

Mensuração de área de cicatrização por planimetria após aplicação do ultra-som de baixa intensidade em pele de rato

Measurement of healing area using planimetry after applying low-intensity ultrasound to the skin of rats

Ferreira AS¹, Barbieri CH¹, Mazzer N¹, Campos AD², Mendonça AC¹

Resumo

Contextualização: A planimetria é um método utilizado para avaliar a evolução da cicatrização de feridas. A planimetria computacional é um método ainda em experimentação, mas cujas vantagens têm sido demonstradas em várias investigações. **Objetivos:** Avaliar os efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização de lesão cutânea produzida na região dorsal de ratos, por meio da planimetria computacional. **Materiais e métodos:** Utilizou-se 60 ratos machos Wistar (peso médio de 300g) divididos em dois grupos com 30 animais cada, de acordo com o tratamento: 1) irradiação simulada (controle); 2) irradiação efetiva (Frequência fundamental de 1,5MHz, frequência de repetição de pulsos de 1KHz, largura de pulso de 200µs, intensidade de 30mW/cm² SATA, dez minutos de aplicação em dias alternados). Cada grupo foi subdividido em três grupos, de acordo com o período de irradiação ultra-sônica, de três, sete e 14 dias, respectivamente, e a cicatrização foi avaliada por meio da planimetria, um decalque da lesão sendo obtido em papel especial, digitalizado e medido ao computador por meio de um programa gráfico. Análise estatística pelo método não-paramétrico de Mann-Whitney. **Resultados:** Houve aumento significativo ($p < 0,05$) da área cicatrizada no grupo 2 (141,88±18,50mm²) em relação ao grupo 1 (117,38±15,14mm²), no 14º dia. Não houve diferenças significantes entre os grupos nos demais períodos. **Conclusões:** O ultra-som pulsado de baixa intensidade estimula a cicatrização cutânea por segunda intenção em condições experimentais. A planimetria computacional mostrou-se um recurso de baixo custo, fácil manuseio e de aplicabilidade clínica.

Palavras-chave: planimetria computacional; lesões cutâneas; ultra-som de baixa intensidade; cicatrização.

Abstract

Background: Planimetry is a method used to evaluate the progression of skin wound healing. Computerized planimetry is still an experimental method, but its advantages have been demonstrated in several investigations. **Objective:** To evaluate the effects of low-intensity pulsed ultrasound on the healing of a skin lesion produced on the dorsal region of rats, by means of computerized planimetry. **Methods:** Sixty male Wistar rats of mean weight 300g were used. They were divided into two groups according to the treatment applied: 1) simulated irradiation (control); 2) effective irradiation (fundamental frequency 1.5MHz, pulse repetition frequency 1KHz, pulse width 200µs, SATA intensity 30mW/cm² and application for ten minutes on alternate days). Each group was divided into three subgroups according to the length of time for which ultrasound irradiation was applied of three, seven and 14 days, respectively, and healing was evaluated by means of planimetry; a tracing of the wound was obtained on special paper and this was digitized and measured by means of a graphing software. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney non-parametric method. **Results:** The healed area was significantly greater ($p < 0.05$) in group 2 (141.88±18.50mm²) than in group 1 (117.38±15.14mm²) on the 14th day. There were no significant differences between the subgroups for the other experimental periods. **Conclusions:** Low-intensity pulsed ultrasound irradiation stimulated secondary skin healing under these experimental conditions. Computerized planimetry was shown to be a low cost method that was easy to use and present clinical applicability.

Key words: computerized planimetry; skin injuries; low-intensity ultrasound; healing.

Recebido: 30/08/2006 – **Revisado:** 10/07/2007 – **Aceito:** 23/06/2008

¹ Programa de Pós-graduação em Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil

² Departamento de Medicina Social, USP

Trabalho realizado no Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina da USP Ribeirão Preto.

