocorre para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido. Muitos eventos bioquímicos e celulares, dos quais depende a qualidade da cicatriz formada, estão envolvidos neste processo, que resulta da resposta tecidual à lesão. O processo de reparação tecidual é dividido, de modo geral, em três fases, de limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo: 1) inflamação; 2) formação do tecido de granulação com deposição de matriz extracelular; e 3) remodelação<sup>(1)</sup>.

Há evidências de que o reparo tecidual pode ser estimulado por agentes físicos, entre eles o ultra-som. O efeito benéfico do ultra-som tem sido demonstrado sobre diversos tecidos, inclusive a pele, destacando-se 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<sup>(2)</sup>. Os eventuais efeitos benéficos do ultra-som seriam de grande relevância, por exemplo, no tratamento de úlceras cutâneas crônicas, nas quais já tem sido demonstrado o aumento da velocidade de cicatrização, a diminuição do número de células inflamatórias e a melhora da qualidade do tecido neoformado, sobretudo em trabalhos de investigação clínica<sup>(3)</sup>.

Os efeitos benéficos do ultra-som têm sido demonstrados, sobretudo à baixa intensidade e no modo pulsado, o que minimiza inclusive o risco de lesões teciduais que podem ocorrer com intensidades elevadas<sup>(4)</sup> e com o modo contínuo<sup>(5)</sup>. Baixa intensidade e modo pulsado são as características do equipamento desenvolvido nos nossos laboratórios e que tem sido empregado num grande número de investigações experimentais e clínicas sobre a cicatrização de diversos tecidos biológicos, principalmente do osso<sup>(6,7)</sup>, mas também do músculo<sup>(8,9)</sup> e da pele<sup>(10,11,12)</sup>.

Considerando o pequeno número de estudos controlados sobre o tema, foi o objetivo do presente trabalho avaliar e quantificar os efeitos da irradiação ultra-sônica de baixa intensidade sobre a cicatrização cutânea, num modelo experimental de lesão cutânea total em ratos, pela medida da área da lesão e por meio de estudos histológicos e histomorfométricos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 60 ratos machos da raça Wistar de idade adulta e peso corpóreo médio de 300 g (variação: 250 e 350g), esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo sob protocolo número 053/2004 na 20º reunião ordinária realizada em 07/03/2005. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas em grupos de cinco e receberam ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos conforme o tratamento realizado, como se segue: Grupo 1: irradiação simulada (n=30); Grupo 2: irradiação efetiva de baixa intensidade (n=30). Em cada grupo, os animais foram distribuídos em três sub-

grupos (A, B e C, respectivamente) de dez animais cada, conforme o período de observação após o tratamento, de 3, 7 e 14 dias, respectivamente, ao final do qual os animais eram sacrificados e a pele da região de interesse ressecada em bloco para processamento e análise histológica e histo-morfométrica. Fragmentos de pele normal, removidos na produção das lesões e selecionados aleatoriamente, constituíram o Grupo 3, de controle normal.

## Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com doses adequadas de pentobarbiturato sódico (Nembutal®, Abbott). Ampla tricotomia era feita na região escapular direita, em seguida submetida a anti-sepsia com álcool iodado a 2% e proteção com campos cirúrgicos estéreis. Em seguida, era produzida uma lesão cutânea total de 1 cm de diâmetro, com um punch especificamente confeccionado; para maior eficiência do punch, a pele era puxada de modo a formar uma prega, que era apoiada sobre uma superfície dura; isto feito, o punch era utilizado em movimentos rotatórios, cortando assim um segmento circular da pele, sem, todavia, atravessá-la e não lesando a face profunda da pele do outro lado da prega. Ocionalmente, um bisturi era utilizado para complementar a secção da pele. A lesão era protegida com um curativo úmido renovado diariamente e somente removido para a aplicação da irradiação ultra-sônica.

