

ESTIMULAÇÃO ULTRA-SÔNICA DA INTEGRAÇÃO DE ENXERTOS DE PELE TOTAL. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

ULTRASONIC STIMULATION OF TOTAL SKIN GRAFTS UNION. AN EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS.

ADRIANA DA COSTA GONÇALVES AMÂNCIO¹, CLÁUDIO HENRIQUE BARBIER², NILTON MAZZER³, SERGIO BRITO GARCIA⁴, JOSÉ ANTÔNIO THOMAZINI⁵

RESUMO

Foi realizado um estudo histológico experimental da influência do ultra-som terapêutico na integração de enxertos de pele de espessura total em 20 coelhas adultas. Dois enxertos quadrados de 2 cm de lado foram obtidos nas regiões escapulares e trocados de lado. O enxerto à direita foi irradiado diariamente (3 MHz, 0,5 W/cm², duração 5 minutos) desde o terceiro dia e por sete dias consecutivos; à esquerda, o tratamento era simulado. O estudo histológico em cortes de 5 µm de espessura obtidos de cada enxerto e corados alternativamente com o tricrômico de Gomori, PCNA e picrossírius, incluiu a medida das áreas da epiderme e da derme, a contagem das células em proliferação na camada germinativa e os vasos neoformados e a orientação das fibras colágenas. Foi observado aumento significativo do número de células proliferativas ($p=0,007$) e dos vasos neoformados ($p=0,0001$) nos enxertos irradiados, mas não na área da epiderme e da derme. Os autores concluíram que o UST induz alterações morfológicas nos processos biológicos envolvidos na integração do enxerto de pele de espessura total, como a proliferação das células germinativas e a formação de novos vasos sanguíneos, e sugerem que há potencial para o uso clínico em humanos.

Descritores: Enxerto de pele; Terapia por Ultra-som; Coelhos.

SUMMARY

An experimental histological study was performed addressing the influence of therapeutic ultrasound on total-thickness skin grafts union in 20 adult female rabbits. Two 2-cm square-shaped grafts, were obtained at scapular regions with sides switched. The graft at right was irradiated on a daily basis (3 MHz, 0.5 W/cm², for 5 minutes) from the third day on, during seven consecutive days; the graft at left received a sham treatment. The histological study in 5 µm-thick slides obtained from each graft and alternatively stained with Gomori trichromic, PCNA and picrossirius, included measurement of epidermal and dermal areas, proliferating cells on germinative layer counts, and neoformed vessels and collagen fibers direction. A significant increase of the number of proliferating cells ($p=0.007$) and of neoformed vessels ($p=0.0001$) was noticed on irradiated grafts, but not on epidermal and dermal areas. The authors concluded that the T-U/S induces morphological changes in biological processes involved on total-thickness skin graft union, such as germinative cells proliferation and new blood vessels formation, suggesting the potential for its clinical use in human beings.

Keywords: Skin transplantation; Ultrasonic Therapy; Rabbits.

Citação: Amâncio ACG, Barbaeri CH, Mazzer N, Garcia SB, Thomazini JA. Estimulação ultra-sônica da integração de enxertos de pele total. estudo experimental em coelhos. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2006; 14(5):276-279. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Amâncio ACG, Barbaeri CH, Mazzer N, Garcia SB, Thomazini JA. Ultrasonic stimulation of total skin grafts union. An experimental study in rabbits. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2006; 14(5):276-279. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Enxertos autólogos de pele certamente são o procedimento mais largamente empregado para prover cobertura para defeitos cutâneos resultantes de uma ampla variedade de causas. Eles podem ser utilizados para lesões de queimaduras, abrasões ou avulsões traumáticas, necrose cutânea seguindo-se a uma operação ou traumatismo, defeitos congênitos passando por correção cirúrgica e assim por diante, numa lista quase infinita de situações, as quais praticamente todo cirurgião plástico ou ortopédico vivenciam rotineiramente. Apesar disso, os resultados dos procedimentos de enxertia de pele nem sempre são completamente satisfatórios mas, até o momento, não há nenhum meio bem estabelecido para estimular a integração e maximizar os resultados estéticos e funcionais dos enxertos. Por outro lado, agentes físicos como a eletricidade, os campos magnéticos ou elétricos e o ultra-som podem influenciar positivamente o resultado do processo de cicatrização ou regeneração de diferentes tecidos como a pele, os ossos, os músculos e tendões

