

Efeito do ultrassom e do dexapantenol na organização das fibras colágenas em lesão tegumentar

Effect of ultrasound and dexpanthenol on collagen organization in tegumentary lesions

Gustavo N. Guimarães^{1,2}, Maria S. M. Pires-De-Campos¹, Gislaire R. Leonardi³, Helena H. K. Dib-Giusti⁴, Maria L. O. Polacow¹

Resumo

Objetivo: Analisar o efeito do ultrassom (US), do dexapantenol (d-P) e da associação dos tratamentos (US+d-P) na organização de fibras colágenas na lesão tegumentar em ratos por meio da análise da birrefringência. **Métodos:** Foram utilizados 50 ratos Wistar, anestesiados com Thionembutal Sódico (50mg/Kg), dos quais foi retirado 1cm² de pele da região dorsal, divididos em cinco grupos: controle (C), gel (G), US (3 MHz, 0,1 W/cm², 1 minuto, modo contínuo), d-P (10%) e US+d-P. Após sete e 14 dias de tratamento diário, foram removidos segmentos dessas áreas e obtidos cortes de 6µm de espessura que, posteriormente, foram corados em Picrosirius. Os cortes foram observados em microscopia de polarização utilizando um software responsável pela medida de birrefringência das fibras colágenas (KS400 2.0 - Kontrol Eletronics). As médias das áreas birrefringentes (µm²) de cada grupo foram submetidas à análise de variância pela ANOVA, seguida do teste de Tukey (p≤0,05). **Resultados:** A média de área birrefringente do grupo US+d-P (1586,43±162,14) foi maior (p≤0,001) que a dos grupos experimentais (C: 139,36±35,35, US: 317,55±129,9 e d-P: 192,41±36,57) no 7º dia de tratamento, indicando uma aceleração na síntese e organização das fibras colágenas na região lesionada. No 14º dia de tratamento, os grupos US+d-P (2858,47±510,17), US (1779,94±482,78) e d-P (2546,88±304,45) apresentaram área birrefringente maior que a do grupo C, porém não diferiram entre si. **Conclusão:** A associação dos tratamentos (US+d-P) acelerou a síntese e a organização das fibras colágenas apenas no estágio inicial de reparo tegumentar.

Palavras-chave: ultrassom; dexapantenol; colágeno; fisioterapia.

Abstract

Objective: To analyze the effect of ultrasound (US), dexpanthenol (d-P) and a combination of these treatments (US+d-P) on collagen fiber organization in tegumentary lesions in rats by birefringence analysis. **Methods:** Wistar rats (50) were anesthetized (Thionembutal - Sodic = 50mg/Kg), 1cm² of dorsal region skin was removed, and the animals were divided into five groups: control (C), gel (G), US (3 MHz, 0.1 W/cm², 1 minute, continuous), d-P (10%) and US+d-P. After daily treatment for 7 and 14 days, 6µm thick sections of lesioned areas were stained in picrosirius and measurements of the collagen birefringent area (µm²) were obtained using polarized light microscopy (Zeiss Axiolab-ZEISS- Germany) with histological image analysis software (KS 400 2.0 - Kontrol Eletronics, Munique, Germany). The means were compared by ANOVA followed by the Tukey test (p<0.05). **Results:** The US+d-P group showed a significantly greater (p≤0.001) birefringent area (1586.43±162.14) than the other experimental groups: C (139.36±35.35), US (317.55±129.9) and d-P (192.41±36.57) by the 7th day of treatment, indicating acceleration of the wound healing process. By the 14th day of treatment, the US+d-P, US and d-P groups presented greater birefringence than the control group, but did not differ from each other. **Conclusion:** The combination of treatments (US+d-P) accelerated collagen fiber synthesis and organization in the early stages of cutaneous repair.

Keywords: ultrasound; dexpanthenol; collagen; physical therapy.

