

**OS EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO NAS
LESÕES DA EPIDERMIS DE COELHOS**

Ana Regina de S. Bavaresco Barros

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

ORIENTADOR: Prof.Dr. Cláudio Henrique Barbieri

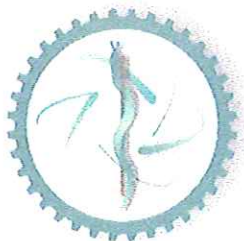


Ribeirão Preto

2002

DEDALUS - Acervo - EESC





Universidade de São Paulo
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA ALUNA ANA REGINA DE SOUZA BAVARESCO BARROS, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOENGENHARIA EESC / FMRP / IQSC – USP EM 13 DE MARÇO DE 2002.

Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri
Orientador

Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor

Prof. Dr. Nilton Mazzer

Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor

Prof. Dra. Norma Tiraboschi Foss
Departamento de Dermatologia – Clínica Médica - FMRP

*À Deus, pela graça concedida.
Ao meu amado esposo (Edson),
pelo apoio, ajuda e carinho
dispensados no momento em
que mais precisei, e às minhas
filhas Bruna e Pietra, que procuraram
compreender a minha ausência em
alguns momentos de suas vidas.
Aos meus pais Domingos (em memória)
e Antonia minha eterna gratidão e amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio H. Barbieri, pela confiança, apoio, pela orientação na elaboração deste trabalho.

Aos funcionários Francisco Carlos Mazzocato, Luis Henrique Alves Pereira e Maria Teresinha de Moraes do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela atenção e empenho quando solicitados.

Ao veterinário e colega Vitor Aparecido Castania, pelos auxílios oferecidos.

À colega Darlene (Patologia), obrigado pelo apoio e dedicação.

À colega Auristela de Mello Martins (Patologia), agradeço pela sua dedicação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
LISTA DE SÍMBOLOS.....	111
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
1 INTRODUÇÃO	
1.2 OBJETIVO DO TRABALHO.....	2
1.3 REGENERAÇÃO TECIDUAL.....	2
1.4 INTERAÇÃO DO ULTRA-SOM COM OS TECIDOS.....	4
1.4.1 Propagação do ultra-som.....	4
1.4.2 Efeitos térmicos.....	4
1.4.3 Efeitos não térmicos.....	6
1.4.4 Efeito placebo.....	7
1.5 ULTRA-SOM E CICATRIZAÇÃO TECIDUAL	8
2 MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 ANIMAIS.....	11
2.2 REALIZAÇÃO DA LESÃO.....	12
2.3 EQUIPAMENTO DE ULTRA-SOM	13
2.4 TRATAMENTO.....	15
2.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	16
2.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	17

3	RESULTADOS	
3.1	ANÁLISE DESCRITIVA.....	19
3.1.1	<i>Grupo 1</i>	19
3.1.2	<i>Grupo 2</i>	20
3.1.3	<i>Comparação entre os grupos 1 e 2</i>	23
3.2	PROPORÇÃO DE OCORRÊNCIA (ENTRE OS GRUPOS)	
3.2.1	<i>Infiltrado inflamatório</i>	23
3.2.2	<i>Fibrose</i>	24
3.2.3	<i>Reepitelização</i>	24
4	DISCUSSÃO.....	29
5	CONCLUSÃO.....	33
	ANEXOS.....	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 –Representação esquemática da pele.....	03
FIGURA 02 – Punch – material utilizado para realização das lesões.....	12
FIGURA 03 – Dobra realizada na epiderme do dorso do coelho e realização das lesões.....	12
FIGURA 04 – Lesões no dorso do coelho com dimensão de 1 cm de diâmetro.....	13
FIGURA 05 –Equipamento de ultra-som clínico utilizado para o tratamento.....	14
FIGURA 06 - Cabeçote do ultra-som, mostrando área reduzida.....	15
FIGURA 07- Tratamento com ultra-som, realizado no dorso do coelho.....	16
FIGURA 08- Aspecto Macroscópico das lesões do grupo 1.....	19
FIGURA 09- Aspecto Macroscópico das lesões do grupo 2.....	20
FIGURA 10- Comparação do aspecto macroscópico das lesões do grupo 1 e 2 no sétimo dia pós operatório.....	20
FIGURA 11- Microscopia da epiderme do coelho, mostrando moderada fibrose em animais do grupo 1.....	22
FIGURA 12- Microscopia da epiderme do coelho, mostrando epiderme íntegra, moderada fibrose e discreto infiltrado inflamatório em animais do grupo 1.....	23
FIGURA 13- Microscopia da epiderme do coelho, mostrando moderado infiltrado inflamatório e discreta fibrose em animais do grupo 2.....	23
FIGURA 14 – Microscopia de epiderme do coelho, mostrando epiderme sem alteração histológica significativa, em animais do grupo 2.....	24
FIGURA 15 - Histograma mostrando o comportamento do infiltrado inflamatório nos grupos 1 e 2.....	26

FIGURA 16 – Histograma mostrando o comportamento da fibrose nos grupos 1 e 2.....	27
FIGURA 17- Histograma mostrando o comportamento da reepitelização nos grupos 1 e 2.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EESC – Escola de Engenharia de São Carlos

SATA – Spatial Average and Temporal Average

LISTA DE SÍMBOLOS

Hz -unidade de medida de frequência

MHz -unidade de medida de frequência igual à um milhão de Hertz

W/cm² -quantidade de energia por unidade de área em uma unidade de tempo

RESUMO

BARROS, A. R. S. B. (2002). *Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões de epidermes de coelhos. Ribeirão Preto, 2002.41p.Dissertação(Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.*

O ultra-som terapêutico é o recurso físico mais empregado como coadjuvante na promoção do reparo tecidual em vários tipos de lesão de partes moles. Neste trabalho, foi estudada a influência do ultra-som terapêutico no processo de cicatrização de feridas cutâneas num modelo experimental em coelhos. Foram utilizados 36 coelhos adultos, nos quais foram produzidas três lesões cutâneas no dorso, pela ressecção de um segmento circular de pele de 1 cm de diâmetro, distando 5 cm uma da outra, em linha. Uma das lesões era submetida ao tratamento efetivo com o ultra-som, a outra era submetida a tratamento placebo e a terceira era deixada intocada. Os animais foram divididos em dois grupos de 18 cada, conforme a intensidade do ultra-som aplicado, de $0,8 \text{ W/cm}^2$ e $0,4 \text{ W/cm}^2$, respectivamente. O tratamento foi iniciado no primeiro dia pós-operatório e aplicado diariamente até o sétimo dia, após o que os animais eram sacrificados e as lesões eram ressecadas com larga margem de segurança, para posterior exame histopatológico. Foram obtidos cortes histológicos de $5 \mu\text{m}$ de espessura, corados com duas técnicas e examinados ao microscópio de luz. Os parâmetros avaliados foram o infiltrado inflamatório, fibrose e reepitelização, aos quais foram atribuídos valores numéricos, de 0 a 3, que permitissem a análise estatística. Os resultados mostraram que o ultra-som induz alterações teciduais e celulares variáveis, mas não significativas em nenhum dos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: lesões cutâneas; ultra-som terapêutico; regeneração

ABSTRACT

BARROS, A. R.S.B. (2002). *The effects of therapeutic ultrasound on the damage of rabbit s skin. Ribeirão Preto, 2002. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de São Paulo*

Therapeutic ultrasound is the most used adjunct physical resource to promote tissue repair in many types of soft tissue lesion. In the present work the influence of therapeutic ultrasound on the healing process of skin wounds was studied in rabbits. Thirty-six adult rabbits were used, three round skin wounds of 1 cm in diameter being made on the dorsum about 5 cm in line from one another. Ultrasound treatment was applied to one of the wounds only, a placebo being applied to another and the third being left untouched. The animals were distributed into two groups of 18 according to the intensity of the ultrasound applied, of 0.8 W/cm² and 0.4 W/cm², respectively. The treatment was started on the first postoperative day and applied daily till the seventh day. The animals were killed the next day and the wounds were resected with a wide safety margin for histology, 5 µm-thick sections being cut and died with two different techniques. The sections were examined on the light microscope for inflammatory infiltrate, fibrosis and regeneration of the epithelium, which were quantified from 0 to 3, so as to make the statistical study possible. Results showed that ultrasound induces cell and tissue alterations but not significantly in any of the parameters analyzed.

Keywords: skin lesions; therapeutic ultrasound; regeneration

1. INTRODUÇÃO

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. Sua primeira aplicação, não médica, ocorreu nas décadas de 20 e 30, quando foi utilizado para fins militares navais, através de equipamentos piezoelétricos de sonar. Em pouco tempo descobriu-se que também poderia ter aplicações no campo da biologia, mas foi somente depois da Segunda Guerra Mundial que se iniciaram os estudos para utilizá-lo como meio diagnóstico e terapêutico.

O ultra-som é definido como sendo um tipo de onda mecânica sonora, inaudível pelo ouvido humano, com frequência superior a 20 KHz, e que pode ser aplicado com frequência entre 0,7 e 3,0 MHz com fins terapêuticos (HOOGLAND, 1986; HILL et al., 1968).

Estudos clínicos recentes mostram que o ultra-som pode reduzir edemas, aliviar a dor, acelerar o reparo tecidual e modificar a formação de cicatriz (DYSON, 1987; MAXWELL, 1992). O seu emprego como agente acelerador da cicatrização cutânea, em feridas das mais diversas origens, é uma possibilidade ainda não muito estudada, havendo evidências de que sua correta aplicação numa fase precoce, de inflamação, possa contribuir para o reparo dos tecidos moles (DYSON, M., 1990; HART, 1998). Sendo um recurso praticamente inócuo, de baixo custo e de

uso corrente em reabilitação, poderia ser uma boa opção para o tratamento de úlceras e feridas cutâneas, desde que demonstrado o seu real potencial de promover a cicatrização.

1.2. OBJETIVO DO TRABALHO

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da aplicação precoce do ultra-som terapêutico no processo de reparo de feridas cutâneas produzidas pela ressecção de um segmento da pele, em coelhos, avaliando os resultados por meio da análise histológica dos tecidos, com microscópio de luz.