Correspondência para: Cláudio 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), Brasil, e-mail: chbarbie@fmrp.usp.br

Introdução

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

A contração da ferida é uma etapa importante do fechamento da lesão cutânea nos animais cujo tegumento está frouxamente conectado aos tecidos subjacentes, como os coelhos e ratos, raramente levando à perda da função desses tecidos. Entretanto, em humanos, uma contração demasiadamente pequena retarda o fechamento, permitindo sangramentos e infecções, ao passo que uma contração intensa pode levar a contraturas teciduais, com conseqüentes deformidade e disfunção. Todavia, isoladamente, a contração de uma ferida raramente é capaz de levar ao seu fechamento definitivo, o qual se deve principalmente à formação do tecido de granulação e à re-epitelização¹⁻³. A possibilidade de acelerar a cicatrização e o fechamento de lesões cutâneas, utilizando recursos químico-medicamentosos ou físicos, tem sido objeto de investigação de inúmeros pesquisadores.

A terapia ultra-sônica é uma modalidade terapêutica frequentemente utilizada na prática da fisioterapia. O ultra-som é uma forma de energia mecânica de alta frequência, em que a energia é transmitida pelas vibrações das moléculas do meio através do qual a onda está se propagando. É amplamente utilizado no tratamento de lesões de tecidos moles, podendo acelerar a reparação tecidual nas suas diferentes fases, sendo possível melhorar tanto a velocidade da cicatrização, quanto a qualidade do tecido cicatricial⁴⁻⁹. Age nas fases do mecanismo fisiológico (inflamação aguda, proliferação e remodelação) desde o seu início, no qual promove a liberação de histamina e de fatores de crescimento, pela degranulação de macrófagos, mastócitos e plaquetas. Os fibroblastos e as células endoteliais também podem ser afetados pelo ultra-som, aumentando a síntese de colágeno, o que confere maior resistência do tecido à tração^{5,9}.

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

do tecido envolvido, para maximizar a segurança e eficácia do tratamento. Por esse motivo, os equipamentos devem ser calibrados e testados periodicamente, para que os padrões de segurança sejam atendidos.

Os efeitos benéficos do ultra-som têm sido demonstrados sobre a cicatrização de diversos tecidos biológicos, como o osso¹⁰, o músculo^{11,12} e a pele^{13,14}; sobretudo à baixa intensidade, com o uso de equipamentos especificamente construídos com essa característica¹⁰ e no modo pulsado, o que minimiza o risco de lesões teciduais que podem ocorrer com as intensidades elevadas^{4,9}. Tais efeitos seriam de grande relevância, por exemplo, no tratamento de úlceras cutâneas crônicas, nas quais já tem sido demonstrado o aumento da velocidade de cicatrização, a diminuição do número de células inflamatórias e a melhora da qualidade do tecido neoformado, sobretudo em trabalhos de investigação clínica^{1,14,15}.

A evolução de uma lesão ou ferida cutânea e a eficácia de um determinado tratamento podem ser acompanhados e medidos a intervalos regulares por meio de vários métodos, até que haja o restabelecimento da continuidade da pele. A planimetria é um método de avaliação não invasiva, utilizado para feridas superficiais, sem fatores complicadores, que em geral existem nas lesões profundas; descreve apenas a superfície externa da ferida, sem oferecer qualquer indicação da qualidade do tecido de reparação subjacente^{3,16}.

O estudo da contração de feridas cutâneas pela planimetria seqüencial em ratos, aparentemente é uma metodologia simples e precisa dessa fase do processo cicatricial, sendo amplamente utilizada^{15,17,18}. Além do uso em investigações em animais, o método também tem sido aplicado em humanos, independente da morfologia da ferida^{1,14,19}.

No presente trabalho, propôs-se avaliar os efeitos da irradiação ultra-sônica de baixa intensidade sobre a cicatrização cutânea, em um modelo experimental de lesão cutânea de espessura total em ratos, pelo método da planimetria para a mensuração da área de lesão.

Materiais e métodos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP, protocolo nº 052/2004). Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP. Foram utilizados 60 ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso corpóreo variando entre 250 e 350g, provenientes do biotério central do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com cinco animais cada, sob condições ambientais adequadas (controle

da temperatura ambiente e aeração), recebendo água e ração-padrão do biotério à vontade. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (1 e 2) de 30 animais cada, conforme o tratamento realizado, sendo o grupo 1 de irradiação simulada (controle, com o equipamento desligado) e o grupo 2 de irradiação ultra-sônica efetiva. Em cada grupo, os animais foram distribuídos em subgrupos de dez animais cada (A, B e C), conforme o período de tratamento, de três, sete e 14 dias, respectivamente.