Recebido: 07/05/2010 – Revisado: 07/10/2010 – Aceito: 14/02/2011

¹Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba, SP, Brasil

²Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brasil

³Farmácia e Bioquímica, Campus Diadema, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Diadema, SP, Brasil

⁴Centro Universitário Hermínio Ometto de Araras (UNIARARAS), Araras, SP, Brasil

Correspondência para: Maria Luíza Ozores Polacow, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Rodovia do Açúcar, km 156, C.P. 68, CEP 13400-911, Piracicaba, SP, Brasil, e-mail: mpolacow@unimep.br

Introdução

Proteína mais abundante do organismo dos animais, o colágeno é a principal estrutura protéica do tecido conjuntivo. Existem vários tipos de colágenos, mas os tipos I, II, III e IV são os mais comuns¹. Na derme, predomina o colágeno tipo I, porém outros três tipos também estão presentes em menor escala, como os tipos III, IV e V.

As moléculas de colágeno se agregam por meio de ligações cruzadas, e essa rede de interações químicas bem organizada torna o colágeno um cristal orgânico, explicando, assim, por que essa proteína é resistente a tensões e pressões².

As variações na organização e na ordem molecular dos feixes de colágeno podem ser detectadas e medidas durante o processo de reparo por meio de suas propriedades anisotrópicas, ou seja, a birrefringência³.

A birrefringência total é dependente da geometria das moléculas, do volume parcial (concentração), do grau de agregação, da orientação dos componentes do feixe e da força oscilatória de todas as transições eletrônicas na molécula, bem como das ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno³⁻⁵.

O processo de reparo de uma ferida apresenta três fases que se sobrepõem continuamente: inflamatória, proliferativa e remodelamento, e envolve várias alterações bioquímicas e celulares⁶. Independente do tecido, o colágeno é o componente mais importante na reparação.

Lesões de pele são tratadas por vitaminas como o dexapantenol ou d-pantenol (d-P). Trata-se de uma pró-vitamina do complexo B que, quando aplicada topicamente, é convertida em ácido pantotênico, um constituinte natural da pele⁷. Ebner et al.⁸ observaram “*in vitro*” e “*in vivo*” que a ativação de fibroblastos com d-P leva a uma aceleração da epitelização de feridas, formando um epitélio com elevado nível organizacional das estruturas formadoras da epiderme.

O ultrassom (US) como modalidade terapêutica também tem sido empregado no processo de reparo tecidual, como no tratamento de feridas cutâneas⁹⁻¹². Estudos apontam aumento na síntese de colágeno, na proliferação de fibroblastos e na microcirculação local^{10,13,14}, mas, de acordo com ter Haar¹⁴, em muitos desses efeitos, não se sabe o mecanismo de ação. Alguns trabalhos têm apontado riscos de alterações em pele saudável¹⁵ com o uso de US contínuo de 3 MHz, nas intensidades de 1 a 2 W/cm² e *in vitro*¹⁶, quando amostras de pele foram irradiadas acima de 2,5 W/cm².

Diante da dificuldade de permeação de fármacos, tem-se estudado o uso de aceleradores físicos como o US, terapia denominada fonoforese^{17,18}. Estudo deste mesmo grupo de pesquisa verificou que não só o US acelerou o processo de reparo tegumentar bem como sua associação com o d-P¹⁹. Mostrou também aumento da re-epitelização da ferida após sete dias de tratamento,

mas não havia estudado quantitativamente as fibras colágenas, o que justifica o presente estudo, na tentativa de verificar se esses recursos isolados e/ou associados poderiam alterar a organização dessa proteína, tão importante no processo de cicatrização.

Como o US requer um meio de acoplamento, a hipótese que se levanta é a de que, se ele for acrescido de d-P, poderá acelerar a síntese de colágeno nessas lesões.

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do US, do d-P e da associação dos tratamentos na lesão tegumentar em ratos por meio de análise histomorfométrica da birrefringência das fibras colágenas.

Materiais e métodos

Animais

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil (Protocolo nº 020/2006). Foram utilizados 50 ratos Wistar machos, com peso aproximado de 250 g, mantidos no Biotério de Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba, SP, Brasil, sob controle de ciclo claro/escuro (12h/12h), com água e ração “*ad libitum*”, em gaiolas individuais, substituídas diariamente.