1.3. REGENERAÇÃO TECIDUAL

JUNQUEIRA E CARNEIRO (1995) referem que a pele é um dos maiores órgãos do nosso organismo, atingindo 16% do peso corporal e tendo múltiplas funções, como a regulação térmica e a proteção contra perdas hídricas e eletrolíticas, dentre outras. Ela é constituída por uma porção ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica (derme) (figura 1).

De modo geral, a reação de cicatrização envolve ações integradas das células, matriz e mensageiros químicos, que visam restaurar a integridade do tecido com maior rapidez possível. Essa reação é comum a todos os tipos de tecidos, dividindo-se em três fases:

1- inflamatória: caracterizada por alterações vasculares e celulares, com liberação de mediadores químicos, para dar início ao processo de reparo tecidual;

2- proliferativa: marcada pela formação do tecido de granulação, que precede o desenvolvimento do tecido cicatricial maduro.

3- remodelação: em que a matriz cicatricial presente é alterada na forma, ou remodelada.

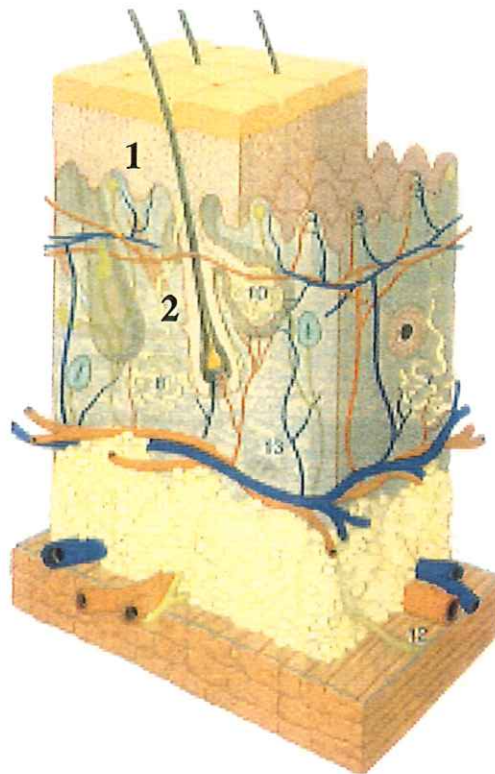


Figura 1 - Representação esquemática da pele: (1) porção ectodérmica (epiderme) e (2) porção conjuntiva (derme) - (Rochet et.al., Rééducation et réadaptation de l'adulte brûlé – Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris-France), Kinésithérapie-Médecine physique-Réadaptation, 26-280-C10, 1998, 28p.

Essas reações não são diferentes no tecido epidérmico, iniciando-se já nas primeiras 24 horas após a lesão e caminhando para a reepitelização da superfície (DYSON,M.,1990; KITCHEN &YOUNG apud KITCHEN & BAZIN, 1998).

1.4. INTERAÇÃO DO ULTRA-SOM COM OS TECIDOS

1.4.1. Propagação do ultra-som

A onda ultra-sônica é longitudinal, a direção de propagação sendo a mesma da direção de vibração, requerendo meios elásticos para se propagar (HOOGLAND, 1986).

O ultra-som se propaga mal no ar, requerendo um agente acoplador, como um gel, óleo ou água, para a aplicação em um tecido, de modo a evitar a intromissão do ar entre a pele e o transdutor e melhorar a propagação (BAZIN *in* KITCHEN & BAZIN, 1998; WILLIAMS, 1987; DOCKER, 1987). Além disso, o feixe de ultra-som não é homogêneo, podendo ocorrer picos de alta intensidade em determinadas regiões do cabeçote, que geram ondas estacionárias e aquecimento, ambos lesivos aos tecidos. Para evitar os pontos de aquecimento, o cabeçote do ultra-som deve ser movido constantemente durante a aplicação, quando a aplicação é feita com contato direto (HAAR, 1987; McDIARMID, 1987). Quando a onda ultra-sônica atinge um tecido, parte é refletida e parte é absorvida, a intensidade de absorção e de reflexão depende da impedância acústica do tecido (WILLIAMS, 1987).

1.4.2. Efeitos térmicos do ultra-som

A quantidade de calor gerado pelo ultra-som difere em cada tecido, dependendo de vários fatores, como a impedância acústica do tecido, o tipo de ultra-som (contínuo ou pulsado) e a intensidade e duração de tratamento. O equilíbrio entre esses fatores é que produz o equilíbrio entre os efeitos atérmicos e térmicos do ultra-som (HOOGLAND, 1986). O aquecimento ocorre porque, à medida que o

ultra-som atravessa o tecido, parte da energia é absorvida pelo próprio meio, mas a outra parte é refletida pelas estruturas que se encontram em sua trajetória, transformando-se em calor (HAAR in KITCHEN & BAZIN , 1996). O calor é gerado especialmente nos pontos de reflexão do ultra-som, que existem nos limites entre os tecidos com impedâncias acústicas distintas. Tal fenômeno ocorre com mais frequência nos tecidos ósseo, cartilaginoso, tendinoso, muscular e na pele, e quando o tecido é incapaz de dissipar o calor gerado pelo ultra-som, pode ocorrer um efeito adverso sobre a enfermidade que se pretende tratar (HOOGLAND, 1986).

DYSON (1968) refere que, com as doses mais efetivas de ultra-som, o aumento da temperatura deve ser mínimo e sugere que os efeitos térmicos são de menor importância, embora possam produzir um aumento na atividade metabólica. DYSON (1987) enfatiza, também que alguns efeitos não térmicos do ultra-som, como a cavitação transitória, que ocorrem com as doses mais altas, devem ser evitados por serem lesivos.

DYSON, M., (1990) referem que a temperatura local entre 40°C e 45°C pode contribuir para melhorar a vascularização dos tecidos, podendo ser aceita, mas as temperaturas mais elevadas podem causar necrose termal.

O efeito térmico não foi considerado importante para melhorar a função dos tendões flexores de galinhas, que ocorreu a despeito do curto período de aplicação (5 minutos), considerado insuficiente para promover um efeito térmico acentuado (STEVENSON et al., 1986).

HAAR (1999) menciona que a resposta fisiológica do tecido ao aumento de temperatura produzido pelo ultra-som depende de uma série de fatores, incluindo a temperatura máxima alcançada, a elevação da taxa de calor e o tempo de

exposição ao calor. Os efeitos benéficos observados dentro de uma faixa adequada de aumento da temperatura são o aumento da extensibilidade do colágeno dos tendões e cicatrizes teciduais, a diminuição de rigidez articular e dos espasmos musculares, o aumento do fluxo sanguíneo e o alívio da dor.

1.4.3. Efeitos não térmicos do ultra-som

A utilização do ultra-som pulsado, ao invés do contínuo, favorece a obtenção dos efeitos não térmicos do ultra-som (DOCKER, 1987). Diferentemente do aquecimento, a cavitação ocorre mais facilmente com as frequências mais baixas, as frequências maiores causam elevação de temperatura pelo aumento da absorção das ondas ultra-sônicas (DYSON, M., 1990). Há duas formas de cavitação: a transitória, que produz danos localizados e causa formação de radicais livres, e a estável, que pode ser parcialmente responsável pela estimulação do reparo dos tecidos.

FRENKEL et al. (1999), estudando os efeitos sobre o epitélio de peixes, observaram que a cavitação pode ser o principal agente de alterações dos tecidos biológicos, podendo levar à sua destruição. Os primeiros sinais de lesão ocorrem com a dose de $0,75 \text{ W/cm}^2$, com aplicações de 90 segundos de duração, no modo subaquático; sinais mais acentuados de lesão foram observados com doses mais altas, estando também relacionadas com o tempo de duração do tratamento, podendo levar até a necrose celular, das camadas superficiais às mais profundas.

Já a cavitação estável pode ser parcialmente responsável pela estimulação no reparos dos tecidos, juntamente com a micromassagem, que induzem

a formação de bolhas de gás ao redor das células, o que pode modificar a permeabilidade celular e a difusão de metabólitos (DYSON, M., 1990).

A vibração acústica produzida pela onda de ultra-som induz a mudanças celulares, alterando o gradiente de concentração de moléculas e ions (cálcio e potássio) próximo à membrana celular e sua difusão através da membrana (HAAR 1999).

McDIARMID (1987) afirma que os efeitos não térmicos, como a cavitação e micromassagem, podem ser obtidos com intensidades maiores do ultra-som, mas no modo pulsado, o que faz com que a intensidade média efetivamente aplicada seja baixa. O ultra-som pulsado, então, aumentaria o grau de atividade de cavitação no tecido.

Já quando se aplica o ultra-som contínuo, os efeitos térmicos podem ser minimizados pela utilização de intensidades mais elevadas por curto espaço de tempo, o que faz com que a intensidade média temporal seja igualmente baixa (DYSON, M.,1990).

1.4.4. Efeito placebo

TASKAN et al. (1997) trataram dois grupos de animais, um com ultra-som pulsado (ciclo de 2:8, $0,1\text{W}/\text{cm}^2$), e o outro com ultra-som placebo (equipamento desligado), durante cinco minutos por dia, em sete dias consecutivos. Analisaram a aglomeração de leucócitos polimorfonucleares e verificaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, concluindo que os resultados são devidos principalmente à fricção do cabeçote sobre a pele do que a um efeito do ultra-som propriamente dito.

DYSON (1987, 1990) refere que o tratamento placebo pode causar alívio de dor em pacientes pós-cirúrgicos, simplesmente pelo efeito psicológico.

1.5. ULTRA-SOM E CICATRIZAÇÃO TECIDUAL

Embora os mecanismos não sejam ainda perfeitamente conhecidos, é possível que a influência das ondas ultra-sônicas sobre a reação inflamatória cicatricial se faça pela estimulação da liberação de mediadores químicos pelos próprios tecidos (MAXWELL, 1992).