## Irradiação ultra-sônica

Imediatamente após a lesão já era realizada a primeira seção de irradiação ultra-sônica, as demais sendo realizadas em dias alternados, de modo que nos subgrupos 1A e 2A (3 dias) foram feitas no total duas aplicações, nos subgrupos 1B e 2B (7 dias), quatro aplicações, e nos subgrupos 1C e 2C (14 dias), sete aplicações. Para otimizar o contato das ondas ultra-sônicas com o tecido, as lesões eram abundantemente banhadas com solução fisiológica e, em seguida, cobertas com um filme plástico (PVC, de uso doméstico). O gel de acoplamento do ultra-som era espalhado sobre o filme, permitindo a irradiação ultra-sônica estacionária 10 minutos sem contato do cabeçote com a lesão. Procedimentos idênticos eram realizados nos Grupos 1 e 2, sendo com o equipamento desligado no Grupo 1 (irradiação simulada, ou sham stimulation) e ligado no Grupo 2 (irradiação efetiva). O equipamento de irradiação ultra-sônica utilizado foi desenvolvido e construído no Laboratório de Bioengenharia da EESC-USP, com as seguintes características: frequência fundamental de 1,5 MHz, modo pulsado com frequência de repetição dos pulsos de 1 kHz, largura do pulso de 200 µs, intensidade de 30mW/cm<sup>2</sup> (SATA) e área de irradiação efetiva (ERA) de 22 mm.

## Registro da área de lesão

Foram registrados os perímetros das lesões, imediatamente após a sua produção e nos vários períodos de observação pós-operatória, para ambos os grupos experimentais. Os

registros foram obtidos por meio de decalque *in loco* sobre uma folha delgada de transparência, previamente esterilizada, com uma caneta esferográfica de ponta fina. Esses registros eram copiados com um scanner digital e armazenados, para posterior processamento e análise computacional utilizando um programa específico de processamento e análise de imagens (Matlab 6.0, release 13), capaz de realizar a medida planimétrica da área. Os registros foram reproduzidos juntamente com a escala em milímetros para cálculo das áreas, a partir da medida padrão do *punch* de 1 cm de diâmetro ( $78,54 \text{ mm}^2$ ).

### Análise Histológica

Os fragmentos de pele destinada à análise histológica foram fixados em formol a 10% por 24 horas. Após este período, foram incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes transversais de 5  $\mu\text{m}$  de espessura, preparando-se duas lâminas com quatro cortes seqüenciais em cada uma. Uma das lâminas era corada com o tricrômico de Masson, que permite visualizar as camadas da pele e as células inflamatórias, e a outra com Sirius Red, para identificação, quantificação e diferenciação do colágeno.

### Análise morfométrica

A avaliação histo-morfométrica foi realizada nas lâminas coradas com o tricrômico de Masson, empregando um microscópio de transmissão de luz (Zeiss, modelo Axiophot II) equipado com uma câmera digital (JVC, modelo TK1270) acoplada a um microcomputador dotado de programas de análise computacional de imagens (KS400 V2.0, Carl Zeiss Vision, e Image Scion), para armazenamento e processamento das imagens digitalizadas. Eram capturados três quadros seqüências do interior da lesão em cada corte histológico (objetiva 10x, optovar de 1x). Foi quantificada a densidade de células inflamatórias nos subgrupos 1A e 2A (3 dias) e 1B e 2B (7 dias); a área da epiderme e da derme foi medida nos subgrupos 1B e 2B (7 dias) e 1C e 2C (14 dias). Os dados obtidos foram transferidos para uma planilha e, em seguida, submetidos à análise estatística.

As lâminas coradas com Sirius Red, para quantificação do colágeno, foram analisadas com um microscópio de luz polarizada (Nikon, modelo E-800, objetiva 20x) equipado com uma câmera digital (Nikon, modelo DXM-1200) e conectado ao micro-computador equipado com um programa específico de processamento e análise de imagens (Image Pro-Plus, Versão 4.5.1.22, Media Cybernetics, Inc). Foram quantificados: o colágeno total e o colágeno tipo I e III em todos os subgrupos de ambos os grupos experimentais, bem como da pele normal, para posterior comparação.