Procedimentos experimentais

Após anestesia por Thionembutal Sódico (50mg/Kg), os animais foram tricotomizados na região dorsal, de onde foi removido 1 cm² de pele, incluindo a hipoderme, utilizando um bisturi e gabarito vasado milimetrado de plástico. Todos os animais receberam uma única aplicação, no local da lesão, de polivinil pirolidona-iodo (PVPI) ativo - 10,0g com 10% de estabilizante e emoliente logo após a cirurgia.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n=10): controle (C), gel (G), gel + ultrassom (US), gel + dexapantenol (d-P), gel + ultrassom + dexapantenol (US+d-P). Cinco animais de cada grupo receberam tratamento por sete dias, e os outros cinco animais, por 14 dias, sendo que a eutanásia se deu no 8º e 15º dia, respectivamente. O tratamento diário de todos os animais ocorreu sempre no período da manhã, durante o qual foram estabilizados pelos próprios pesquisadores.

Grupo C

Os animais do grupo C não foram submetidos a nenhum tratamento após o procedimento cirúrgico.

Grupo gel

O gel utilizado foi o Carbopol 940[®], constituído de ácido carboxivinílico, propilenoglicol, trietanolamina, metilparabeno e água destilada, sendo aplicadas diariamente 2g de gel por toda a lesão com o auxílio de espátula.

Grupo d-P

Acrescentou-se 10% de d-P ao gel, e 2g foram aplicadas diariamente sobre a lesão, como no grupo anterior.

Grupos US e US+d-P

O US (Sonomaster Dual, KW Indústria Nacional de Tecnologia Ltda., Amparo, São Paulo, Brasil) foi aplicado diariamente sobre a lesão dos grupos US e US+d-P, regulado a 3 MHz^{11,20}, intensidade de 0,1 W/cm²¹, modo de emissão contínuo²¹ e tempo de aplicação de 1 min/cm²², com o transdutor sendo movido lenta e continuamente até o final da aplicação²³, ERA de 4 cm² ± 30%.

A calibração da intensidade do US na frequência de 3 MHz foi aferida antes e durante o experimento utilizando água destilada e desgaseificada, usando uma balança de US (UPM – DT-10 OHMIC Instruments, Easton, USA). Além disso, verificou-se a transmissividade da onda ultrassônica no gel de Carbopol 940[®] e no gel de d-P, conforme proposto por Guirro, Guirro e Ferreira²⁴, considerando a variação de 10% do US e de 0,07% da balança. O procedimento foi repetido cinco vezes para cada gel, e nenhuma das preparações mostrou atenuação estatisticamente significativa (dados não demonstrados).

Processamento histológico

Vinte e quatro horas após o último dia de tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, foi removida a área da lesão contendo 2 mm de pele intacta ao redor. Segmentos transversais da área central dessas lesões foram fixados em solução tamponada de formol a 10% e processados histologicamente para inclusão em paraplax. De cada segmento, foram obtidos três cortes histológicos não seriados de 6µm de espessura, corados com Picosirius a 1% (Sirius red em solução saturada de ácido pícrico) em lâminas cegadas. A birrefringência das fibras colágenas foi quantificada por um único observador em cinco áreas (10000µm² cada) por corte, distribuídas ao longo de toda extensão da lesão, por meio de microscopia de polarização (Zeiss Axiolab, ZEISS, Alemanha), com auxílio de um software analisador de imagens histológicas (KS 400 2.0 – Kontrol Eletronics, Munique, Alemanha).

Análise estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o aplicativo GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Ind, San Diego CA, USA). O teste

de Kolmogorov-Smirnov foi usado para verificar a normalidade na distribuição dos dados, depois foram utilizados os testes de análise de variância ANOVA, seguido por Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. Os dados obtidos foram submetidos à regressão polinomial, que tem como objetivo avaliar as áreas birrefringentes em função do tempo para os diversos tratamentos.

Resultados

No 7º dia de tratamento, o grupo US+d-P apresentou maior área birrefringente ($p < 0,001$) do que os demais grupos (Tabela 1 e Figura 1). Já no 14º dia, o grupo tratado com d-P bem como o do tratamento associado (US+d-P) apresentaram maior área birrefringente do que o do tratamento isolado (US). Este, por sua vez, foi significativamente diferente ($p < 0,001$) dos grupos C e G, que não diferiram entre si.

Os dados também foram tratados pela regressão polinomial. Todos os grupos obtiveram um aumento das médias das áreas birrefringentes no decorrer do tempo de tratamento, porém nota-se que os grupos US, d-P e US+d-P obtiveram uma

Tabela 1. Média e desvio-padrão das áreas birrefringentes (µm²) dos diferentes grupos experimentais tratados por sete e 14 dias.