DYSON et al. (1968) demonstraram que o ultra-som melhorou a regeneração tecidual de feridas produzidas nas orelhas de coelhos. O tratamento foi iniciado no 14º dia após a produção da lesão e mantido até que a regeneração se completasse. Os autores utilizaram diversas intensidades de aplicação, tendo obtido melhores resultados com o ultra-som pulsado (2:8) de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ de intensidade, para o tratamento de 21 dias de duração. Após 35 dias de tratamento com esta dosagem, a diferença da cicatrização entre o grupo controle e o grupo tratado diminuiu. Aos 49 dias, esta diferença foi ainda menor; segundo os autores, isto ocorreu porque o processo reparatório já era completo nessa fase. Os autores concluíram que o ultra-som acelera a cicatrização, mas os melhores resultados ocorrem nas fases iniciais do processo.

DYSON et al. (1976) também avaliaram os efeitos do ultra-som na cicatrização de úlceras varicosas crônicas em pacientes de ambos os sexos. Compararam a aplicação do ultra-som pulsado (2:8, frequência de 3 MHz, intensidade de $1,0\text{ W}/\text{cm}^2$) com um placebo, por no máximo 10 minutos, conforme as dimensões da úlcera, aplicando o tratamento três vezes por semana por no mínimo

quatro semanas. Nos casos irradiados, foram observados aumento da temperatura local, com retorno ao normal 1 hora depois do tratamento, melhora do aspecto macroscópico da área lesada e melhora da dor, mas os autores concluíram que o mecanismo de ação do ultra-som sobre a cicatrização cutânea não puderam ser esclarecidos.

DYSON (1987) e HAAR (1999) descreveram que na fase de inflamação aguda ocorre ativação de plaquetas e de mastócitos, que liberam agentes quimiotáticos, como leucócitos polimorfonucleares e monócitos. Segundo DYSON (1987), o ultra-som estimula a liberação pelo tecido lesado de histamina e agentes quimiotáticos para os mastócitos, pela degranulação tecidual, motivo porque o tratamento com ultra-som pode ser eficaz quando aplicado já poucas horas após a lesão; os fibroblastos e as células endoteliais também podem ser afetados pelo ultra-som, o que acarreta maior síntese de colágeno e, por conseguinte, maior resistência do tecido à tração. O ultra-som pode também acelerar a contração da ferida, reduzindo assim a área da lesão, havendo ainda evidências de que a cicatriz tecidual torna-se mais forte e mais elástica.

YOUNG et al. (1990) utilizaram o ultra-som na fase aguda da cicatrização de uma área de 1 cm^2 produzida no flanco de 36 ratas, separados em dois grupos, sendo o primeiro observado até o 5^o dia pós-operatório e o segundo, até o 7^o dia pós-operatório; os grupos foram divididos em subgrupos, sendo metade para controle (placebo) e metade para tratamento efetivo com o ultra-som, com frequência de 0,75 MHz a 1 W/cm^2 no primeiro grupo, e 3 MHz a 1 W/cm^2 no segundo grupo, com tempo de aplicação uniformizado, de 5 minutos diários. Os autores observaram que, nos grupos tratados com ultra-som, houve aumento no número de fibroblastos,

os quais apresentavam melhor organização, conduzindo à maior contração da ferida e diminuição no número de células endoteliais, concluindo que o ultra-som é um agente acelerador do reparo tecidual.

Por outro lado, CAMBIER et al. (1997) analisaram a influência do ultra-som na cicatrização de queimaduras em 20 ratos, separados em dois grupos de 10 animais. No primeiro grupo, os animais foram irradiados com o ultra-som pulsado (ciclo de 20%, frequência de 3 MHz, intensidade de $0,25 \text{ W/cm}^2$); no segundo, com ultra-som contínuo (frequência de 3 MHz, intensidade $0,3 \text{ W/cm}^2$), o tratamento sendo aplicado cinco vezes por semana, por um período de seis semanas. Observaram que não houve diferenças histológicas no aspecto geral, nem diferenças estatisticamente significantes nos números de fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, dentre outros tipos de células, entre os grupos tratados com os dois tipos de ultra-som. Os autores concluíram que os resultados observados podem estar relacionados as doses baixas de ultra-som utilizada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados 42 coelhos albinos fêmeas da raça Nova Zelândia, de idade adulta e peso médio de 2,7 Kg, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, após o procedimento cirúrgico.

Seis animais foram excluídos do experimento, por apresentaram infecção nas lesões. Assim, a análise foi realizada nos 36 animais que não apresentaram complicações.

2.2. REALIZAÇÃO DA LESÃO

Todo procedimento foi realizado no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Inicialmente era feita a tricotomia do lado direito do dorso do animal a ser operado; depois, era feita a anestesia endovenosa com dose adequada de Thionembutal[®], o animal era posicionado na mesa operatória em decúbito lateral direito e fazia-se a anti-sepsia da pele com álcool-iodado a 4%.

Os campos operatórios eram colocados e procedia-se à realização das lesões. Sendo a pele do coelho muito elástica, era feita uma dobra cutânea, que era apoiada sobre a superfície dura da mesa para a execução das lesões, com um instrumento cortante especialmente confeccionado (*punch*) que removia um segmento cutâneo redondo de 1 cm de diâmetro (figura 2 e 3).

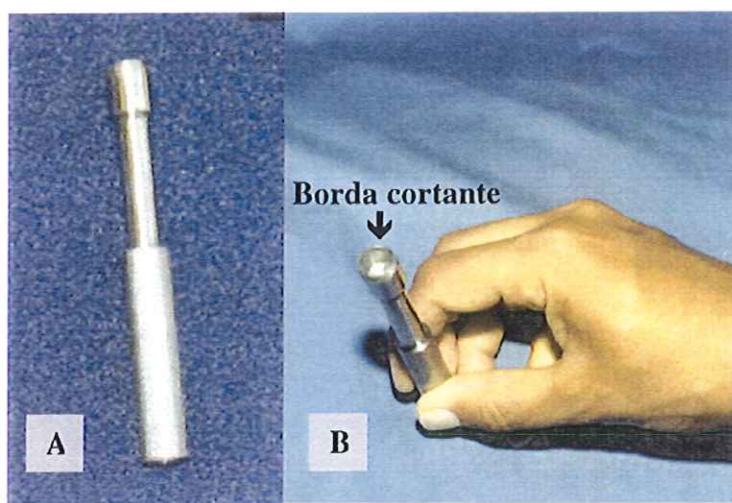


Figura 2- (A) Punch – utilizado para realização das lesões
(B) Borda cortante do punch

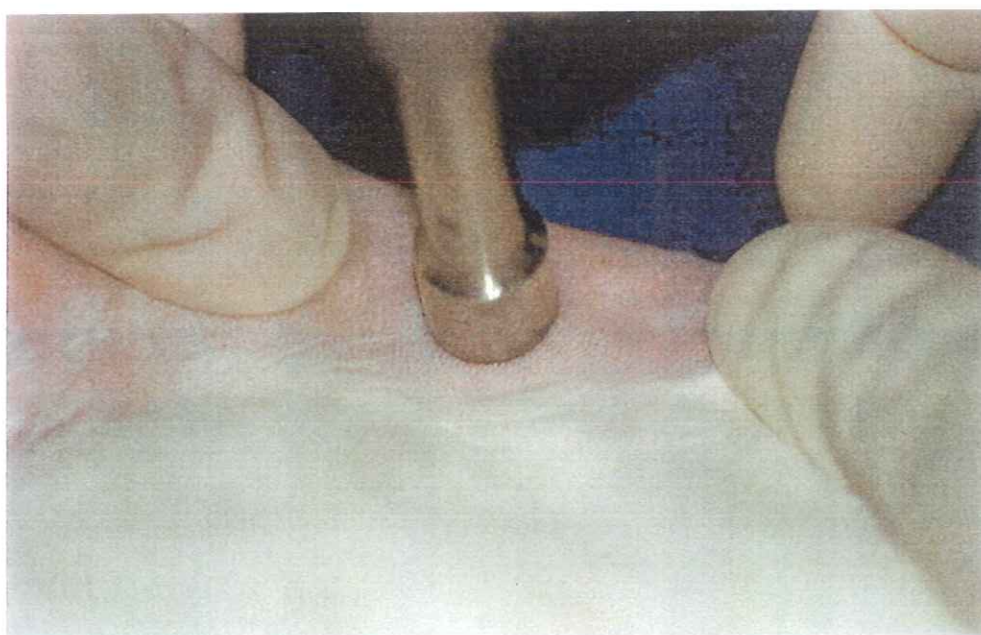


Figura 3- Dobra realizada na pele do dorso do coelho e realização das lesões

Eram feitas três lesões (figura 4) em cada animal, distando 5 cm em linha uma da outra, uma delas sendo submetida ao tratamento efetivo com o ultra-som (subgrupo A), a outra a tratamento placebo (subgrupo B) e a terceira era deixada intocada (subgrupo C). A ordem (proximal, média e distal) em que cada uma das lesões era designada para um dos subgrupos era mudada de animal para animal. Produzidas as lesões, elas eram cobertas com gaze estéril e o animal retornava à gaiola para recuperação da anestesia, o que ocorria em cerca de 20 minutos. Todo o procedimento não durava mais que 40 minutos.

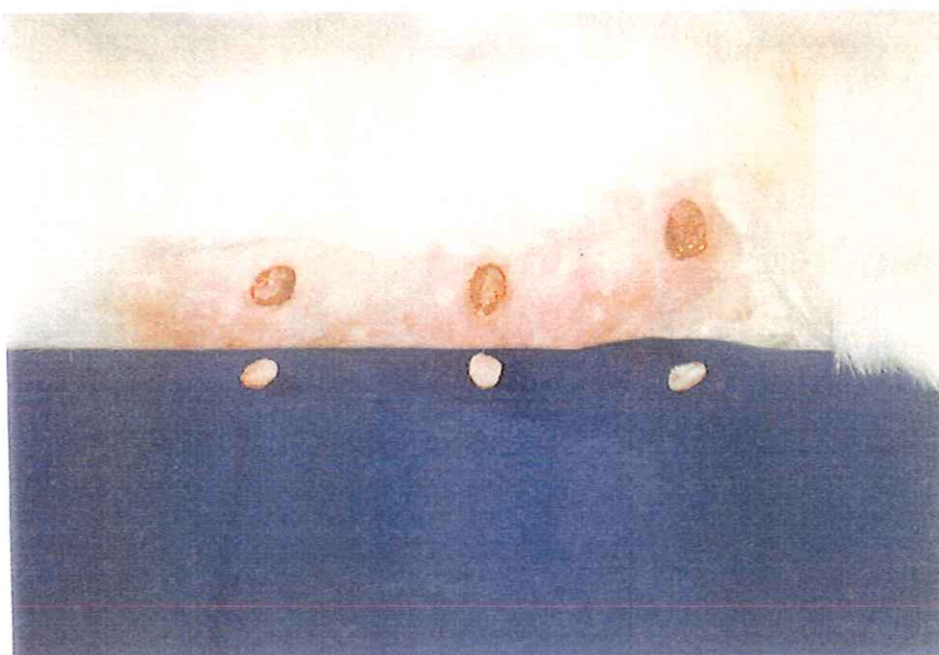


Figura 4- lesões realizadas no dorso do coelho, com dimensão de 1cm de diâmetro cada lesão.