e os nervos periféricos. A irradiação ultra-sônica terapêutica (UST) efetivamente reduz o edema, aumenta o fluxo sanguíneo local, relaxa os músculos, alivia a dor, acelera o reparo tecidual e modifica a formação de cicatrizes⁽¹⁻⁸⁾. No que se refere à pele, há evidências de que o UST propicia a regeneração^(6,9), razão porque ele tem sido indicado para tratar úlceras varicosas^(2,10) ou de pressão⁽¹¹⁾ e já foi até investigado quando à capacidade de acelerar e melhorar a integração e a qualidade de enxertos de pele⁽¹²⁾. Nesse último particular nada ainda está estabelecido, de modo que foi o propósito da presente investigação estudar o papel desempenhado pelo UST na integração de enxertos livres de pele de espessura total em coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram utilizadas vinte coelhas da raça Nova Zelândia pesando em

Trabalho realizado no Programa de Pós-graduação Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação, Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Campus Universitário CEP 14049 - Ribeirão Preto - SP - Brazil - E-mail: chbarbie@fmrp.usp.br

1 - Fisioterapeuta, Aluna do Curso de Mestrado.

2 - Professor Titular, Orientador.

3 - Professor Associado, Co-orientador.

4 - Patologista, Colaborador, Departamento de Patologia e Medicina Legal.

5 - Morfologista, Colaborador, Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Trabalho recebido em 18/05/06 aprovado em 17/07/06

média 2,5 kg (variação: 2,2 – 2,7 kg). Antes e depois da operação os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à ração alimentar e à água. Todas receberam uma injeção subcutânea de uma dose peso-dependente de antibiótico (Penicilina procaína, 400.000 UI) imediatamente antes da operação, a título de profilaxia de infecções.

Procedimento cirúrgico: os animais foram anestesiados com uma dose endovenosa inicial de pentobarbital sódico (Nembutal Abbott®, 30 mg/kg de peso corporal) aplicada na veia marginal da orelha; ocasionalmente, conforme o animal manifestasse dor, uma dose adicional era administrada durante o procedimento. Toda a região escapular foi preparada para a operação da maneira rotineira (tricotomia, anti-sepsia com solução alcoólica de iodo a 20%) e a região operatória foi coberta com campos cirúrgicos. Duas áreas quadradas de 4 cm² (2 x 2 cm) foram desenhadas com o auxílio de um molde de metal, uma de cada lado da região escapular e logo medial às escápulas, recortadas com um bisturi lâmina 15 e inteiramente removidas com um enxerto livre de pele, depois limpo de qualquer resquício de tecido subcutâneo e gordura. Os dois leitos doadores foram revisados para rigorosa hemostasia e os enxertos foram suturados de volta, trocando de lado (o direito no leito da esquerda e vice-versa) com pontos isolados de fio monofilamento de nylon de calibre 5/0, sendo um em cada ângulo e um em cada lado. Os enxertos suturados foram cobertos com gaze vaselinada e um curativo tipo *tie-over* de Brown foi aplicado (Figura 1).

Irradiação ultra-sônica: o curativo era removido no terceiro dia pós-operatório e a área enxertada era cuidadosamente limpa com solução fisiológica para remover qualquer sinal de sangue ou secreção, aspergida com solução alcoólica de iodo a 20% e deixada para secar. Para evitar mobilização involuntária do enxerto sobre o leito, a região toda era abundantemente banhada com vaselina líquida estéril e coberta com um filme plástico (cloreto de polivinil de uso doméstico, 0,001 mm de espessura), o qual era coberto com o gel de acoplamento do cabeçote de irradiação ultra-sônica. A irradiação era aplicada diretamente sobre o enxerto, utilizando um equipamento portátil de uso clínico (SONACEL® Plus III, serie 1050R)*, dotado de um cabeçote de pequeno diâmetro especialmente confeccionado (1,35 cm de diâmetro, 1,43 cm² de área) e preparado para irradiação pulsada (1:2, ou 50%) a 3 MHz de frequência e 0,5 W/cm² de intensidade (SATA). O equipamento foi calibrado com um dosímetro de precisão (Ultrasonic Power Meter, modelo UPM-DT-1) antes de iniciar a irradiação e periodicamente depois disso.