Grupos experimentais	7 dias	14 dias
Controle	139,36±35,35	316,96±55,15
Gel	218,13±93	448,42±148,87
Ultrassom	317,55±129,9	1779,94±482,78*†
d-pantenol	192,41±36,57	2546,88±304,45*††
Ultrassom + dexapantenol	1586,43±162,14*#	2858,47±510,17*††

* significativamente diferente do grupo controle no mesmo período de tratamento ($p < 0,001$); # significativamente diferente do grupo ultrassom no mesmo período de tratamento ($p < 0,001$); † significativamente diferente em relação ao mesmo grupo com sete dias de tratamento ($p < 0,001$).

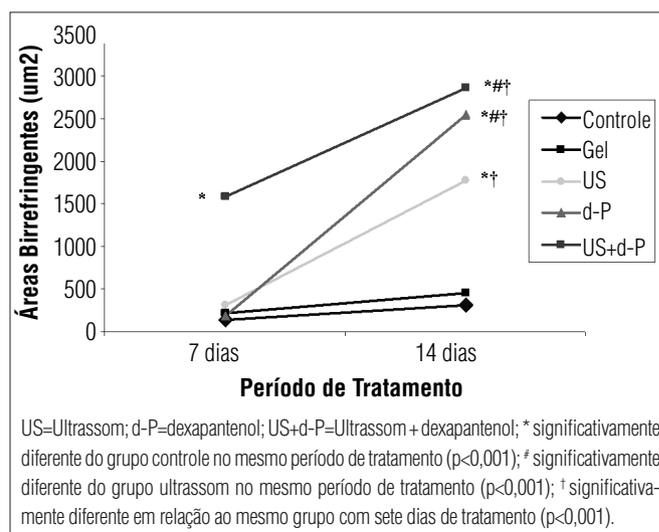


Figura 1. Regressão polinomial das médias das áreas birrefringentes em função do tempo para os diferentes grupos experimentais.

evolução significativa ($p < 0,001$), o mesmo não ocorrendo com os grupos C e G ($p > 0,05$), como mostra a Figura 1.

A Figura 2 visualiza as áreas brilhantes que correspondem à birrefringência característica das fibras colágenas na área lesionada dos grupos experimentais tratados por sete dias e por 14 dias, em que o tecido está mais maduro e conseqüentemente as fibras colágenas aparecem com brilho mais intenso.