Procedimento operatório

Inicialmente, os animais foram anestesiados com uma injeção intra-peritoneal de uma dose única de pentobarbiturato de sódio (Nembutal®, Abbott, 60mg/kg). Em seguida, foi feita a tricotomia na região escapular direita; o animal foi posicionado na mesa operatória e foi feita a anti-sepsia do local operatório com solução alcoólica de iodo a 2%. Com o animal assim preparado, foi feita uma lesão cutânea por ressecção de uma área circular de 1cm de diâmetro da pele, utilizando um punch especialmente confeccionado para esse fim. Sendo a pele do rato muito elástica, foi necessário fazer uma dobra cutânea, que foi apoiada sobre a superfície dura da mesa operatória e que permitia a realização das lesões. Após o procedimento, os animais foram mantidos nas gaiolas coletivas.

Aplicação do ultra-som

O equipamento utilizado foi desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Engenharia de Materiais, Aeronáutica e Automobilística da (Escola de Engenharia de São Carlos-USP) para fins médicos e biológicos, e possui as seguintes características: frequência fundamental de 1,5MHz; modo pulsado com frequência de repetição de pulsos de 1KHz; largura de pulso de 200µs; intensidade de 30mW/cm² SATA; área de irradiação efetiva (ERA) de 22mm. O tempo de irradiação em cada sessão foi de dez minutos. Para a aplicação do ultra-som, os animais foram introduzidos em um dispositivo tipo armadilha, confeccionado em PVC, constante de um tubo sem saída de 4,5cm de diâmetro e dotado de perfurações para aeração e de uma janela lateral, onde ficava exposta a lesão. Desse modo, o animal permanecia imobilizado, sem necessidade de submetê-lo à força. O tratamento foi iniciado imediatamente após a produção da lesão e, a partir daí, em dias alternados, sendo que no subgrupo A foi repetido duas vezes, no subgrupo B, quatro vezes, e no subgrupo C, sete vezes, com aplicação direta do cabeçote de irradiação ultra-sônica sobre a lesão, que foi preparada como segue: primeiramente, a lesão foi profusamente banhada com solução fisiológica; depois, foi coberta com uma película de filme plástico (PVC) previamente

esterilizado e esticado sobre a superfície para não permitir a formação de bolhas de ar; em seguida, a película de PVC foi coberta com o hidrogel de acoplamento para o cabeçote do ultra-som. A irradiação era feita no modo estacionário, com o cabeçote permanecendo diretamente sobre a lesão por dez minutos. O mesmo procedimento foi realizado nos grupos 1 e 2, sendo com o equipamento desligado no grupo 1 (controle) e ligado no grupo 2 (irradiado).

Registro da área de lesão

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

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

Processamento das imagens pela visão computacional

As imagens digitalizadas (Figura 1A), com oito bits de escala de cinza, foram binarizadas, de modo a se obter o contorno da área da lesão (Figura 1B). A binarização pode ser entendida como a separação da região de interesse do restante da figura, chamado de fundo, com o que a imagem passa a ter somente dois níveis de cinza, sendo zero (preto) ou um (branco), caracterizando a região de interesse e o fundo, respectivamente. Por meio de operações morfológicas, a região interna do contorno (centro da lesão), caracterizada inicialmente como fundo, foi modificada, sendo preenchida de modo a pertencer à região de interesse (Figura 1C). A área da lesão foi, então, calculada contando-se o número de pixels (unidade espacial da imagem) da região de interesse, constando da quantidade de zero pixels (de cor preta) presentes na figura. A conversão de pixels para mm² é feita tomando por base a imagem de um padrão de 100mm².