### Análise Estatística

Para análise dos resultados da densidade de células inflamatórias, da área da derme e epiderme e do percentual de colágeno, foi utilizada a análise de variância com dois fatores (Anova Two Way), ou seja, os períodos de observação

pós-operatória (3, 7 e 14 dias) e os grupos experimentais (1 e 2). Para a comparação entre os períodos, foi utilizado o teste post hoc de Tukey. Sendo considerada significante quando  $p < 0,05$ .

Para análise dos resultados da medida da área das lesões, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação de duas amostras independentes, com o mesmo nível de significância ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Registro da Área da Lesão

A variável área da lesão foi estabelecida comparando-se as diferenças entre os valores observados imediatamente após a sua produção e o último dia de cada subgrupo A, B e C (3, 7 e 14 dias) dos grupos 1 e 2 (irradiação simulada e irradiação efetiva).

A análise estatística evidenciou que não houve diferença estatisticamente significante entre as áreas médias ou medianas das lesões nos subgrupos 1A e 2A ( $p=0,064$ ; Figura 1), nem nos subgrupos 1B e 2B ( $p=0,144$ ; Figura 1). Já nos subgrupos 1C e 2C, as diferenças entre as áreas inicial e final foram significantes demonstrando um aumento da área cicatrizada no grupo com irradiação efetiva ( $141,88 \pm 18,50 \text{ mm}^2$ ) em relação ao grupo com irradiação simulada ( $117,38 \pm 15,14 \text{ mm}^2$ ) com  $p < 0,05$  ( $p=0,002$ ); (Figura 1/ Tabela 1).

### Análise Histológica

**Subgrupos A (3 dias):** foi observada a formação da matriz inicial da ferida, com a presença de grande quantidade de fibrina, sendo maior no Grupo 1 (Figura 2-A) do que no Grupo 2, que, no entanto, já apresenta maior contingente de fibras colágenas jovens (Figura 2-B). Foi observada, ainda, grande quantidade de neutrófilos e monócitos em ambos os grupos, maior no Grupo 1 (Figura 2-A) do que no Grupo 2 (Figura 2-B), o qual apresentou maior quantidade de vasos neoformados (Figura 2-B).

**Subgrupos B (7 dias):** as fibras colágenas já eram mais numerosas e de aspecto mais maduro em ambos os grupos, principalmente no Grupo 2, no qual apresentavam distribuição mais homogênea e regular (Figura 2-D) do que no Grupo 1 (Figura 2-C). Vasos neoformados e fibroblastos foram observados em ambos os grupos. A re-epitelização está ocorrendo em ambos os grupos, mas nitidamente mais avançada no Grupo 2, no qual já há esboço de queratinização (Figura 2-D), do que no Grupo 1 (Figura 2-C).

**Subgrupos C (14 dias):** as fibras colágenas já estavam mais diferenciadas e empacotadas, adquirindo a configuração característica relacionada às forças mecânicas normalmente atuantes sobre a pele (Figura 2-E), num aspecto mais pronunciado no Grupo 2, no qual ficaram muito semelhantes ao normal, inclusive com o desenvolvimento de papilas dérmicas (Figura 2-F). Foram observados, ainda, fibroblastos e anexos cutâneos (glândulas sebáceas, folículos pilosos) parcialmente reparados, mais numerosos no Grupo 2 (Figura 2-F) do que no Grupo 1 (Figura 2-E). A

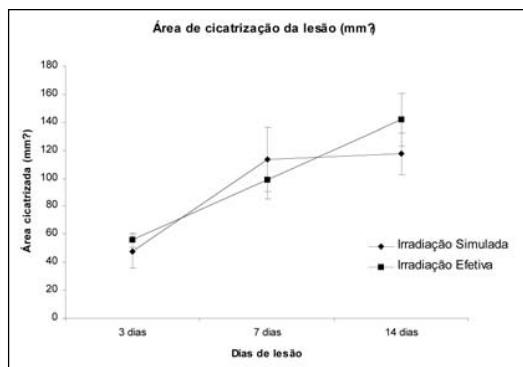
epiderme recém-formada já iniciou seu processo de diferenciação pós-migratória, mostrando maior espessura no Grupo 1 (Figura 2-E) que no Grupo 2 (Figura 2-F), demonstrando, assim, aceleração no processo de cicatrização no Grupo 2. A cobertura queratínica é observada em ambos os grupos (Figura 2-E e F).