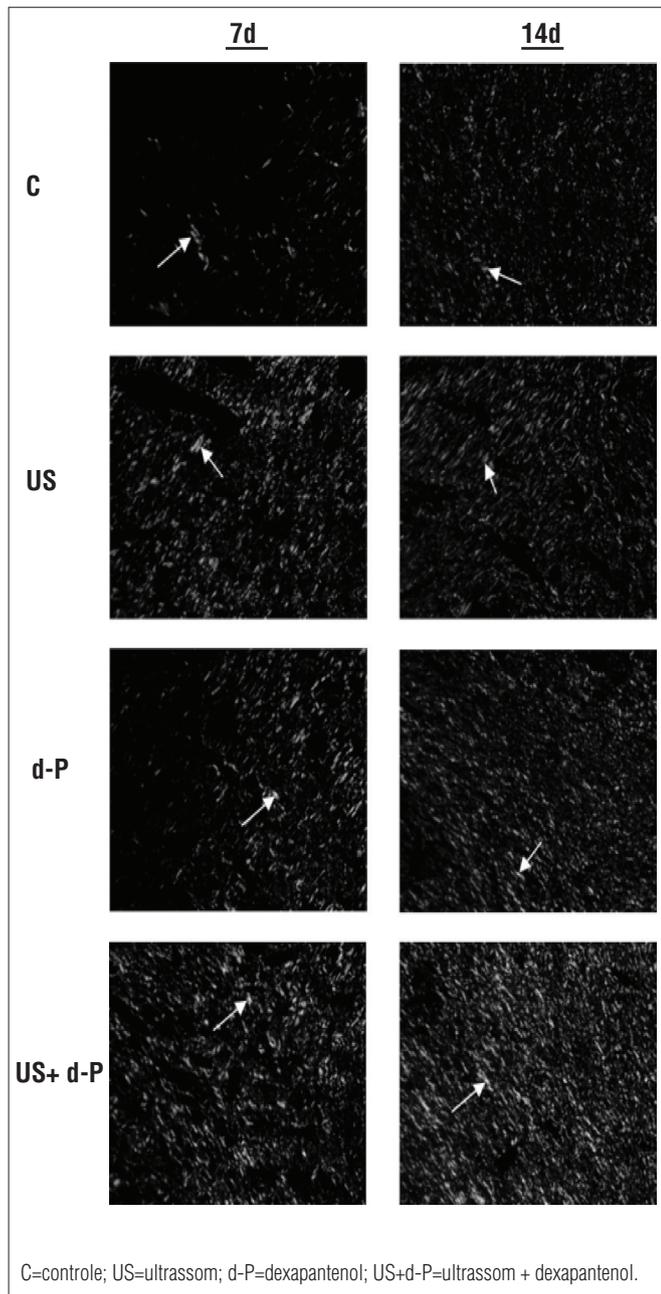


Figura 2. Microscopia de polarização das áreas lesionadas mostrando a disposição e o brilho característico das fibras colágenas (setas). Observa-se que o grupo US+d-P apresenta maior quantidade de fibras colágenas no 7º dia (7d) em comparação aos grupos tratados isoladamente com US e d-P. No 14º dia (14d), o grupo d-P é o que mais se assemelha com o grupo associado (US+d-P) (200x, Picosirius 1%).

Discussão

A regeneração de feridas cutâneas é um processo altamente organizado, envolvendo interações celulares, formação de tecido de granulação, deposição de proteoglicanos e colágeno, principal componente de uma cicatriz madura⁶.

Para proporcionar efeitos terapêuticos no processo de reparo tecidual, como a interação entre células e matriz, têm-se utilizado recursos fisioterapêuticos e farmacológicos, como a aplicação do US⁹⁻¹² e do d-P^{7,8} em tratamentos isolados.

Neste trabalho, no 7º dia de tratamento, a área de birrefringência das fibras colágenas do grupo tratado com d-P não diferiu da do C, segundo o detalhamento da análise estatística por meio do teste de Tukey, como mostra a Tabela 1. No entanto, no 14º dia de tratamento, observa-se que a média de áreas birrefringentes do grupo d-P foi significativamente maior ($p < 0,001$) do que a do grupo C (Tabela 1, Figura 2). Provavelmente, o d-P tenha promovido um aumento da síntese de colágeno por meio da ativação dos fibroblastos, confirmando os resultados de Ebner et al.⁸. Como a taxa de síntese e remodelação do colágeno é lenta, seu efeito só apareceu no 14º dia.

O tratamento com US, segundo Young e Dyson¹¹, acelera a reação inflamatória e proliferação celular nos estágios iniciais da regeneração epidermal em ratos, bem como aumenta a deposição de colágeno e força tensil da ferida. Demir et al.¹³, utilizando US com intensidade de 0,1 W/cm² e 0,5 W/cm², observaram aceleração da fase inflamatória na reparação de feridas. Nos mesmos parâmetros do presente trabalho, mas com US pulsado, observou-se diminuição do tempo de fase inflamatória e, na fase proliferativa, encontrou-se aumento de hidroxiprolina e número de fibroblastos, bem como estímulo para síntese de colágeno.

Tais resultados puderam ser observados neste trabalho, uma vez que, no que se refere às áreas birrefringentes, não houve diferença significativa (Tabela 1 e Figura 1) no grupo US tratado por sete dias; mas, na fase proliferativa, no 14º dia, houve aumento em relação ao grupo C.

A associação dos tratamentos (US+d-P) vem sendo estudada por nosso grupo de pesquisa tanto *in vitro*²⁵ como na regeneração tegumentar¹⁹. Polacow et al.¹⁹ observaram estímulo à reepitelização de feridas, aumento do número de fibroblastos, além de melhor organização no tecido cicatricial aos sete dias de tratamento, numa análise qualitativa. Porém, não se estudaram os efeitos dessa associação na síntese e organização do colágeno.