2.3. EQUIPAMENTO DE ULTRA-SOM

Foi empregado um equipamento de ultra-som portátil de uso clínico (SONACEL PLUS, modelo S.1050[®], Bioset-Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda.). O cabeçote para a aplicação da irradiação foi confeccionado com

dimensão de 5 mm de diâmetro, facilitando o acoplamento com a área a ser tratada. A frequência de pulso utilizada foi de 3 MHz. Para o modo pulsado, o equipamento trabalha com frequência de repetição de pulso de 100 Hz (figuras 5 e 6).

O equipamento foi devidamente calibrado antes de sua utilização e duas vezes no transcorrer do experimento, no Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da USP, com dosímetro de precisão (ULTRASONIC POWER METER, modelo UPM-DT-1).

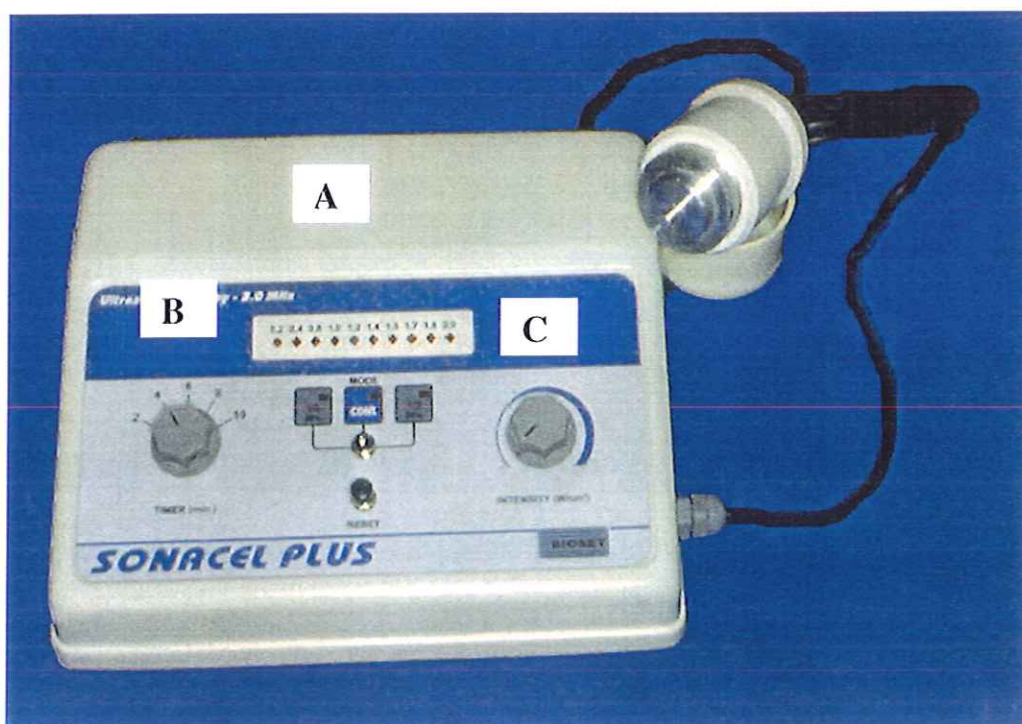


Figura 5 - Equipamento de ultra-som clínico utilizado para o tratamento, mostrando: (A) indicador de dose, (B) controle tempo e (C) controle da intensidade



Figura 6 – Cabeçote do ultra-som, mostrando área reduzida.

2.4. TRATAMENTO

Os animais foram divididos em dois grupos conforme o tratamento aplicado. No primeiro (Grupo 1), o ultra-som foi aplicado diariamente, em sessões de seis minutos de duração, com intensidade de $0,8 \text{ Wcm}^2$ (SATA), ciclo de trabalho de 2:8 e frequência de 3 MHz. No segundo (Grupo 2), o ultra-som foi aplicado com intensidade de $0,4 \text{ Wcm}^2$ mesmo equipamento.

O tratamento era iniciado 24 horas após a produção da lesão, sendo a aplicação realizada de forma direta, com a utilização de um gel para o acoplamento do cabeçote. A aplicação era feita com movimentos circulares ao redor da lesão e não sobre ela, por sete dias consecutivos, seguindo o mesmo critério para o grupo placebo (figura 7). Como em cada animal havia três lesões cutâneas, o tratamento

efetivo era aplicado apenas em uma (subgrupo A); das outras duas, uma recebia tratamento placebo (subgrupo B, aplicação do cabeçote, com o aparelho desligado) e a outra não recebia qualquer tratamento (subgrupo C). No 8º dia pós-operatório os animais eram sacrificados e a pele contendo cada uma das lesões era dissecada.

Durante a aplicação do tratamento, os animais foram posicionados e mantidos na posição com o auxílio de outra pessoa, impossibilitando movimentos que pudessem interromper a aplicação.

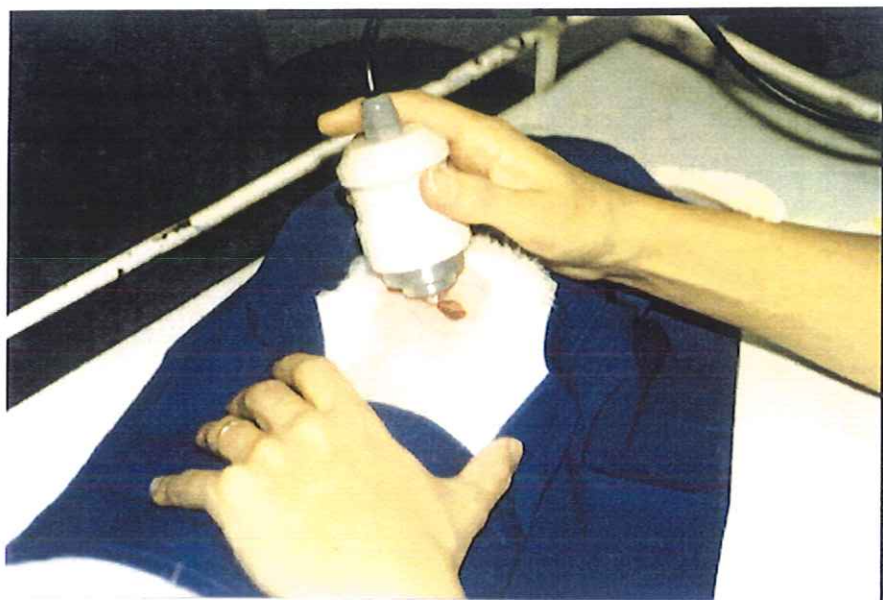


Figura 7- Tratamento com ultra-som realizado no dorso do coelho

2.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após o sacrifício dos animais, a pele era cuidadosamente dissecada, cada lesão em separado, ressecando-se um quadrado de cerca de 3 cm de lado contendo a lesão no meio, que era fixado a uma placa de papel-cartão com

pontos passados nos quatro cantos, sem alterar a região lesada. Isso feito, eram mergulhadas em solução de formol à 10% em volume suficiente, para fixação, e cada peça em seguida era preparada da maneira habitual para o estudo histológico.

Foram obtidos cortes longitudinais e transversais da lesão, de 5 μ m de espessura, corados pelos métodos da Hematoxilina de Harris/Eosina-Floxina e Tricrômico de Gomori, e montados em lâmina-lamínula.

As lâminas foram analisadas ao microscópio de luz, registrando-se os eventos mais significativos, como a presença de infiltrado inflamatório, infecção, necrose, ulceração, reação de corpo estranho, fibrose e reepitelização, que foram os parâmetros selecionados para comparação entre os grupos e subgrupos.

2.6. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos na histologia foram analisados de maneira descritiva, procurando-se buscar o seu significado clínico. Procurou-se também avaliar a intensidade de cada evento, pela atribuição de cruces, em graus que variavam de ausência (-), presença leve (+), presença moderada (++) e presença acentuada (+++), de modo a possibilitar sua semi-quantificação e posterior análise estatística. Para a análise estatística, os valores em cruces foram convertidos em números, ou seja, 0 para a ausência (-), 1 para uma cruz (+), 2 para duas cruces (++) e 3 para três cruces (+++).

A análise estatística dos dados foi feita pelo teste Z, que foi calculado para que se pudesse concluir sobre a significância da diferença entre as proporções amostrais de ocorrência de cada um dos eventos observados nos diferentes grupos (irradiado com o ultra-som, placebo e controle), para cada

variância analisada. Justifica-se o uso desse teste por se tratarem de proporções amostrais observadas em grupos diferentes.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISE DESCRITIVA

Foram observadas, então, as ocorrências celulares e reações epidérmicas supramencionadas, tais como fibrose celular, infiltrado inflamatório e reepitelização. O aspecto macroscópico das lesões dos grupos 1 e 2, podem ser observados nas figuras 8, 9 e 10. De modo geral, todos os animais de ambos os grupos apresentavam, em todos os subgrupos, todos os parâmetros analisados, diferindo apenas no que tange à intensidade.