### Análise histo-morfométrica

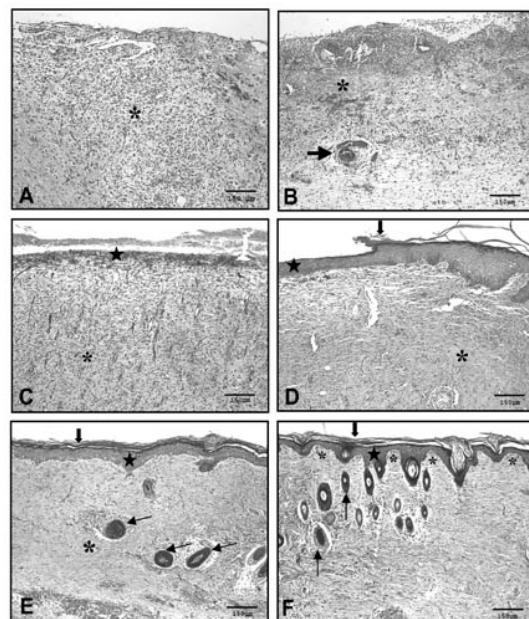
Foram avaliados a densidade de células inflamatórias, a área da epiderme e da derme e o percentual dos colágenos tipo I e III e do colágeno total (Tabela 1).

**Densidade de células inflamatórias:** a densidade de células inflamatórias foi de 2.611,68 cel/mm<sup>2</sup> no subgrupo 1A e de 2196,56 cel/mm<sup>2</sup> no subgrupo 2A, diminuindo para 2.351,22 cel/mm<sup>2</sup> no subgrupo 1B e para 2.466,42 cel/mm<sup>2</sup> no subgrupo 2B. As diferenças foram significantes entre os subgrupos 1A e 2A ( $p<0,05$ ), mas não entre os subgrupos 1B e 2B (Tabela 1). Nos subgrupos 1C e 2C, as células inflamatórias estavam virtualmente ausentes, assim como no Grupo 3, da pele normal.

**Área da epiderme e da derme:** as áreas da epiderme e da derme foram avaliadas nos subgrupo B e C de ambos os grupos e no Grupo 3. No Grupo 1, a área da epiderme diminuiu de 0,31 mm<sup>2</sup> a 0,25 mm<sup>2</sup> do subgrupo B para o subgrupo C; no Grupo 2, diminuiu de 0,33 mm<sup>2</sup> para 0,30 mm<sup>2</sup>, as diferenças entre grupos e subgrupos sendo significantes apenas



**Figura 1** - Gráfico da evolução da área cicatrizada nos grupos 1 (Irradiação simulada) e 2 (Irradiação efetiva) e seus subgrupos A (3 dias), B (7 dias) e C (14 dias).



**Figura 2** - Fotomicrografias da pele de animais do grupo 1 (irradiação simulada) à esquerda (A,C,E) e do grupo 2 (irradiação efetiva) à direita (B,D,F) nos subgrupos: A (3 dias) de lesão (A,B), B (7 dias) de lesão (C,D) e C (14 dias) de lesão (E,F). Observamos fibrina ( \* ), Células inflamatórias (menores no grupo 2 comparadas ao grupo 1), vasos neoformados ( → ), processo de reepitelização ( ★ ), processo de queratinização ( ↓ ) e anexos cutâneos ( → ).

quando comparados aos valores obtidos na pele normal do Grupo 3 ( $p<0,001$ ). A área da derme diminuiu de 2,18 mm<sup>2</sup> no subgrupo 1B para 2,05 mm<sup>2</sup> no subgrupo 1C, mas aumentou de 2,31 no subgrupo 2B para 2,32 no subgrupo 2C, as diferenças entre subgrupos e grupos sendo significantes somente em comparação com o Grupo 3 ( $p<0,05$ ) (Tabela 1).