No presente trabalho, nas mesmas condições experimentais, no 7º dia de tratamento, os resultados mostraram que o grupo US+d-P apresentou birrefringência significativamente maior ($p < 0,001$) do que a dos tratamentos isolados, demonstrando aceleração na maturação das fibras colágenas presentes nesse

tecido lesado (Tabela 1). Os dados aqui apresentados reforçam o efeito benéfico dessa associação, pois sabe-se que, se há maior quantidade de fibroblastos¹⁹, há, conseqüentemente, um incremento na síntese de matriz extracelular, confirmando o papel dessas células nesse processo, uma vez que liberam fatores de crescimento que contribuem para a cicatrização de feridas^{10,12,26}. O efeito de cavitação produzido pelo US aumenta o influxo de cálcio nos monócitos, atuando como segundo mensageiro e promovendo efeito acentuado na síntese e na liberação de fatores que contribuem para a cicatrização das feridas^{11,27}.

Segundo KoeKe et al.²⁸, que estudaram o efeito do US associado com hidrocortisona 10%, a fonoforese influenciou positivamente o processo de reparo de tendões, comparando-a com os tratamentos de US e hidrocortisona isolados.

No 14º dia de tratamento, o grupo experimental US+d-P apresentou maior birrefringência, porém não diferiu do grupo tratado isoladamente por d-P, já que, nesse período do tratamento (de sete a 14 dias), o grupo associado se encontrava na fase de remodelamento, portanto, diminuindo a taxa de síntese e deposição do colágeno no tecido lesado.

Os dados submetidos à regressão polinomial (Figura 1), que tem como objetivo avaliar as áreas birrefringentes em função do tempo para os diversos tratamentos, mostraram que, no 14º dia, todos os grupos experimentais, com exceção dos grupos C e G, apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) da birrefringência em relação ao tratamento por sete dias, revelando maturidade natural das fibras colágenas nessa fase do processo de reparação, correspondente ao início da fase de remodelamento. No entanto, vale salientar que o tratamento associado mostrou-se muito eficaz no 7º dia. Sugerem-se futuros estudos que envolvam essa associação de tratamentos,

com análises histológicas e bioquímicas das lesões durante a fase inflamatória (por volta do 3º dia, na tentativa de se entender o mecanismo de ação desses tratamentos).

Dentre os recursos fisioterapêuticos, o laser também tem sido muito utilizado no tratamento de feridas cutâneas^{29,30}. Mas, como Vogt et al.³¹ observaram que a cicatrização em meio úmido é mais rápida comparada com feridas secas, fato confirmado por vários outros trabalhos que relatam aumento de fibroblastos e de células endoteliais com o uso isolado de gel de acoplamento^{9,19}, este trabalho mostrou que, se esse gel for acrescido de d-P, pode-se ter uma outra opção de tratamento, podendo ser utilizada juntamente com o US.

Embora o presente trabalho aborde um aspecto muito restrito da regeneração tegumentar, estes resultados vêm complementar outros trabalhos que estudam esta associação, que se mostra promissora no tratamento de lesões, mas carece de estudos básicos.

Os resultados aqui apresentados confirmam a hipótese de que a associação dos tratamentos (US+d-P) acelera a síntese de colágeno em lesões cutâneas, sugerindo que pode acelerar o processo de cicatrização em etapa precoce do tratamento.

Conclusão

Os tratamentos isolados com d-P e US, bem como a associação dos tratamentos, estimularam a maturação do colágeno em lesões de pele de rato. O tratamento associado (US+d-P) foi mais eficaz na primeira fase do processo de cicatrização (sete dias), acelerando a maturação das fibras colágenas, o que propicia uma cicatrização mais rápida.