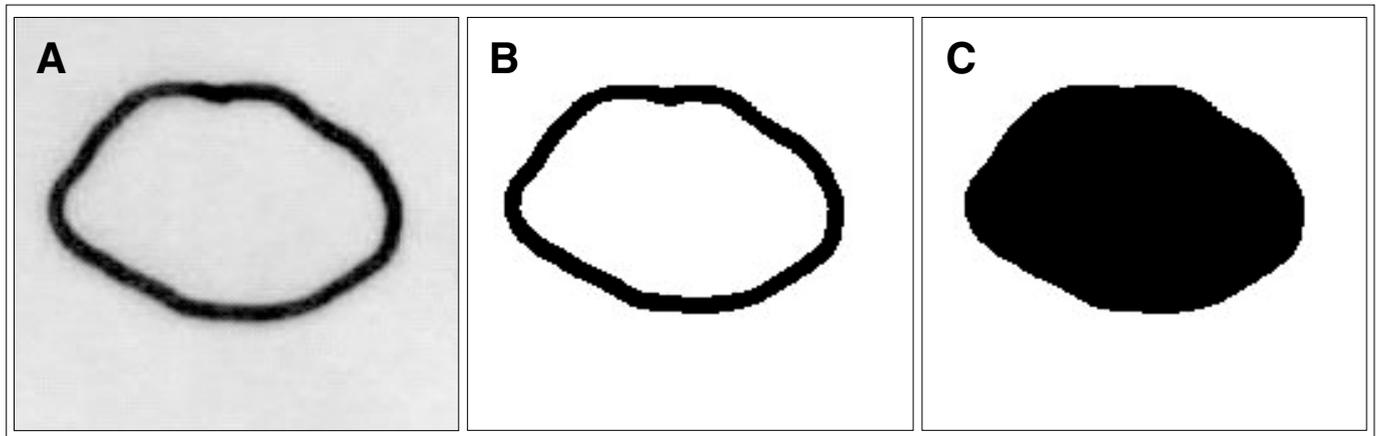


Figura 1. Sequência do processamento digital de imagem para cálculo da área da lesão. Decalque obtido (A), binarização do contorno (B), e preenchimento da área interna ao contorno (C).

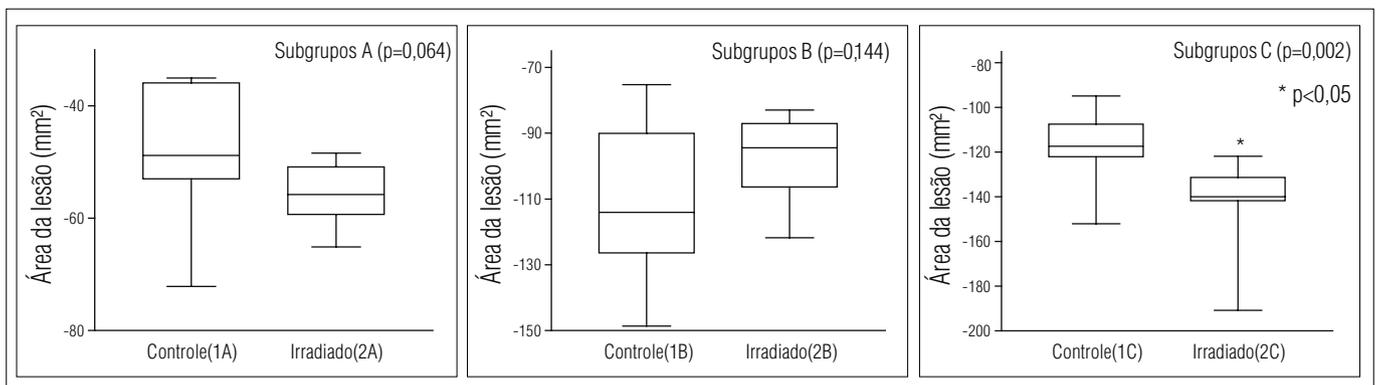


Figura 2. Comparação dos resultados dos grupos controle e irradiado, no primeiro e terceiro dias de lesão do subgrupo A (três dias); no primeiro e sétimo dias de lesão do subgrupo B (sete dias); e no primeiro e 14º dias de lesão do subgrupo C (14 dias).

Os resultados foram avaliados quanto à evolução temporal, entre os subgrupos do mesmo grupo, e quanto ao tipo de tratamento (controle ou irradiado), entre os subgrupos de cada grupo, e submetidos à análise estatística, por meio da aplicação do teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação de duas amostras independentes, com o nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

Resultados

O grupo controle e o grupo irradiado apresentaram um aumento na área que foi cicatrizada ao longo dos 14 dias que se sucederam após a lesão cutânea. A área média inicial da lesão, imediatamente depois de produzida no subgrupo 1A (controle três dias) foi de $115,73\text{mm}^2$, diminuindo para $68,00\text{mm}^2$ no terceiro dia, com diferença média de $47,73\text{mm}^2$. No subgrupo 2A (irradiado três dias), a área média da lesão foi de $119,85\text{mm}^2$ de imediato e de $64,06\text{mm}^2$ no terceiro dia, com diferença média de $55,79\text{mm}^2$.