Foram realizadas sessões diárias de cinco minutos de duração cada, iniciadas imediatamente após a remoção do curativo e repetidas por sete dias consecutivos, sempre no mesmo horário, para respeitar o intervalo de 24 horas entre as sessões. O cabeçote ultra-sônico era movido gentilmente sobre o enxerto para evitar descolá-lo do leito. Idêntico procedimento foi realizado na área enxertada à direita (Grupo 1) e à esquerda (Grupo 2), mas com o equipamento desligado neste último, para que houvesse apenas o efeito de massagem em comum entre ambos os lados. Um curativo levemente compressivo era aplicado após a sessão de irradiação, mantendo uma gaze vaselinada sobre a área enxertada para prevenir aderências.

Preparações histológicas: os animais eram mortos no 11º dia pós-operatório com uma injeção

endovenosa de uma dose excessiva de anestésico e cada área enxertada era ressecada, cada uma compreendendo um quadrado de pele de 4 x 4 cm com o enxerto no meio. A pele ressecada era fixada em uma moldura de papel cartão, identificada e imersa em uma solução aquosa de formaldeído a 10% por dois dias para fixação, após o que o enxerto era recortado do restante da pele receptora e processado da maneira rotineira para estudos histológicos. Foram obtidos cortes transversais seriados de 5 µm de espessura, começando de uma das bordas em direção ao centro do enxerto, e corados alternativamente com o tricrômico de Gomori, com o antígeno nuclear para células em proliferação (PCNA, proliferation cell nuclear antigen)⁽¹³⁾ ou com o Picrosyrus. Cada enxerto rendeu cerca de 500 cortes seriados, 50 dos quais (1:10) foram examinados e 10 (1:5) foram efetivamente analisados. Cada lâmina era montada com cinco cortes do enxerto irradiado, lado a lado com cinco do enxerto de controle do mesmo animal, para facilitar as comparações. Os cortes foram examinados em microscópio de luz (Carl Zeiss Axiophot) ou com microscópio de luz polarizada (cortes corados com o Picrosyrus), equipado com uma câmera de vídeo conectada a um microcomputador dotado do programa Snappy (Video Snapshot) para captura de imagem. Os cortes corados com o tricrômico de Gomori, que mostra claramente o limite entre as camadas celulares cutâneas, foram utilizados para medir a área da epiderme e da derme; sob baixa magnificação (25x) e utilizando o programa Scion Image 402, três campos separados da epiderme e da derme eram selecionados em cada corte, de tal modo que o comprimento de cada camada era o mesmo em cada campo, a única variável sendo sua espessura. Com as medidas do comprimento e da espessura calculava-se a área epiderme e da derme (µm²) em cada campo respectivo; um valor médio das três medidas era calculado para cada corte. Ainda nesses cortes e com grande aumento (400x), os vasos neoformados eram contados na derme reticular, vizinha à transição entre o enxerto e o leito receptor, em cinco campos diferentes de cada corte, sendo depois calculado um valor médio para cada corte, cada enxerto e, finalmente, para cada grupo.

As células em proliferação foram contadas na camada germinativa da pele, nos cortes corados com o PCNA e examinados ao microscópio de luz direta (Jenamed 2). Primeiro, eram selecionados três campos separados, como descrito acima, todas as células sendo contadas, com grande aumento (400x). Depois, apenas as células fortemente marcadas eram contadas, sua frequência sendo expressa em porcentagem do total.

A orientação das fibras colágenas era analisada sob aumento moderado (100x) nos cortes corados com o Picrosyrus, usando um microscópio de luz polarizada, os achados sendo meramente descritivos.

Análise estatística: os dados não pareados da medida da área da epiderme e da derme foram submetidos a análise estatística com o teste não-paramétrico de Wilcoxon no nível de significância de 5% (p ≤ 0.05). O teste T de Student foi utilizado para a análise dos dados pareados da contagem das células em proliferação e dos vasos neoformados, igualmente no nível de significância de 5% (≤ 0.05).