**Colágeno tipo I:** foi mais abundante do que o colágeno tipo III nos períodos mais longos de observação (7 e 14 dias). Nos subgrupos A dos Grupos 1 e 2 o percentual foi de 1,57% e 2,76%, respectivamente, aumentando para 10,30% e 10,67%, respectivamente, nos subgrupos B, e para 16,88% e 16,64%, respectivamente, nos subgrupos C. Em nenhum grupo ou subgrupo atingiu o valor normal observado no Grupo 3 (52,02%). As diferenças nos percentuais foram significantes na comparação entre os subgrupos de um mesmo grupo ( $p<0,001$ ) e entre os Grupos 1 e 2 com o Grupo 3 ( $p<0,001$ ) (Tabela 1).

**Colágeno tipo III:** em todos os grupos e subgrupos, os valores percentuais do colágeno tipo III sempre foram superiores aos valores normais observados no Grupo 3. Nos subgrupos A dos Grupos 1 e 2, o percentual de colágeno tipo III foi de 1,06% e 1,65%, respectivamente, as diferenças entre ambos não sendo significantes. Aumentou para 1,41% no subgrupo 1B, mas diminuiu para 1,49% no subgrupo 2B, aumentando depois para 5,56% e 3,5% nos subgrupos 1C e 2C,

	Densidade (cél/mm <sup>2</sup> )	Área Epiderme (mm <sup>2</sup> )	Área de Derme (mm <sup>2</sup> )	Colágeno Tipo I (%)	Colágeno Tipo III (%)	Colágeno Total (%)	Área Cicatrizada (mm <sup>2</sup> )
1A	2611,68 ± 423,82	*	*	1,57 ± 1,35	1,06 ± 0,80	2,63 ± 1,30	47,73 ± 11,81
2A	2196,56 ± 234,93	*	*	2,76 ± 1,34	1,65 ± 0,60	4,41 ± 1,56	55,79 ± 5,29
1B	2351,22 ± 250,91	0,31 ± 0,24	2,18 ± 0,37	10,30 ± 3,13	1,41 ± 0,79	11,71 ± 3,54	113,56 ± 22,81
2B	2466,42 ± 488,16	0,33 ± 0,16	2,31 ± 0,71	10,67 ± 2,44	1,49 ± 1,15	12,16 ± 3,14	99,34 ± 14,03
1C	**	0,25 ± 0,14	2,05 ± 0,43	16,88 ± 5,90	5,56 ± 3,19	22,43 ± 4,24	117,38 ± 15,14
2C	**	0,30 ± 0,12	2,32 ± 0,50	16,64 ± 3,96	3,50 ± 1,39	20,14 ± 4,20	141,88 ± 18,50
N	**	0,16 ± 0,03	1,51 ± 0,05	52,02 ± 2,19	0,56 ± 0,21	52,58 ± 2,21	***

Legenda: 1- Grupo com irradiação simulada, 2- Grupo com irradiação efetiva, A- 3 dias de lesão, B- 7 dias de lesão, C- 14 dias de lesão, N- Pele normal sem lesão.\* Nesta f

**Tabela 1** - Parâmetros histo-morfométricos avaliados.

respectivamente. As diferenças foram significantes na comparação entre os subgrupos de cada grupo ( $p<0,001$ ) e entre o Grupo 3 e os subgrupos A ( $p<0,004$ ), B ( $p<0,003$ ) e C ( $p<0,001$ ) de ambos os Grupos 1 e 2 (Tabela-1).

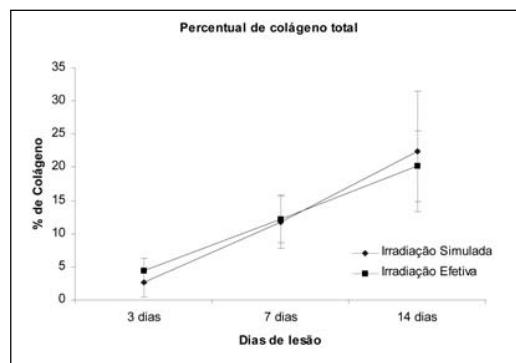
**Colágeno total:** em todos os grupos e subgrupos, os valores percentuais do colágeno total sempre foram inferiores aos do Grupo 3, no qual foi registrado o valor médio de 52,58%. No Grupo 1, foi de 2,63% no subgrupo A, passando a 11,71% no subgrupo B e a 22,43% no subgrupo C. No Grupo 2, foi de 4,41% no subgrupo A, 12,16% no subgrupo B e 20,14% no subgrupo C. As diferenças foram significativas na comparação entre os subgrupos dos Grupos 1 e 2 ( $p<0,001$ ) e entre estes e o Grupo 3 ( $p<0,001$ ), (Tabela 1/Figura 3).