No subgrupo 1B (controle sete dias) a área média da lesão foi de $133,24\text{mm}^2$ de imediato e de $19,69\text{mm}^2$ no sétimo dia, com

diferença média de $113,55\text{mm}^2$. No subgrupo 2B (irradiado sete dias), a área média da lesão foi de $118,03\text{mm}^2$ de imediato e de $18,69\text{mm}^2$ no sétimo dia, com diferença média de $99,34\text{mm}^2$.

No subgrupo 1C (controle 14 dias), a área média da lesão foi de $127,55\text{mm}^2$ de imediato e de $10,17\text{mm}^2$ no 14º dia, com diferença média de $117,38\text{mm}^2$. No subgrupo 2C (irradiado 14 dias), a área média da lesão foi de $148,69\text{mm}^2$ de imediato, e de $6,81\text{mm}^2$ no décimo quarto dia, com diferença média de $141,88\text{mm}^2$.

Na Figura 2 está a representação gráfica das diferenças de área encontrada nos subgrupos A (três dias), B (sete dias) e C (14 dias), na forma de box plots, onde as bordas inferior e superior correspondem, respectivamente, aos primeiro e terceiro quartis, a linha interna, à mediana, os colchetes horizontais externos, ao menor e maior valores da amostra, e as linhas horizontais isoladas abaixo e acima, aos valores correspondentes ao primeiro e o terceiro quartis.

A análise estatística evidenciou que não houve diferença significativa entre as áreas médias ou medianas das lesões entre os subgrupos 1A (controle três dias) e 2A (irradiado três dias; $p=0,064$) e entre os subgrupos 1B (controle sete dias) e 2B (irradiado sete dias; $p=0,14$). Já entre os subgrupos 1C (controle 14

dias) e 2C (irradiado) as diferenças entre as áreas inicial e final foram significantes ($p=0,002$; conforme a Figura 2).

Discussão

A eficácia do ultra-som de baixa intensidade (USBI) foi comprovada em várias investigações sobre sua influência na estimulação da neo-osteogênese^{10,20} e no reparo de outros tipos de tecidos, como a pele^{1,13,14,21} e o músculo^{11,12}. Apesar de várias pesquisas já terem comprovado os efeitos benéficos do USBI sobre o processo de cicatrização e regeneração de diferentes tipos de tecidos, ainda pouco se sabe sobre os seus efeitos na cicatrização da pele. Foi, portanto, o objetivo primário da presente investigação avaliar a hipótese de que o USBI efetivamente acelera o fechamento das lesões da pele, utilizando o método da planimetria computacional para medir as lesões nos diferentes períodos de avaliação.

As lesões foram realizadas no dorso do rato, por ser uma região relativamente protegida de contaminação, pelo menor contato com fezes e com a saliva do animal, o que diminuía o risco de infecções. Foi produzida uma lesão cutânea total, ou seja, interessando toda a espessura da pele, até o plano fascial, com o objetivo de retirar toda e qualquer camada proliferativa central que pudesse propiciar uma cicatrização espontânea rápida, de modo que a ferida teria estímulo máximo das respostas fisiológicas, inclusive com a contração da cicatriz e epitelização central. Seria esse o modo, portanto, de mimetizar uma lesão cutânea grave, cuja cicatrização espontânea é sempre lenta.

Observações macroscópicas da pele dos ratos relativas à sua integridade foram realizadas durante todo experimento, não sendo observadas quaisquer reações adversas neste período em ambos os grupos. Contudo, manter os animais em gaiolas coletivas, poderia causar novos danos teciduais devido ao contato entre eles e comprometer a análise do processo cicatricial. Apesar de essa possibilidade existir, o processo de manutenção dos animais em um mesmo recinto foi semelhante em todos os grupos e, dessa forma, esse procedimento não comprometeu os resultados.