RESULTADOS

Achados macroscópicos: não foi observada nenhuma

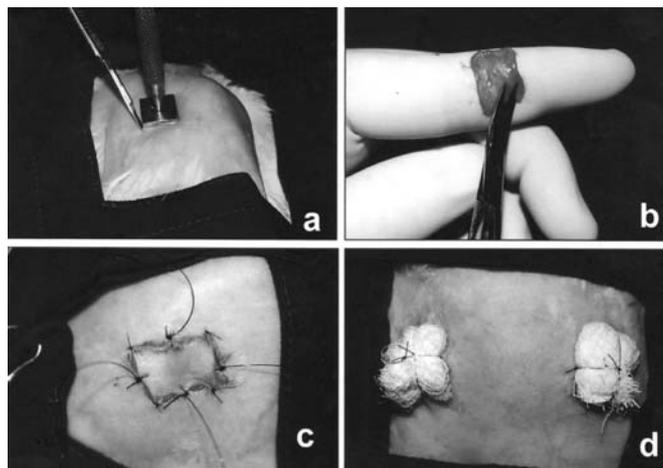


Figura 1 - Sequência do procedimento operatório. A pele sendo marcada com o molde de metal de 4 cm² (2 x 2 cm) (a); o enxerto sendo limpo de qualquer remanescente do tecido subcutâneo (b) e já suturado de volta no leito invertido (c); o curativo tipo *tie-over* de Brown (d).

*BIOSET – Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda, Brasil.

diferença macroscópica evidente entre os enxertos irradiados (Grupo 1) e de controle (Grupo 2), no 11º dia pós-operatório. Pequenas áreas dispersas de necrose apareciam próximo aos cantos e bordas do enxerto, em ambos os grupos. Epidermólise parcial bilateral (enxertos irradiados e de controle) foi observada em quatro animais, e unilateral (lado de controle) em um, cujo aspecto cosmético parecia melhor do que o dos enxertos sem necrose. Não houve nenhum caso de infecção.

Área da epiderme e da derme: a área média da epiderme mediu 246.392 μm^2 (mediana: 220.641 μm^2) no Grupo 1 e 200.626 μm^2 no Grupo 2 (mediana: 173.664 μm^2), mas as diferenças entre os grupos não foram significantes ($p=0,07$). A área média da derme mediu 2.157.730 μm^2 (mediana: 2.164.660 μm^2) no Grupo 1 e 2.109.150 μm^2 (mediana: 2.102.330 μm^2) no Grupo 2, as diferenças entre ambos não sendo igualmente significantes ($p=0,21$) (Figura 2, Tabela 1).

Células em proliferação e vasos neoformados: houve um aumento significativo ($p=0,007$) no número de células em proliferação no Grupo 1, pois elas responderam em média por 12,18% do total, em comparação com 7,34% no Grupo 2 (Figura 3, Tabela 2). Houve, igualmente, um aumento significativo ($p=0,0001$) no número de vasos neoformados na camada reticular da derme no Grupo 1, no qual eles foram contados na faixa de 6,27 vasos por campo, em média, em comparação com 3,07 vasos por campo no Grupo 2 (Figura 4, Tabela 3).

Orientação das fibras colágenas: tanto no Grupo 1 como no Grupo 2, foi mantido o padrão usual de fibras colágenas longitudinais principais paralelas à superfície e de fibras oblíquas e transversais secundárias direcionadas para a superfície da pele, apenas com um leve desarranjo. Não foi observada diferença importante entre os grupos (Figura 5).

DISCUSSÃO

Sejam temporários ou definitivos, os enxertos autólogos de pele são muito importantes e adequados para a cobertura cutânea de praticamente qualquer tipo de perda adquirida ou traumática. Na maioria dos casos, os enxertos de pele se integram sem contratempos, mas às vezes eles se perdem devido a uma variedade de causas locais ou gerais. Desde que a saúde geral do paciente seja boa e o leito receptor seja adequado, o cirurgião pode escolher entre enxertos de espessura parcial ou total e entre enxertos fragmentados, em malha ou em lâmina. Em qualquer caso, uma vez terminado o procedimento e a região enxertada protegida com um curativo adequado, pouco resta a fazer além de esperar pelo resultado, em média cinco a sete dias depois,

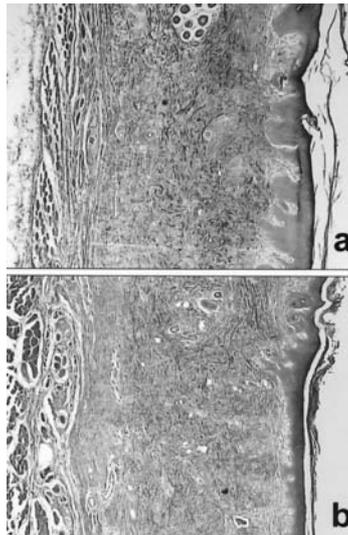


Figura 2 - Cortes histológicos transversais mostrando a tendência ao aumento da espessura da epiderme do enxerto irradiado (a), em comparação com o controle (b) (Tricrômico de Gomori, 25x).