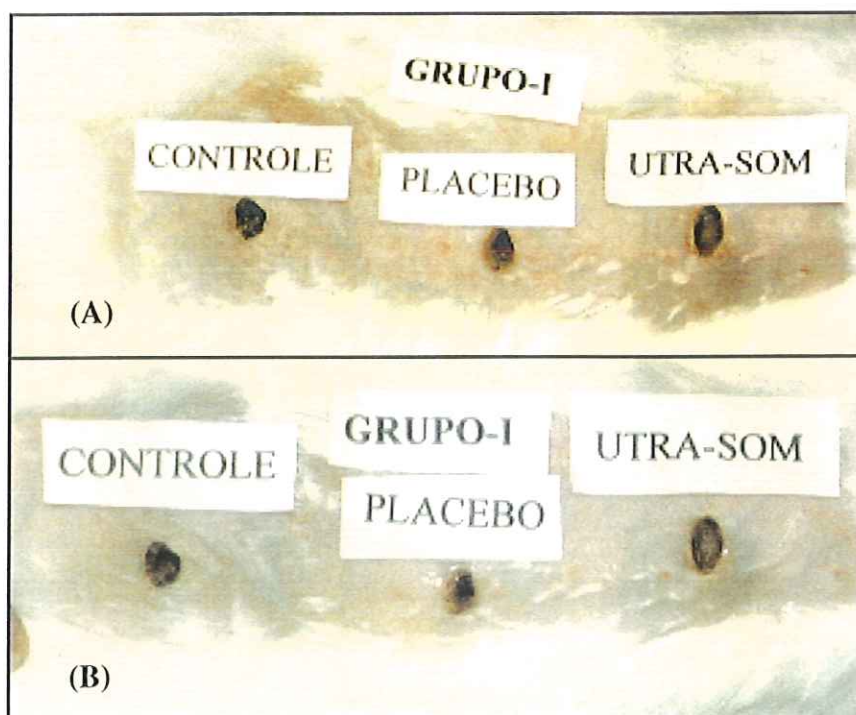


Figura 8 - Aspecto macroscópico das lesões do grupo 1
(A) Primeiro dia pós operatório (B) sétimo dia pós operatório

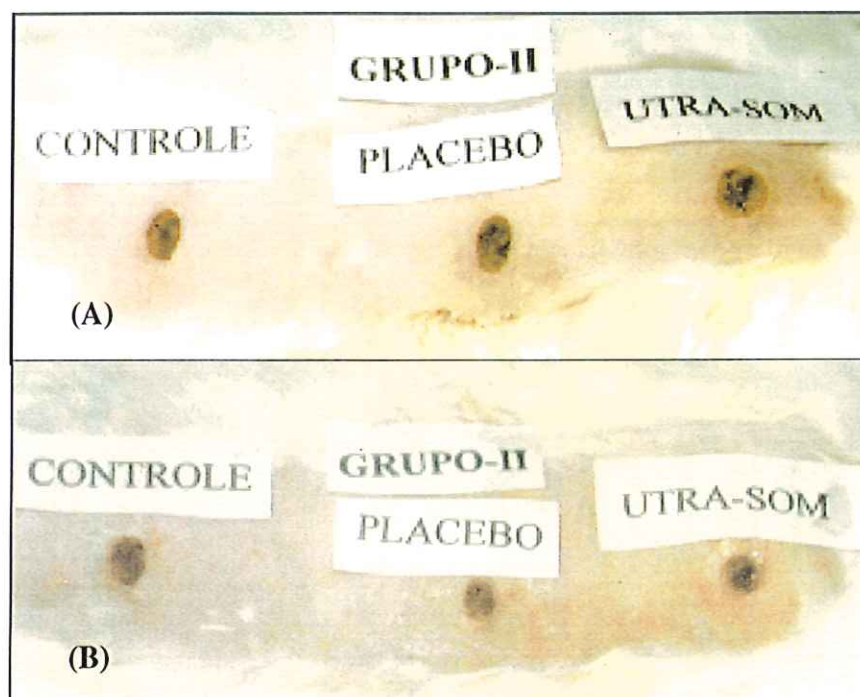


Figura 9 - Aspecto macroscópico das lesões do grupo 2
(A) Primeiro dia pós operatório (B) sétimo dia pós operatório

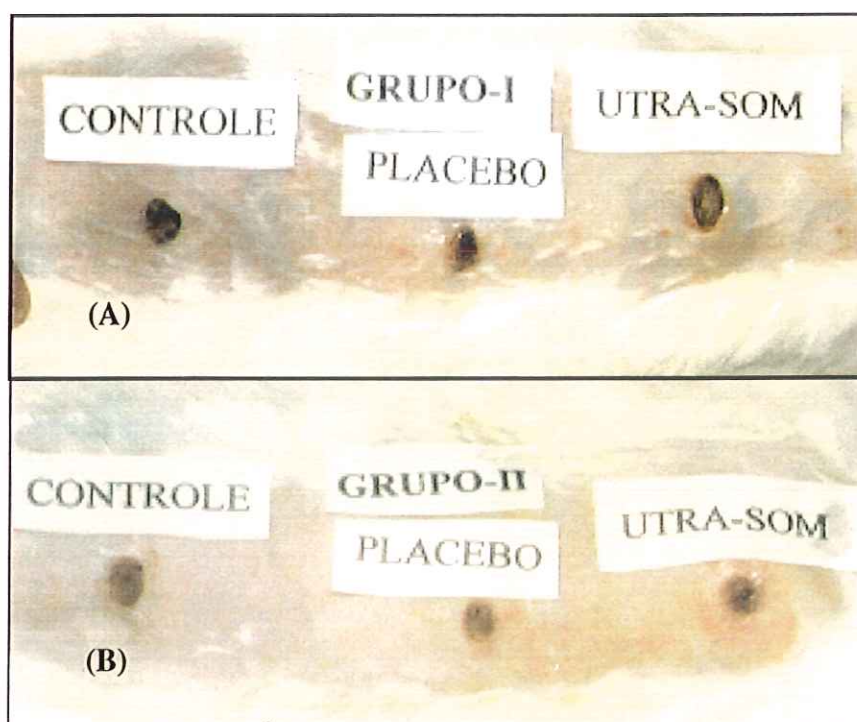


Figura 10 - Comparação do aspecto macroscópico das lesões no sétimo dia pós operatório: (A) Grupo 1 (B) grupo 2

3.1.1. Grupo 1 (0,8 W/cm²)

A análise comparativa dos parâmetros entre os subgrupos A (irradiado), B (placebo) e C (controle) mostrou:

- Fibrose: foi similar nos três subgrupos, com alguns animais apresentando infiltrado inflamatório mononuclear e infiltrado inflamatório misto (figura 11).
- Infiltrado inflamatório: foi mais evidente nos subgrupos B e C, com alguns animais apresentando infiltrado mononuclear com eosinófilos, processo inflamatório misto com eosinófilos e processo exsudativo neutrofilico e necrótico, dados que podem sugerir que, na dosagem utilizada, o ultra-som pode ter contribuído para diminuir o processo inflamatório no subgrupo (figura 12).
- Reepitelização celular: esteve presente apenas nos subgrupos A e B, o que pode significar uma ação benéfica do ultra-som no subgrupo A e do efeito placebo no subgrupo B; de fato, no subgrupo B o atrito do cabeçote promoveu massagem local, com hiperemia visível durante a aplicação.

3.1.2. Grupo 2 (0,4 W/cm²)

Na comparação entre os subgrupos A (ultra-som), B (placebo) e C (controle), observou-se:

- Fibrose: foi similar em todos os subgrupos, com as mesmas características celulares do Grupo 1, ou seja, com alguns animais apresentando infiltrado inflamatório mononuclear e infiltrado inflamatório misto (figura 13).

- Infiltrado inflamatório: mostrou-se similar entre os subgrupos, com predomínio nos subgrupos A e B e com as mesmas características celular do Grupo 1, com alguns animais apresentando infiltrado inflamatório mononuclear com eosinófilos, processo inflamatório misto com eosinófilos e processo inflamatório exsudativo neutrófilico e necrótico. Estes dados podem sugerir que, na dosagem utilizada, o ultra-som não promoveu a diminuição do infiltrado inflamatório no subgrupo A, o mesmo tendo ocorrido no subgrupo B (placebo).

- Reepitelização celular: foi observada nos três subgrupos, com predomínio dos subgrupos A e B, o que pode sugerir tanto a ação do ultra-som na aceleração da reepitelização no primeiro, como a ação do efeito placebo no segundo, de modo semelhante ao observado no Grupo 1 (figura 14).

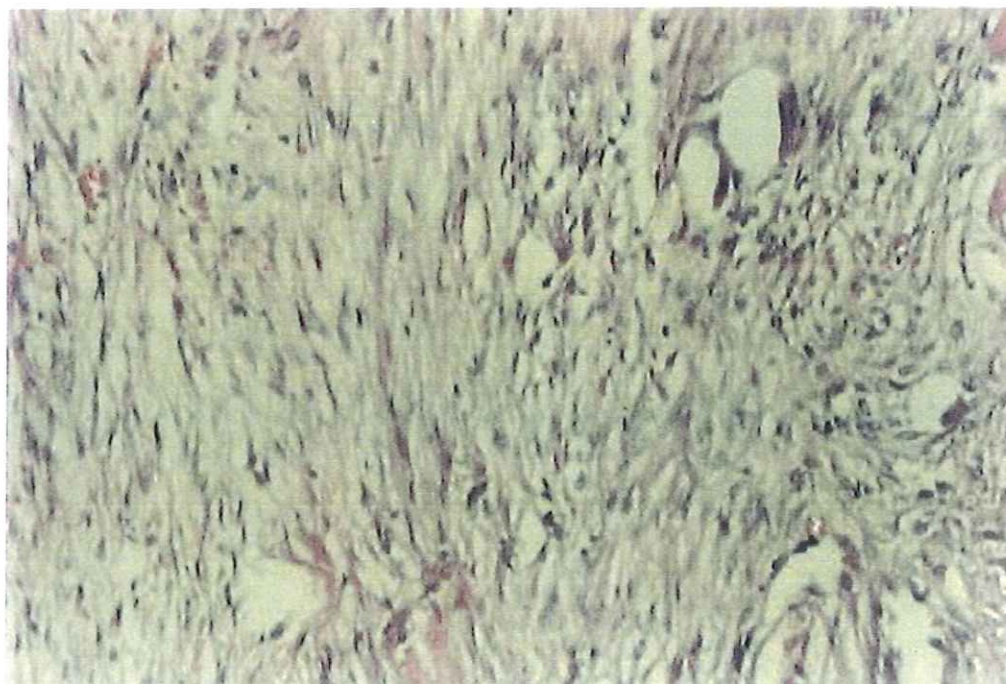


Figura 11- Microscopia da epiderme de coelho, corada pela Hematoxilina-Eosina. Corte transversal, mostrando fibrose de moderada intensidade. Aumento 20 X.. (Animal grupo 1)