O tempo e a frequência de estimulação do USBI pulsado no reparo do tegumento cutâneo apresentam grande variação na literatura consultada. Alves¹³ tratou por cinco minutos cada um dos quatro pontos adjacentes às lesões, em queimaduras produzidas na pele de ratos, perfazendo o total de 20 minutos diários. Hilário¹⁴ tratando pacientes com úlceras tróficas da perna, irradiou a periferia da lesão três vezes por semana, com tempo de irradiação de 20 a 40 minutos, na dependência da área da úlcera. Peschen et al.¹⁵ trataram pacientes com úlceras venosas crônicas, com três sessões semanais de dez minutos de duração cada, usando a técnica subaquática. Anastácio¹

tratou pacientes com úlceras vasculares também com três sessões semanais de dez minutos de irradiação em cada ponto adjacente das lesões. Campanelli²¹ tratou pacientes com mal perfurante plantar, com três sessões semanais de dez minutos cada ponto adjacente, o número de pontos dependendo das dimensões da lesão.

O protocolo inicial do uso do USBI pulsado preconizava a aplicação diária por 20 minutos¹⁰, mas, dependendo das dimensões da lesão, a irradiação deveria ser feita em vários pontos ao seu redor, o que tornava o tratamento muito longo e dispendioso. Por este motivo, alguns pesquisadores têm reduzido o tempo de aplicação e, seguindo este raciocínio, no presente trabalho o tempo foi diminuído para dez minutos por sessão, inclusive para demonstrar se tal tempo seria suficiente para acelerar o processo de reparo. Na mesma linha, a frequência das aplicações foi reduzida para dias alternados, totalizando três sessões semanais, o que torna o uso da técnica mais viável do ponto de vista clínico e econômico.

O tratamento com o USBI pulsado foi iniciado no primeiro dia, imediatamente depois de produzida a lesão, com o objetivo de interferir já nos estágios iniciais do processo de reparação, na fase inflamatória aguda, conforme recomendam vários autores^{9,22,23}. O período estabelecido para avaliação foi de três, sete e 14 dias, de acordo com Carvalho²², pois é nestes períodos que se concentram grande parte dos eventos que acompanham as fases do processo de reparação cutânea^{3,9,16,22,24}.

O emprego da técnica de aplicação estacionária, que consiste em manter o transdutor imóvel sobre o local a ser tratado, já havia sido convalidada em trabalhos anteriores^{1,10-14}. Entretanto, tratando-se de uma ferida com exposição dos tecidos profundos, era necessário que ela fosse executada da maneira mais estéril possível, para evitar infecções, que poderiam comprometer a evolução da cicatrização. Assim, foi feito o isolamento dos planos profundos por meio do filme de PVC, sob o qual foi introduzida solução fisiológica em profusão e, acima do qual, foi espalhada uma camada de gel de acoplamento. Apesar de isolar a ferida, essa técnica não interfere com a transmissibilidade das ondas ultra-sônicas²⁵.

De acordo com Simões¹⁶, a cicatrização de feridas é um evento complexo, que envolve a interação de diversos componentes celulares e bioquímicos e ocorre espontaneamente, sem intervenções externas, mas que, quando tratada por meio de artifícios, tende a ocorrer de forma mais rápida e com melhores resultados funcionais e estéticos. Em casos de lesões cutâneas crônicas, como as úlceras de várias causas, sempre de difícil cicatrização espontânea, a utilização de recursos e meios externos que possam eventualmente acelerá-la se justificam plenamente, pois pode significar a diferença entre haver ou não cicatrização. O ultra-som é um desses recursos, visto que seus efeitos benéficos se fazem sentir desde a fase inflamatória

aguda até a fase de remodelagem da cicatriz cutânea, resultando efetivamente em uma cicatrização mais rápida, como observado no 14º dia, em que a diferença de área exposta em relação ao primeiro dia foi significativa.

O conhecimento dos eventos fisiológicos por meio dos quais se processa a cicatrização das feridas tem grande importância, sendo a sua contração uma etapa importante do fechamento das lesões que cicatrizam por segunda intenção. Ela é tida por alguns investigadores como sendo controlada pelos miofibroblastos, porque eles são vistos em grande número perto das bordas das feridas contraídas, associados ao movimento centrípeto do tecido preexistente^{16,18,26}. O real mecanismo pelo qual se inicia a contração da ferida é ainda controverso; pode ocorrer nos bordos da ferida^{2,24} ou na sua parte mais profunda, ou em ambos os locais^{3,24}. A curto prazo, o fechamento de uma ferida pela contração de suas margens é considerado insuficiente, pois resta quase sempre uma área central cujo fechamento é por epitelização, de modo que a cicatrização se completa como resultado de uma combinação dos processos de contração e epitelização¹⁸.