## DISCUSSÃO

O ultra-som é, provavelmente, o recurso físico mais utilizado no tratamento de lesões de tecidos moles, podendo acelerar a reparação tecidual nos seus diferentes aspectos<sup>(2,13)</sup>. Com a irradiação ultra-sônica, é possível melhorar tanto a velocidade da cicatrização, quanto à qualidade do tecido cicatricial. De fato, há muitos relatos sobre os efeitos do ultra-som sobre o processo de cicatrização dos ossos, tendões, músculos, ligamentos, cartilagem e pele, demonstrando seus benefícios com baixas doses e seus prejuízos com doses elevadas<sup>(4)</sup>.

Além disso, vários experimentos vêm demonstrando a superioridade do ultra-som pulsado, em comparação com o contínuo. O ultra-som pulsado é caracterizado por pausas entre os ciclos de transmissão, minimizando os efeitos térmicos e maximizando o efeito mecânico da irradiação, do que resulta um aumento da síntese de colágeno, que chega a 30% contra 20% com o ultra-som contínuo, para a mesma intensidade<sup>(5)</sup>. Várias investigações evidenciaram, ainda, efeitos biológicos do ultra-som relacionados à cavitação e à micro-massagem, tais como de-granulação de células de sustentação, alterações na função da membrana celular, aumento nos níveis intracelulares de cálcio, estimulação da atividade fibroblásticas, resultando no aumento da síntese protéica, da neo-angiogênese e da tensão elástica do colágeno, efeitos esses mais pronunciados com o ultra-som pulsado<sup>(2,13)</sup>, independentemente dos demais parâmetros utilizados na irradiação, como a freqüência fundamental, a intensidade, a largura de pulso e a freqüência de repetição dos pulsos.

Mais recentemente, efeitos benéficos da irradiação ultra-sônica pulsada sobre o processo de cicatrização e regeneração de diferentes tipos de tecidos foram relacionados à baixa intensidade, com uso de equipamentos especificamente construídos com essa característica<sup>(6)</sup>. A eficácia do ultra-som de baixa intensidade foi comprovada em várias



**Figura 3 - Valores percentuais do colágeno total nos grupos 1 (Irradiagão Simulada) e 2 (Irradiação efetiva) e seus sub-grupos A (3 dias), B (7dias) e C (14 dias).**

investigações sobre a estimulação da neo-osteogênese<sup>(7)</sup> e sobre o reparo de outros tipos de tecidos, como a pele<sup>(10,11,12)</sup>, o músculo<sup>(8,9)</sup>, a cartilagem<sup>(14)</sup> e os nervos periféricos<sup>(15)</sup>.

Lesões cutâneas crônicas, como as úlceras de várias causas, são de difícil cicatrização, motivando a procura de meios e recursos que possam beneficiar seu processo de cicatrização. O ultra-som seria um desses recursos, visto que seus efeitos benéficos se fazem sentir desde a fase inflamatória aguda até a fase de remodelagem

da cicatriz cutânea. Todavia, sua utilização para o reparo do tecido cutâneo a intensidades muito baixas tem sido muito pouco investigada, motivo do presente estudo.

O modelo experimental utilizado foi o de lesões cutâneas totais extensas, ou seja, de remoção completa da pele numa área relativamente grande, deixando exposto o tecido fascial de revestimento muscular. Para maior reprodutibilidade do método, foi utilizado um punch circular cortante, que fazia mais de 90% do corte da pele, o restante sendo complementado com um bisturi. No Grupo 1, a irradiação era simulada, ou seja, o equipamento era utilizado do mesmo modo que no Grupo 2, embora desligado. Essa estratégia teve por finalidade submeter os animais do Grupo 1 ao mesmo protocolo do Grupo 2, garantindo assim que os efeitos encontrados seriam exclusivamente relacionados ao estímulo ultra-sônico.