Figura 12 - Microscopia da epiderme de coelho, corada pela Hematoxilina-Eosina. Corte transversal mostrando epiderme integra e moderada fibrose, com discreto infiltrado inflamatório. Aumento 10X. (Animal grupo 1)

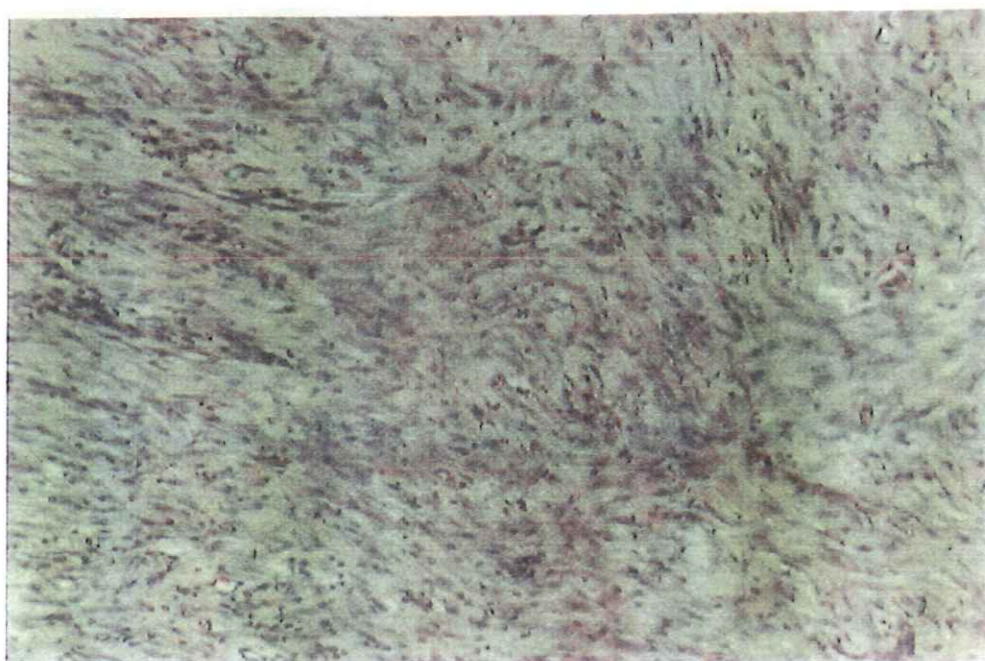


Figura 13- Microscopia da epiderme de coelho, corada pela Hematoxilina-Eosina. Corte transversal, mostrando moderado infiltrado inflamatório e discreta fibrose. Aumento de 20X. (Animal do grupo 2)



Figura 14- Microscopia da epiderme de coelho, corada pela Hematoxilina-Eosina. Corte transversal, mostrando epiderme sem alteração histológica significativa. Aumento de 10X. (Animal do grupo 2)

3.1.3. Comparação entre os Grupos 1 e 2

- Infiltrado inflamatório: presente nos subgrupos A e C do Grupo 1, e A e B do Grupo 2, provavelmente indicando que as diferentes dosagens empregadas tiveram o mesmo efeito nos subgrupos A (ultra-som).
- Fibrose: similar entre os grupos.
- Reepitelização: presente nos subgrupos A e B dos Grupos 1 e 2, provavelmente mostrando que, em ambos os grupos, houve um efeito benéfico tanto do ultra-som como do placebo na reepitelização celular.

3.2. PROPORÇÃO DE OCORRÊNCIA (entre os grupos e subgrupos)

No teste de análise da proporção de ocorrências, foram avaliados os resultados das amostras de cada subgrupo em cada grupo (anexos A, B, C)

3.2.1 Infiltrado inflamatório

A análise Grupo1 mostrou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos A1 (ultra-som) e o subgrupo de controle (C1), este último tendo apresentado acentuado infiltrado inflamatório. Na comparação entre os Grupos 1 e 2, houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos A1 e A2, infiltrado inflamatório mais acentuado tendo sido observado no segundo (figura 15 e anexo A).

3.2.2 Fibrose

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de ambos os grupos, porém a análise entre os Grupos 1 e 2 mostrou diferença estatisticamente significativa na quantidade de fibrose encontrada, maior no primeiro, com o tratamento de ultra-som (figura 16 e anexo B).

3.2.3 Reepitelização

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de ambos os grupos e entre os Grupos 1 e 2, embora a observação dos números obtidos mostre que a reepitelização foi maior no grupo A2 (figura 17 e anexo C).

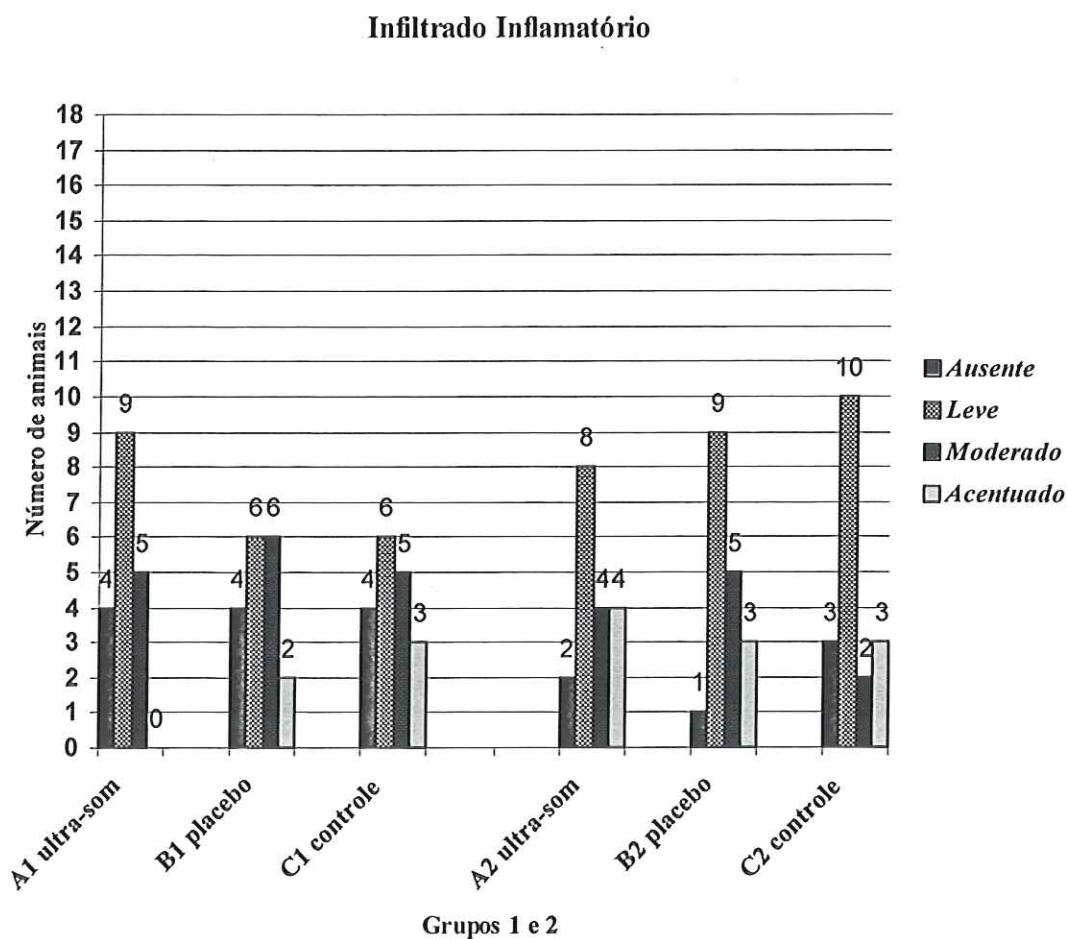


Figura 15 – Histograma mostrando o comportamento do infiltrado inflamatório nos grupos.

Os resultados são expressos pela ausência, presença leve, moderada e acentuada.

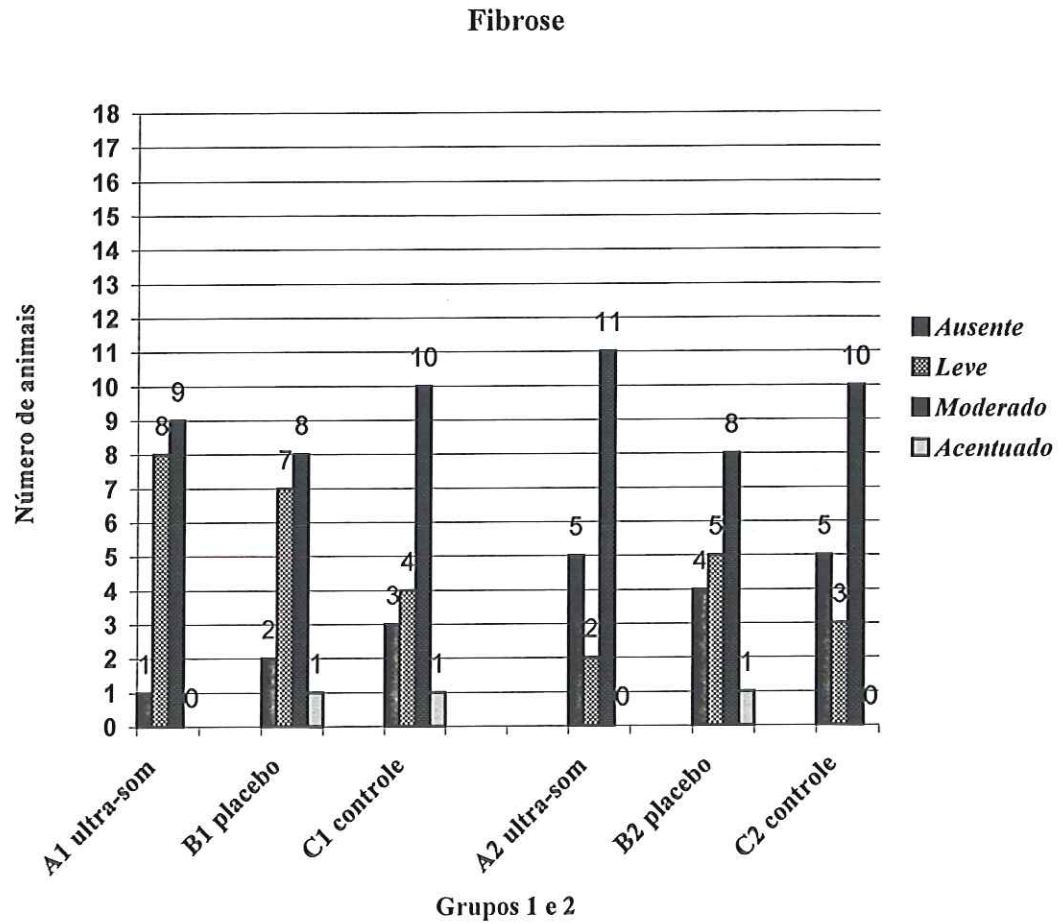


Figura 16 – Histograma mostrando o comportamento da fibrose nos grupos. Os resultados são expressos pela ausência, presença leve, moderada e acentuada.