A epitelização é uma fase precoce do processo de cicatrização. Já nas primeiras 24 horas após a lesão começa a proliferação das células epiteliais nas bordas da ferida, levando a um espessamento do epitélio marginal; ao mesmo tempo, as células proliferadas migram sobre a derme, dirigidas pela rede de fibrina. Os anexos da pele perdem sua estrutura normal e contribuem para o progresso da epitelização, que se dá a partir das células epiteliais dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas e de seus ductos. Vários fatores de crescimento epidérmico liberados dos macrófagos, como o TGF- β (fator transformador do crescimento), EGF (fator de crescimento epidérmico), PDGF (fator de crescimento das plaquetas) e IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina 1), aceleram a epitelização^{2,16,24}.

Na literatura concernente, há referências quanto ao emprego da irradiação ultra-sônica nas bordas das lesões^{1,13,14,21} no seu centro, em local destituído de pele²⁵ ou em ambas as regiões^{9,15}. Neste trabalho, a irradiação envolveu simultaneamente as bordas e o centro da lesão produzida, em função das dimensões do cabeçote (22mm de diâmetro) e da área da lesão (10mm de diâmetro), o que foi proposital, tendo em mente que se pretendia estimular os miofibroblastos, sensíveis ao ultrassom, aumentando assim a contração da cicatriz, como já referido por outros autores.

O acompanhamento da evolução pela medida da circunferência ou da área da lesão cutânea é o parâmetro mais empregado na prática clínica diária de fisioterapeutas e médicos, motivo da sua utilização neste trabalho. A medida da área da lesão pela planimetria computacional foi escolhida por ser de baixo custo, fácil manuseio e aplicabilidade clínica, havendo já

vários relatos do seu emprego para o seguimento da evolução de lesões cutâneas em humanos^{17,27}. A reprodução computadorizada do decalque, obtido diretamente das feridas sobre um filme transparente, utilizando um programa e técnicas de processamento da imagem permitiu calcular suas dimensões^{17,27,28}. Por esse parâmetro, o efeito da irradiação ultra-sônica apareceu somente no último período de observação, no 14º dia (subgrupos C), quando a diferença entre os grupos foi significativa, fato não ocorrido nos períodos de três (subgrupos A) e sete dias (subgrupos B).

A irradiação ultra-sônica certamente atuou já na fase proliferativa da cicatrização, que se inicia por volta do terceiro dia após a lesão e persiste por duas a três semanas, resultando na infiltração celular do leito da ferida, na neovascularização, na deposição da matriz colágena, na re-epitelização e na contração da ferida. Células como os fibroblastos e as células endoteliais acumulam-se no local da ferida por meio de uma combinação de migração e proliferação e o estímulo que controla esses eventos provém de numerosas fontes, sendo o macrófago, que fagocita o tecido desvitalizado e libera fatores de crescimento, uma das fontes mais importantes. Portanto, é muito provável que a proliferação dos fibroblastos tenha sido devido, em parte, a um efeito indireto do ultrassom, por meio dos macrófagos⁹.

Young e Dyson⁹ observaram, já por volta do quinto dia após a produção de uma lesão cutânea total em ratos, que havia um contingente consideravelmente menor de células inflamatórias, mas maior de tecido de granulação, nos animais submetidos à irradiação ultra-sônica. Também, o alinhamento dos fibroblastos nos leitos das feridas paralelamente à sua superfície nos animais tratados, contra um alinhamento aleatório naqueles não tratados, foi considerado indicativo de uma cicatrização mais avançada. Segundo os autores, esses achados sugerem que o estímulo à cicatrização pela irradiação ultra-sônica deve ter ocorrido durante a fase inflamatória do reparo.

Em animais como o rato, a contração da cicatriz, gerada por forças celulares e elementos contráteis de fibroblastos e miofibroblastos, os quais aparecem na ferida já no final da primeira e começo da segunda semana¹⁶, é o principal mecanismo de oclusão da ferida. Posto que nos animais irradiados o fechamento foi mais rápido, é válido propor que a irradiação ultra-sônica tenha estimulado também esse mecanismo. A observação pós-operatória dos animais não foi levada a períodos mais prolongados do que duas semanas justamente porque é nessa fase que os eventos e as diferenças entre animais tratados e não tratados são mais evidentes e o fechamento da lesão neste período foi quase completo, conforme observado no estudo. Os resultados obtidos neste trabalho vão ao encontro dos relatados na literatura, segundo os quais a irradiação

ultra-sônica pulsada de baixa intensidade de fato estimula a cicatrização cutânea^{1,13-15,21}.