O equipamento de irradiação ultra-sônica foi o mesmo já utilizado e convalidado em investigações anteriores, para uso estacionário. Para o uso em humanos, com grandes lesões, o tempo de irradiação recomendado é de 20 minutos em aplicações diárias, mas na presente investigação, por força das dimensões relativamente diminutas da lesão, foi estipulado o tempo de 10 minutos em aplicações em dias alternados. Em contraste com a aplicação da irradiação sobre as bordas da lesão, como mencionado em outros trabalhos<sup>(11,12)</sup>, aqui foi preferida a aplicação direta sobre a lesão, que foi isolada do cabeçote de ultra-som por meio de um filme de PVC, sob o qual era introduzida solução fisiológica e sobre o qual era colocado o gel de acoplamento do cabeçote, o que propiciou a profilaxia de infecções ao mesmo tempo em que garantiu a transmissibilidade das ondas ultra-sônicas<sup>(16)</sup>. Sendo o leito cruento da lesão constituído de fascia muscular e músculo, ricos em células mesenquimais pluripotenciais, é válido pensar que a irradiação diretamente nesse local seria mais eficiente do que nas bordas da lesão.

O seguimento da evolução da área da lesão cutânea é o parâmetro mais empregado na prática clínica diária de fisioterapeutas e médicos, motivo da sua utilização neste trabalho. A medida da área da lesão pelo método empregado (planimetria computacional) foi escolhida por ser de baixo custo, fácil manuseio e relevante aplicabilidade clínica, havendo já vários relatos do seu emprego para o seguimento

da evolução de lesões abertas<sup>(17,18)</sup>. Por esse parâmetro, o efeito da irradiação ultra-sônica apareceu somente no último período de observação, de 14 dias (subgrupos C), quando a diferença entre os grupos foi significante, o que não havia ocorrido nos períodos de 3 (subgrupos A) e 7 dias (subgrupos B).

Na análise histológica qualitativa, os efeitos da irradiação ultra-sônica no Grupo 2 manifestaram-se como a menor quantidade de fibrina, o menor número de neutrófilos e monócitos, maior contingente de vasos neoformados, fibras colágenas em maior número e com arranjo mais maduro e re-epitelização mais precoce, incluindo o aparecimento de anexos e grânulos de queratina. A análise morfométrica confirmou esses dados, começando com o número de células inflamatórias, que diminuiu paulatinamente em ambos os grupos, com queda mais pronunciada no Grupo 2, embora a diferença entre ambos não tivesse sido significante, o mesmo ocorrendo com a área da epiderme e da derme. Com relação ao colágeno total e do tipo I, observou-se aumento significante entre os subgrupos dos dois grupos, caracterizando o avançar do processo cicatricial, enquanto que o colágeno do tipo III, que já estava acima do normal no primeiro período de observação (subgrupo A) de ambos os grupos, apresentou aumento significante entre este e o último período (subgrupos A e C), ficando cerca de dez vezes maior que o normal no Grupo 1 e sete vezes no Grupo 2. Todavia, as diferenças entre os dois grupos não foram significantes para nenhum desses parâmetros. Ainda mais, em