Tabela 1 - Área de epiderme e da derme (μm^2) nos enxertos irradiados e de controle.

	Epiderme		Derme	
	Irradiado	Controle	Irradiado	Controle
Mediana	220.641	173.664	2.164.660	2.102.330
Média \pm DP	246.392 \pm 92.394	200.626 \pm 77.576	2.157.730 \pm 411.701	2.109.150 \pm 501.475

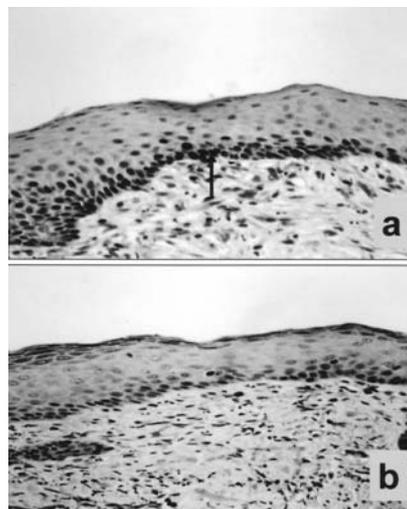


Figura 3 - Cortes histológicos transversais mostrando o aumento da concentração de células em proliferação na camada basal (seta) do enxerto irradiado (a), em comparação com o controle (b) (PCNA, 400x).

Tabela 2 - Porcentagem (%) de células em proliferação por campo, em relação ao número total de células.

	Irradiado	Controle
Média \pm DP	12,18 \pm 3,01	7,34 \pm 1,9

quando o curativo é removido. Em cerca de 20% dos casos, o enxerto de pele total sofre algum grau de necrose, na maioria das vezes afetando as camadas granular, lúcida e córnea, em cujo caso o enxerto se integra, embora com resultado cosmético comprometido. Quando a camada basal ou germinativa e a camada de células fusiformes são afetadas, o enxerto está completamente perdido, havendo necessidade de um novo procedimento reparativo.

O UST é usado para tratar uma variedade de condições patológicas do sistema músculo-esquelético⁽²⁾, mas muito pouco é conhecido sobre seus efeitos sobre a pele. Entretanto, há evidências de que ele estimula o processo de cicatrização de lesões cutâneas, pois Dyson et al.⁽⁹⁾ mostraram efeitos benéficos do UST pulsado (0,5 W/cm², aplicações de 5 minutos por dia em dias alternados por 21 dias, começando no 14º dia pós-operatório) sobre a cicatrização de lesões acometendo a espessura total da pele, produzidas na orelha de coelhos; de acordo com esses autores, o UST acelerou o processo de cicatrização nas suas fases iniciais, mas nenhuma diferença foi observada após o 35º dia, em comparação com as lesões não tratadas. Ainda, Dy-

son e Suckling⁽²⁾ utilizaram UST pulsado (0,8 MHz, 0,2 W/cm², aplicações diárias de 5 minutos) para tratar úlceras varicosas do membro inferior e referiram diminuição significativa da área

das lesões, resultado relatado igualmente por Roche e West⁽¹⁰⁾ com diferentes parâmetros de UST (3 MHz, 1 W/cm²) para úlceras com áreas menores que 5 cm². Ivanov⁽¹²⁾ declarou em um comunicado curto que o UST acelera a integração e melhora o resultado de enxertos de pele fixados no leito receptor com cianoacrilato. Entretanto, até o momento os fenômenos biológicos envolvidos na reação de enxertos de pele à irradiação ultra-sônica não estão inteiramente esclarecidos, o que motivou a presente investigação experimental, com particular atenção ao estímulo à proliferação das células germinativas e de vasos neoformados.