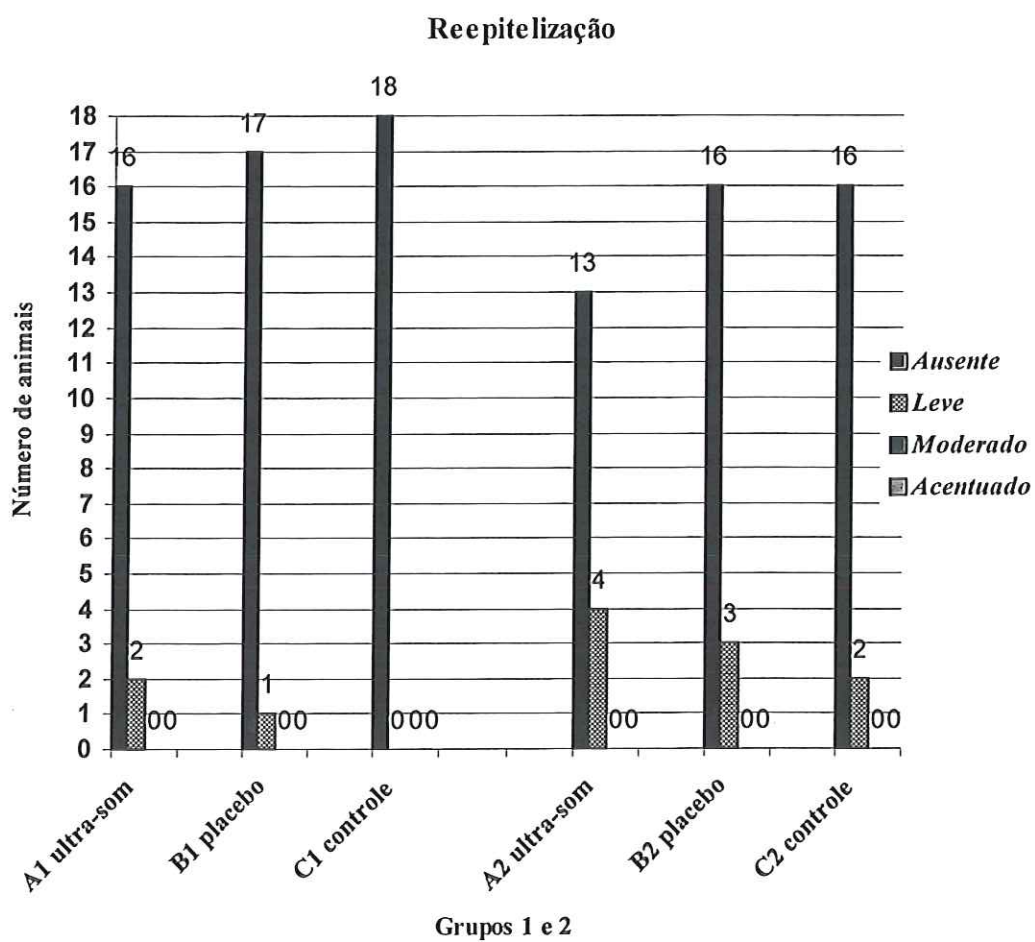


Figura 17 – Histograma mostrando o comportamento da reepitelização nos grupos. Os resultados são expressos pela ausência, presença leve, moderada e acentuada.

4-DISCUSSÃO

O ultra-som é um recurso muito utilizado, tanto na área médica, principalmente para diagnóstico, como na reabilitação, sendo o mais utilizado para reparação dos tecidos moles (DYSON, 1987). No que se refere ao tratamento de feridas experimentais, podem ser encontrados na literatura resultados positivos e negativos (RIET et al., 1996). Trabalhos que utilizam o ultra-som para promover a reparação tecidual, como os de (DYSON et al., 1968, 1978) e (YONG et al., 1990), demonstraram a proliferação de fibroblastos e células endoteliais, bem como a aceleração no processo regenerativo.

O interesse do presente trabalho foi avaliar a cicatrização tecidual em feridas de coelhos, observando as ocorrências celulares, após o tratamento com ultra-som terapêutico, em comparação com feridas não tratadas.

O coelho foi escolhido como modelo experimental, por ser um animal de fácil manuseio e manutenção, sendo também de dimensões adequadas à produção das lesões planejadas e ao tratamento com o ultra-som. As lesões foram realizadas no dorso do coelho, por ser uma região relativamente protegida de contaminação, pelo menor contato com fezes e com a saliva do animal, o que diminuía o risco de infecção. Apesar disso, seis coelhos foram excluídos do trabalho por apresentarem infecção.

Uma dificuldade inesperada foi a grande mobilidade da pele do coelho, no plano entre a derme e a camada fascial e muscular, quase impossibilitando sua estabilização para que as lesões fossem produzidas. O artifício de fazer uma prega sobre uma superfície dura deu bons resultados, facilitando o uso do aparelho confeccionado com o fim de remover um segmento cutâneo padronizado (*punch*).

A aplicação do tratamento com o ultra-som não foi, em si, problemática. O aparelho utilizado é de emprego rotineiro na prática clínica, demandando apenas a adaptação do cabeçote, para aplicação em pequenas áreas. Para evitar erros na aplicação, o aparelho foi calibrado e submetido à dosimetria antes do início do trabalho e no seu decorrer, cuidado indispensável para assegurar a correta dosagem de aplicação (LLOYD & EVANS, 1988). De fato, as calibrações intermediárias confirmaram que não havia ocorrido alteração na dosagem liberada pelo aparelho.

O gel foi utilizado como agente acoplador para evitar a interposição de ar entre o transdutor e o tecido, o que acarretaria perda de pelo menos uma parte da dose aplicada, conforme salientam DOCKER (1987) e MCDIARMID (1987), e para permitir o deslizamento do cabeçote na superfície da pele. Aqui também, a confecção do cabeçote com 5 mm de diâmetro favoreceu em muito o acoplamento com a região tratada.

Alguns estudos relatam que a ação do ultra-som no reparo tecidual ocorre principalmente com a dosagem entre 0,1 a 1,0 W/cm², no modo pulsado, devido ao menor efeito térmico (DYSON et al., 1968; HAAR, 1999; MCDIARMID, 1987). Optou-se aqui por realizar o tratamento com duas doses diferentes (0,8 W/cm² e 0,4 W/cm², (SATA)), exatamente para avaliar se a dosagem é um fator importante

na determinação dos resultados. O modo pulsado foi o preferido para minimizar os efeitos térmicos do ultra-som, indesejáveis na fase aguda do reparo tecidual (HAAR, 1987, 1999).

A aplicação do ultra-som foi iniciada após 24 horas e realizado durante os primeiros sete dias após a produção da lesão, com o objetivo de interferir justamente nos estágios iniciais do processo reparador, na sua fase inflamatória aguda, conforme recomendaram HART (1998), DYSON (1990) e YOUNG & DYSON (1990). Já o tempo de aplicação foi de seis minutos, por corresponder ao que é empregado na prática clínica.

É interessante frisar que o ultra-som tem sido empregado no tratamento de úlceras varicosas (DYSON et al., 1976), que apresentam significativa melhora, macroscopicamente detectável, ao tratamento por um período de quatro semanas. No presente trabalho, o período de apenas sete dias consecutivos foi preferido, abrindo-se mão do estudo da influência do ultra-som sobre o processo de reparo tardio.

Na análise descritiva das alterações celulares, observou-se pouca variação nos três subgrupos (tratado, placebo e controle) do Grupo 1 ($0,8 \text{ W/cm}^2$). No subgrupo tratado não houve alteração na formação de fibrose, mas sim diminuição do infiltrado inflamatório. Na análise semiquantitativa, quando aplicado o teste estatístico, nenhuma destas alterações foram significantes.

Para o Grupo 2 ($0,4 \text{ W/cm}^2$), também observou-se uma variação mínima das células presentes, nos três subgrupos (tratado, placebo e controle), sempre com alterações mais marcantes no subgrupo tratado com o ultra-som. Apesar desse predomínio, os dados demonstram que a utilização do ultra-som na dosagem

mais baixa não interferiu no processo de reparo tecidual, pois as alterações observadas não foram significantes do ponto de vista estatístico.

Após analisar os efeitos da aplicação do ultra-som em lesões produzidas nas orelhas de coelhos, DYSON et al., (1968) relataram que os melhores resultados foram obtidos com as doses entre 0,1 e 1,0 W/cm². No presente trabalho, a dose mais efetiva foi de 0,8W/cm², embora algumas alterações também tivessem sido produzidas pela dose mais baixa; de qualquer modo, ambas se encontram dentro da faixa determinada por aqueles autores.

Quando os resultados observados no grupo placebo foram similares aos do grupo tratado com o ultra-som, a interpretação dada foi que o efeito de massagem gerado pelo cabeçote do ultra-som promove uma hiperemia durante a aplicação, que é inclusive visível, assim gerando os efeitos benéficos, conforme relataram TASKAN et al., (1996).