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

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade estimula a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas, de acordo com os parâmetros de aplicação, particularmente tempo e periodicidade. Ainda, a planimetria computacional mostrou ser um recurso de baixo custo, fácil manuseio e de aplicabilidade clínica.

Referências bibliográficas

- Anastácio MADJ. Reparação epitelial em úlceras vasculares após estimulação do ultra-som pulsado de baixa intensidade [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 2000.
- Araújo ID. Fisiologia da cicatrização. In: Petriouan A. Lições de cirurgia. Rio de Janeiro: Interlivros; 1997. p. 101-9.
- Kitchen S, Young S. Reparo dos tecidos. In: Kitchen, S, Bazin S. Eletroterapia de Clayton. São Paulo: Manole; 1998.
- Kitchen SS, Partridge CJ. A review of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. 1990;76(10):593-600.
- Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. 1987;73(3):116-20.
- Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc*. 1997;29(3):326-32.
- Robertson VJ, Baker KG. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. *Phys Ther*. 2001;81(7):1339-50.
- Webster DF, Pond JB, 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(4):343-51.
- Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics*. 1990;28(3):175-80.
- Xavier CM, Duarte LR. Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. *Rev Bras Ortop*. 1983;18(3):73-80.
- Guiro R, Guiro E. Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial: estudo experimental em ratos. *Rev Cien Tecnol*. 1995;8(4):37-47.
- Bassoli AD. Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 2001.
- Alves JM. Efeitos da energia ultra-sônica na regeneração de pele animal com queimadura por calor [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 1988.
- Hilário ML. Radiação ultra-sônica de baixa intensidade na reparação tecidual de úlceras tróficas de perna [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 1993.
- Peschen M, Weichenthal M, Schöpf E, Vanscheidt W. Low-frequency ultrasound treatment of chronic venous leg ulcers in an outpatient therapy. *Acta Derm Venereol*. 1997;77(4):311-4.
- Simões MLP. Cicatrização. In: Silva Júnior OC, Zucoloto S, Beer Júnior A. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. São Paulo: Robe Editorial; 1988. p. 266-73.
- Falcão CS, Coelho BRA, Almeida LE, Galdino MPAC. 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(4):165-9.
- MacGrath MH, Simon RH. Wound geometry and the kinetics of wound contraction. *Plast Reconstr Surg*. 1983;72(1):66-73.
- Tanaka C, Ravagnani R, Höfling L, Guimarães PCM, Muraco-Neto B, Puech-Leão P. Análise Morfométrica do reparo de ulcerações de pele de origem venosa após tratamento de fisioterapia. *Rev Fisioter Univ São Paulo*. 1996;3(1/2):47-53.
- Busse JW, Bhandari M, Kulkarni AV, Tunks E. The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: a meta-analysis. *CMAJ*. 2002;166(4):437-41.
- Campanelli F. Efeitos da radiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade sobre o mal perfurante plantar (MPP), manifestação cutânea decorrente da hanseníase [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 2004.
- Carvalho PTC. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 2001.
- Barros ARB. Efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões da epiderme de coelhos [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 2002.
- Bevilacqua, Cicatrização. In: Goldemberg S, Bevilacqua. Bases da cirurgia. São Paulo: Pedagógica e Universitária; 1981. p. 99-118.

25. Amâncio AG. Efeitos do ultra-som terapêutico na integração de enxertos da pele total em coelhos [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 2003.
26. Robson M, Raine T, Smith D. Feridas e cicatrização. In: Lawrence, P. Fundamentos em cirurgia geral. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995. p. 131-3.
27. Medeiros G. Uso de texturas para o acompanhamento da evolução do tratamento de úlceras dermatológicas [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo; 2001.
28. Lagan KM, Dusoir AE, McDonough SM, Baxter GD. Wound measurement: the comparative reliability of direct versus photographic tracings analyzed by planimetry versus digitizing techniques. Arch Phys Med Rehabil. 2000;81(8):1110-6.