nenhum dos dois grupos o percentual de colágeno atingiu os valores normais do Grupo 3, claramente demonstrando que o processo cicatricial ainda era inicial para ambos os grupos no 14º dia de observação. Esses resultados, de certa forma apontam para uma aparente inocuidade da irradiação ultra-sônica na cicatrização cutânea, o que não é verdadeiro se maior atenção for dada às diferenças qualitativas, que indicam maior rapidez do processo cicatricial no Grupo 2. Assim, a irradiação ultra-sônica não modificaria o processo quantitativamente, mas somente qualitativamente. Os resultados obtidos neste trabalho vão de encontro aos relatados na literatura, segundo os quais a irradiação ultra-sônica de fato estimula a cicatrização cutânea<sup>(2,3,16)</sup>, a redução da área de lesão decorrendo, provavelmente, da ação sobre os miofibroblastos no sítio da lesão, aumentando a sua contratilidade<sup>(19)</sup>. Todavia, as variações nos parâmetros como tempo, frequência e dose de aplicação, entre os diferentes autores, contribuem para que a dúvida permaneça, bem como a existência de trabalhos de meta-análise que sugerem não haver evidências biofísicas suficientes para afirmar o efeito da irradiação ultra-sônica sobre a cicatrização<sup>(20)</sup>. Os autores concluem que a irradiação ultra-sônica como empregada nesta investigação influenciou positivamente o processo de cicatrização por segunda intenção da pele de ratos, acelerando-o, e que o método tem potencial para aplicação clínica em humanos, adaptados os parâmetro de aplicação, particularmente tempo de aplicação e periodicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clark, R.A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 11: 647-661.
2. Young, S. R. ; Dyson, M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics* 1990; 28: 175-180.
3. Johansen, F.; Gam, A. N. ; Karlsmark, T. Ultrasound therapy in chronic leg ulceration: a meta-analysis. *Wound repair and regeneration* 1998; 6: 121-126.
4. Young, S. Reparo Dos Tecidos. In: Kitchen, S.; Bazin, S. *Eletroterapia de Clayton*. São Paulo: Manole; 1998. cap.15, p.235-258.
5. Webster, D.F.; Pond, J.B.; Dyson, M.; Harvey, W. The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. *Ultrasound Med.Biol.* 1978; 4: 343-5.
6. Duarte, L.R.; Xavier,C.A.M. Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. *Rev. Bras. de Ortop.* 1983; 18: 73-80.
7. Rubin, C. ; Bolander, M.D.; Ryaby, J.P.; Hadjiaargyrou, M. The uses of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *The Journal of bone and joint surgery-American.* 2001; 83: 259-270.
8. 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 de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2001.
9. Guiro, R.; Guiro, E. Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial: estudo experimental em ratos. *Ciência & Tecnologia* 1995; 8: 37-42.
10. Peschén,M. ; Weichenthal,M.; Schopf,E.; Vanscheidt, W. Low frequency ultrasound treatment of chronic venous leg ulcers in an outpatient therapy. *Acta Derm Venereol Stockh* 1997; 77: 311-314.
11. Anastácio, M.A.D.J. Reparação epitelial em úlceras vasculares após estimulação do ultra-som pulsado de baixa intensidade [dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2000.
12. Campanelli, F. Efeitos da radiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade sobre o mal perfurante plantar (MPP), manifestação cutânea decorrente da hanseníase [dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2004.
13. Dyson, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 1987; 73: 116-120.
14. Cook, S.D.; Salkeld,S.L.; Popich-Patron, L.S.; Ryaby, J.P.; Jones, D.G.; Barrack, R.L. Improved cartilage repair after treatment with low-intensity pulsed ultrasound. *Clin.Orthop.* 2001; 391: 231-43.
15. Crisci, A.R. Estudo experimental dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a regeneração do nervo ciático de ratos após neurotomia, mediante avaliações morfológicas e morfométricas [dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2001.
16. Amâncio, A.G. Efeitos do ultra-som terapêutico na integração de enxertos da pele total em coelhos [dissertação de mestrado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2003.
17. Falcão, S.C.; Coelho, A. R.B.; Almeida, E.L.; Galdino, C.A.P.M. Modified process of image reproduction and amplification for measurement of area by planimetry. Application in plain wounds produced in dogs treated by occlusive skin frog dressings. *Braz.J.Vet.Res.Anim.Sci.* 2001; 38: 165-169.
18. Romanelli, M.; Gaggio, G.; Piaggesi, A. ; Coluccia, M.; Rizzello, F. Technological advances in wound bed measurements. *Wounds* 2002; 14: 58-66.
19. Ter Haar, G. R.; Dyson, M. ; Talbert, D. Ultrasonically induced contractions of mouse uterine muscle in vivo. *Ultrasonics* 1978; 16: 275-276.
20. Robertson, V.J And Baker, K.G. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. *Phys Ther.* 2001; 81: 1339-1350.