A análise estatística mostrou que houve diferenças significantes entre os grupos, para infiltrado inflamatório, que foi mais evidentes no Grupo 2 (0,4 W/cm²), e fibrose que foi maior no Grupo 1 (0,8 W/cm²).

Já no que se refere à reepitelização, não houve diferenças significantes entre os grupos, mas a análise dos resultados absolutos mostra que esse fenômeno foi mais intenso no Grupo 2, indicando que as menores intensidades de aplicação podem ser mais benéficas. FRENKEL et al.,(1999) relatam que as intensidades mais elevadas promovem um aumento da temperatura, a qual pode levar a alterações teciduais irreversíveis, com a produção de falhas na superfície celular e dispersão dos componentes intracelulares, tais como segmentos da membrana celular, organelas e fibras intracelulares.

5. CONCLUSÕES

Os achados obtidos neste trabalho permitem concluir que a irradiação com o ultra-som pode induzir alterações na cicatrização de feridas cutâneas de coelhos, com efeitos benéficos (reepitelização) mais acentuados com a utilização de menor dosagem (0,4 W/cm², SATA).

Anexo A - Tabela demonstrando resultados numéricos e estatístico da análise histológica de cada grupo para infiltrado inflamatório

INFILTRADO INFLAMATÓRIO	A1 X B1	A1 X C1	B1 X C1
Ausente	4X4	4x4	4x4
Leve	9X6 p=0,16 ns	9x6 p=0,16 ns	6x6
Moderado	5x6 p=0,36 ns	5x5	6x5 p=0,36 ns
Acentuado	0x2 p=0,072 ns	0x3 p=0,035 *	2x3 p=0,15 ns
INFILTRADO INFLAMATÓRIO	A2 X B2	A2 X C2	B2 X C2
Ausente	2x1 p=0,27 ns	2x3 p=0,32 ns	1x3 p=0,14 ns
Leve	8x9 p=0,37 ns	8x10 p=0,27 ns	9x10 p=0,37 ns
Moderado	4x5 p=0,35 ns	4x2 p=0,19 ns	5x2 p=0,10 ns
Acentuado	4x3 p=0,37 ns	4x3 p=0,37 ns	3x3
INFILTRADO INFLAMATÓRIO	A1 X A2	B1 X B2	C1 X C2
Ausente	4x2 p=0,19 ns	4x1 p=0,074 ns	4x3 p=0,34 ns
Leve	9x8 p=0,37 ns	6x9 p=0,16 ns	6x10 p=0,09 ns
Moderado	5x3 p=0,35 ns	6x5 p=0,36 ns	5x2 p=0,10 ns
Acentuado	0x4 p=0,035 *	2x3 p=0,32 ns	3x3

(*) significante (**) muito significante

Anexo B - Tabela demonstrando resultados numéricos e estatístico da análise histológica de cada grupo para fibrose

FIBROSE	A1 X B1	A1 X C1	B1 X C1
Ausente	1x2 p=0,27 ns	1x3 p=0,14 ns	2x3 p=0,32 ns
Leve	8x7 p=0,37 ns	8x4 p=0,078 ns	7x4 p=0,18 ns
Moderado	9x8 p=0,37 ns	9x10 p=0,37 ns	8x10 p=0,27 ns
Acentuado	0x1 p=0,15 ns	0x1 p=0,15 ns	1x1
FIBROSE	A2 X B2	A2 X C2	B2 X C2
Ausente	5x4 p=0,35 ns	5x5	4x5 p=0,35 ns
Leve	2x5 p=0,10 ns	2x3 p=0,32 ns	5x3 p=0,21 ns
Moderado	11x8 p=0,16 ns	11x10 p=0,37 ns	8x10 p=0,25 ns
Acentuado	0x1 p=0,15 ns	0x0	1x0 p=0,15 ns
FIBROSE	A1 X A2	B1 X B2	C1 X C2
Ausente	1x5 p=0,037 *	2x4 p=0,19 ns	3x5 p=0,21 ns
Leve	8x2 p=0,017 *	7x5 p=0,24 ns	4x3 p=0,34 ns
Moderado	9x11 p=0,25 ns	8x8	10x10
Acentuado	0x0	1x1	1x1 p=0,15 ns

(*) significante

(**) muito significante

Anexo C - Tabela demonstrando resultados numéricos e estatístico da análise histológica de cada grupo para reepitelização

REEPITELI ZAÇÃO	A1 X B1	A1 X C1	B1 X C1
Ausente	16X17 p=0,27 ns	16x18 p=0,07 ns	17x18 p=0,16 ns
Leve	2x1 p=0,27 ns	2x0 p=0,27 ns	1x0 p=0,27 ns
Moderado	0x0	0x0	0x0
Acentuado	0x0	0x0	0x0
REEPITELIZA- ÇÃO	A2 X B2	A2 X C2	B2 X C2
Ausente	14x15 p=0,34 ns	14x16 p=0,19 ns	15x16 p=0,31 ns
Leve	4x3 p=0,34 ns	3x2 p=0,19 ns	3x2 p=0,19 ns
Moderado	0x0	0x0	0x0
Acentuado	0x0	0x0	0x0
REEPITELIZA- ÇÃO	A1 X A2	B1 X B2	C1 X C2
Ausente	16x15 p=0,19 ns	17x15 p=0,15 ns	18x16 p=0,07 ns
Leve	2x4 p=0,19 ns	1x3 p=0,14 ns	0x2 p=0,27 ns
Moderado	0x0	0x0	0x0
Acentuado	0x0	0x0	0x0

(*) significante

(**) muito significante

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BINDER, A.; HODGE, G.; GREENWOOD, A.M.; HAZLEMAN, B.L.; PAGE THOMAS, D.P. (1985). Is therapeutic ultrasound effective in treating soft tissue lesion. *British Medical Journal*, v.290, p.512-14, Feb.
- CAMBIER DC.;VANDERSTRAETEN GG. (1997). Failure of therapeutic ultrasound in healing burn injuries. *Burns*, v. 23, n. 3, p. 248-49, May.
- DOCKER, M.F. (1987). A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.73, n.4, p.154-55, Apr.
- DYSON, M.; POND, J.B.; JOSEPH, J.; WARWICK, R. (1968). The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. *Clin. Sci.*, v.35, p.273-85.
- DYSON, M; FRANKS, C.; SUCKLING, J. (1976). Stimulation of healing of varicose ulcers by ultrasound. *Ultrasonics*, v.14, p. 236.
- DYSON, M. (1987). Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.73, n.3, p.116-20, Mar.
- DYSON, M. (1990). Role of ultrasound in wound healing. In Kloth, L. C.; and Miller, K. H. *Wound healing*, p. 259-85.
- FONSECA, J.S.; MARTINS, G.A. (1992). *Curso de Estatística*. São Paulo, Atlas. 3^a edição

- FRENKEL, V.; KIMMEL, E.; IGER, Y. (1999). Ultrasound- induced cavitation damage to external epithelia of fish skin. *Ultrasound in med. & biol.*, v. 25, n. 8, p. 1295-1303, Feb.
- GUTMANN, A.Z. (1991). *Fisioterapia Atual*. Pancast Editora Com. E Repres. Ltda. P, 207-212: Ultrasound
- HAAR, G.; DANIELS, S.; EASTAUGH, K.C.; HILL, C.R. (1982). Ultrasonically induced cavitation in vivo. *Br. J. Cancer*, v.45, suppl. V, p.151-55.
- HAAR, G. (1987). Basic physics of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.73, n.3, p.110-13, Mar.
- HAAR, G. (1999). Therapeutic ultrasound. *European Journal of Ultrasound*, v. 9, p.3-9, Mar.
- HART, J. (1998). The use of ultrasound therapy in wound healing. *Journal of wound care*, v. 7, n. 1, Jan.
- HILL, C.R. (1968). The possibility of hazard in medical and industrial applications of ultrasound. *The British Journal of Radiology*, v.41, p.561-69.
- HOOGLAND, R. (1986). *Manual de terapia ultrasônica*. ENRAF NONIUS
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1985). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. Cap. 18, p.363-75: Pele e anexos.
- KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. (1990). A review of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.76, n.10, p.593-00, Oct

KITCHEN,S.; YOUNG, S.(1998). Reparo dos tecidos. In KITCHEN, S et al. Eletroterapia de Clayton .Manole, São Paulo. Cap.3, p. 46-58.

LLOYD, J.J.; EVANS, J.A. (1988), A calibration Survey of physiotherapy ultrasound equipment in north wales. *Physiotherapy*, v.74, n.2, p.56-61, Febr.

MAXWELL, L. (1992). Therapeutic ultrasound: Its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. *Physiotherapy*, v.78, n.6, p.421-26.

McDIARMID, T.; BURNS, P.N. (1987). Clinical applications of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.73, n.4, p.155-62, Apr.

RIET, G.; KESSELS, A. G.; KNIPSCHILD, P. (1996). A randomized clinical trial of ultrasound in the treatment of pressure ulcers. *Physical Therapy*, v. 76, n. 12, Dec.

STEVENSON, J.H.; PANG, C.Y.; LINDSAY, W.K.; ZUKER, R.M. (1986). Functional, mechanical, and biochemical assessment of ultrasound therapy on tendon healing in the chicken toe. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.77, n.6, p.965-72, Jun.

TASKAN, I.; ÖZYAZGAN, İ.; MUSTAFA, T.; KARDAS, Y.; BALKANLI,S. (1997). A comparative study of the effect f ultrasound and electrostimulation on wound healing in rats. *Plastic and Reconstructive Sugery*, v.100, n.4, p. 966-72, Setp.

TRIOLA, M. (1999). Introdução à estatística . LTC, Rio de Janeiro.

WILLIAMS, R. (1987). Production and transmission of ultrasound. *Physiotherapy*, v.73, n.3, p.113-16, Mar.

YOUNG, S. R.; DYSON. M.(1989). Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics*, v. 28, p.175-9, May.

YOUNG, S. (1998). Terapia por Ultra Som. In KITCHEN, S et al. *Eletroterapia de Clayton*. Manole, São Paulo, Cap. 15, p.235-58.