No modelo experimental utilizado, o enxerto de pele de espessura total foi preferido ao de espessura parcial, porque no primeiro a espessura fica padronizada desde o começo, além do que os de espessura total são de integração mais difícil, facilitando a detecção dos efeitos do UST e a comparação entre os enxertos irradiados e os de controle. O procedimento foi realizado na região escapular por duas razões: primeiro, essa região está fora do alcance do próprio animal, portanto mais protegida de qualquer contaminação; segundo, a pele dessa região apresenta características tegumentares mais apropriadas ao estudo, incluindo sua espessura. Os leitos receptores foram cuidadosamente preparados, com particular atenção à hemostasia e prevenção de hematomas que

poderiam descolar o enxerto do leito e causar sua necrose. Os enxertos foram suturados às bordas dos leitos para manter suas dimensões originais e para permitir a aplicação do curativo compressivo tipo tie-over de Brown, o qual era removido no terceiro dia para o início da irradiação com o UST; numa situação clínica em humanos, esse curativo usualmente é removido após uma semana, quando o enxerto já está cicatrizado no leito.

A irradiação com o UST foi iniciada já no terceiro dia pós-operatório, pois é nessa fase precoce que a cicatrização tecidual pode ser acelerada⁽⁹⁾. Além disso, a irradiação usualmente é aplicada ao redor do defeito cutâneo, para estimular a cicatrização a partir da periferia da ferida para o centro, mas na presente investigação ela foi aplicada diretamente sobre o enxerto, com o objetivo de estimular a neoformação vascular a partir do leito receptor e a proliferação celular tanto deste como do próprio enxerto. O enxerto foi adequadamente protegido durante a irradiação para evitar descolá-lo do leito, o que certamente resultaria em sua necrose; por outro lado, o material utilizado para protegê-lo (vaselina líquida, filme de PVC) não têm qualquer influência sobre o seu metabolismo e não interfere com sua integração⁽¹⁴⁾. O UST pulsado foi regulado com a frequência de 3 MHz e intensidade de 0,5 W/cm² pois é com esses parâmetros que são obtidos os efeitos fisiológicos mais marcantes. De fato, é com as altas frequências que são atingidos apenas os tecidos mais superficiais e é com as baixas intensidades que os efeitos térmicos do UST são minimizados, ao mesmo tempo em que suas demais propriedades são enfatizadas. Ainda mais, o cabeçote ultra-sônico era mantido constantemente na posição vertical em relação à superfície do enxerto e em contato total com ele, sendo continuamente movimentado para evitar a formação de zonas de aquecimento localizado que pudessem lesá-lo⁽¹⁵⁾.

Os resultados da irradiação foram analisados propositalmente numa fase ainda precoce da integração, no

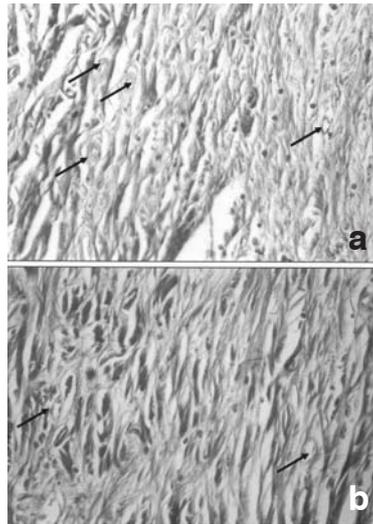


Figura 4 - Aumento da concentração de vasos neoformados (setas) na derme de enxerto irradiado (a) em comparação com o controle (b) (tricroômico de Gomori, 400x).

Tabela 3 - Número de vasos sanguíneos por campo.

	Irradiado	Controle
Média ± DP	6,27 ± 2,59	3,07 ± 1,75

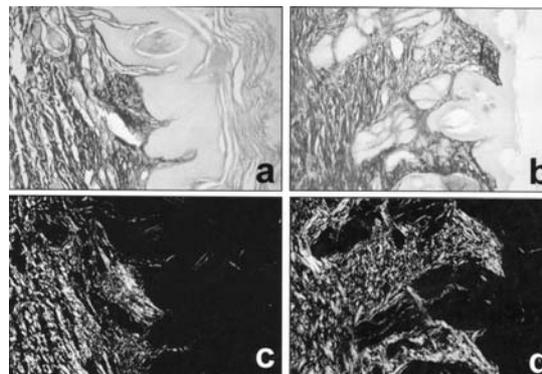


Figura 5 - Cortes histológicos corados (epiderme à direita e derme à esquerda) examinados com luz direta (a e b) e polarizada (c e d), mostrando a ausência de diferença na orientação das fibras colágenas no enxerto irradiado (a e c) e no controle (b e d) grafts (Picrosirius, 100x).