Referências

- Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem*. 2006;281(6):3494-504.
- de Campos Vidal B, de Carvalho HF. Aggregational state in the molecular order of tendons as a function of age. *Matrix*. 1990;10(1):48-57.
- Vidal BC. Form birefringence as applied to biopolymer and inorganic material supraorganization. *Biotech Histochem*. 2010;85(6):365-78.
- da Cunha A, Parizotto NA, Vidal Bde C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (*tendo calcaneus*) of the rat. *Ultrasound Med Biol*. 2001;27(12):1691-6.
- de Campos Vidal B. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron*. 2003;34(8):423-32.
- Oberszyn TM. Inflammation and wound healing. *Front Biosci*. 2007;12(8):2993-9.
- Idson B. Vitamins and the skin. *Cosm Toil*. 1993;108:79-94.
- Ebner F, Heller A, Rippe F, Taush I. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3(6):427-33.
- Bayat M, Razavi N, Hosseini A, Hekmat H. The effects of ultrasound therapy on skin scars of rabbit. *Arch Irn Med*. 2001;4(2):72-5.
- Lowe AS, Walker MD, Cowan R, Baxter GD. Therapeutic ultrasound and wound closure: lack of healing effect on x-ray irradiated wounds in murine skin. *Arch Phys Med Rehabil*. 2001;82(11):1507-11.
- Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics*. 1990;28(3):175-80.
- Altomare M, Nascimento AP, Romana-Souza B, Amadeu TP, Monte-Alto-Costa A. Ultrasound accelerates healing of normal wounds but not of ischemic ones. *Wound Repair Regen*. 2009;17(6):825-31.
- Demir H, Yaray S, Kirnap M, Yaray K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev*. 2004;41(5):721-8.
- ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;93(1-3):111-29.
- Bern DMD, Maciel CD, Zuanon JA, Neto CB, Parizotto NA. Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (*in vivo*) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom. *Rev Bras Fisioter*. 2010;14(2):114-20.
- Boucaud A, Montharu J, Machel L, Arbeille B, Machel MC, Patat F, et al. Clinical histologic and electron microscopy study of skin exposed to low-frequency ultrasound. *Anat Rec*. 2001;264(1):114-9.
- Tang H, Mitragotri S, Blankshtein D, Langer R. Theoretical description of transdermal

- transport of hydrophilic permeants: application to low-frequency sonophoresis. *J Pharm Sci.* 2001;90(5):545-68.
18. Escobar-Chávez JJ, Bonilla-Martínez D, Villegas-González MA, Rodríguez-Cruz IM, Domínguez-Delgado CL. The use of sonophoresis in the administration of drugs throughout the skin. *J Pharm Pharm Sci.* 2009;12(1):88-115.
 19. Polacow MLO, Dib-Giusti HHK, Leonardi GR, Vieira CEC, Guirado GN, Zague V, et al. Efeito do ultra-som e do d-panthenol na regeneração tegumentar. *Rev Bras Fisioter.* 2005;9(3):365-71.
 20. Fyfe MC. A study of the effects of different ultrasonic frequencies on experimental o edema. *Aust J Physiother.* 1979;25(5):205-7.
 21. Cameron MH, Monroe LG. Relative transmission of ultrasound by media customarily used of phonophoresis. *Phys Ther.* 1992;72(2):142-8.
 22. Oakley EM. Application of continuous beam ultrasound at therapeutic levels. *Physiotherapy.* 1978;64(6):169-72.
 23. Byl NN, McKenzie A, Wong T, West J, Hunt TK. Incisional wound healing: a controlled study of low and high dose ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1993;18(5):619-28.
 24. Guirro ECO, Guirro R, Ferreira AL. Efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial: estudo experimental em ratos. *Rev Ciênc Tecnol.* 1995;4(8):37-47.
 25. Zague V, Polacow ML, Pires-de-Campos MS, Leonardi GR. Evaluation of the ultrasound influence in the cutaneous penetration of d-panthenol: test in vitro. *J Cosmet Dermatol.* 2005;4(1):29-33.
 26. Moulin V, Auger FA, Garrel D, Germain L. Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns.* 2000;26(1):3-12.
 27. ter Haar G. Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound.* 1999;9(1):3-9.
 28. Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Salate AC. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(3):345-50.
 29. Bayat M, Azari A, Golmohammadi MG. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(4):465-70.
 30. de Oliveira Guirro EC, de Lima Montebelo MI, de Almeida Bortot B, da Costa Betito Torres MA, Polacow ML. Effect of laser (670 nm) on healing of wounds covered with occlusive dressing: a histologic and biomechanical analysis. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(5):629-34.
 31. Vogt PM, Reimer K, Hauser J, Rossbach O, Steinau HU, Bosse B, et al. PVP-iodine in hydrosomes and hydrogel - a novel concept in wound therapy leads to enhanced epithelialization and reduced loss of skin grafts. *Burns.* 2006;32(6):698-705.