10º dia pós-operatório e após sete sessões de irradiação. Durante esse período, a integração do enxerto, que é muito rápida nos ratos, ainda é um processo em andamento e no qual as diferenças entre os enxertos irradiados e os de controle são mais evidentes; numa fase mais avançada, com os enxertos completamente integrados, praticamente não há mais diferenças entre eles, inclusive a estimulação da proliferação celular e a neo-angiogênese. Embora não espetacular, os resultados obtidos foram conclusivos em demonstrar que o UST de fato estimulou a proliferação celular na camada germinativa da epiderme, como visto nos cortes histológicos corados com o PCNA⁽¹⁶⁾, e a neoformação de vasos sanguíneos na camada reticular da derme, como já descrito anteriormente⁽¹⁷⁾, uma reação que certamente favorece a integração do enxerto. Entretanto, o aumento altamente significativo na proliferação celular ($p=0,007$) não implicou em aumento correspondente na área da epiderme, a qual apresentou apenas uma tendência a aumentar ($p=0,07$), o que provavelmente significa que há outros fatores que afetam a integração dos enxertos de pele. Os dados da morfometria da derme (número de células e área) não foram significativamente diferentes entre os enxertos irradiados e os de controle ($p=0,21$). Além disso, nenhuma diferença foi observada em relação à orientação das fibras colágenas nos dois grupos experimentais (coloração pelo Picrosirius), o que significa que ela não se altera de maneira importante nos enxertos de pele, de modo geral.

Os autores concluem que o UST estimulou alterações morfológicas em nível celular, resultando no aumento da proliferação da camada germinativa, na formação de novos vasos sanguíneos e numa integração mais precoce do enxerto cutâneo de espessura total, um efeito que pode ser útil em situações clínicas em humanos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Marcelo de Almeida Mantilla, médico residente de Cirurgia Plástica, pelo auxílio na definição do modelo experimental e na execução das operações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Coakley WT. Biophysical effects of ultrasound at therapeutic intensities. *Physiotherapy*. 1978; 64:166-9.
- Dyson M, Suckling J. Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. *Physiotherapy*. 1978; 64:105-8.
- Dyson M. Therapeutic applications of ultrasound. In: Nyborg WL, Ziskin MC. *Biological effects of ultrasound*. New York: Churchill Livingstone; 1985. p.121-33.
- Dyson M. Role of ultrasound in wound healing. In: Kloth LC, Miller KH. *Wound healing*. Philadelphia: F. A. Davis; 1990. p.259-85.
- Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics*. 1990; 28:175-80.
- Maxwell L. Therapeutics ultrasound: its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. *Physiotherapy*. 1992; 78:421-6.
- Haar G. Basic Physics of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. 1978; 64:100-3.
- Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods*. 2005; 142:185-92.
- Dyson M, Pond JP, Joseph J, Warwick R. The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. *Clin Sci*. 1968; 35: 273-85.
- Roche C, West JA. A controlled trial investigating the effect of ultrasound on venous ulcers referred from general practitioners. *Physiotherapy*. 1984; 70:475-7.
- Riet G, Kessels AG, Knippschild P. A randomized clinical trial of ultrasound in the treatment of pressure ulcers. *Phys Ther*. 1996; 76:1301-11.
- Ivanov VV. Use of ultrasonics in the fixation of autologous skin transplants. *Vestn Khir Im I I Grek*. 1987; 139:110-1.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immuno localization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*. 1990; 162:258-94.
- Docker MF, Patrick MK, Foulkes DJ. Ultrasound couplants for physiotherapy. *Physiotherapy*. 1982; 68:124-5.
- Warren CG, Koblaski JN, Sigelmann RA. Ultrasound coupling media: their relative transmissivity. *Arch Phys Med Rehabil*. 1976; 57:218-22.
- Gebauer GP, Lin SS, Beam HA, Vieira P, Parsons R. Low intensity pulsed ultrasound increases the fractures callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *J Orthop Res*. 2002; 20:587-92.
- Young SR, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. *Ultrasound Med Biol*. 1990; 15: 251-9.