

## Artigo original

# Análise qualitativa histo-diferenciada do processo de reparo da pele de *Rattus Norvegicus* tratados por ultra-som terapêutico pulsado de 3.0 Mhz

## *Histo-differentiated qualitative analysis of healing process of skin in *Rattus Norvegicus* treated with 3.0 MHz pulsed therapeutic ultrasound*

Glauco Alexandre Gaban, Ft.\*; Glória Maria Moraes Vianna da Rosa, M.Sc.\*\*; Walker André Chagas, D.Sc.\*\*\*; Lúcia Helena Orofino da Silva, M.Sc.\*\*\*\*; Leonardo Davi Pistarino Pinto, Ft.\*\*\*\*\*; Sandoval Lages da S. Sobrinho\*\*\*\*\*; Isabel da Cunha Barbosa Leite, M.Sc.\*\*\*\*\*; Ubirajara Peçanha Alves\*\*\*\*\*; Odir de Souza Carmo, M.Sc.\*\*\*\*\*

.....  
 \*Prof. de Histologia da UNIG e Cinesioterapia da UNIG e FESO (Teresópolis), \*\*Profª Titular de Termoterapia e Cinesioterapia da UGF, \*\*\*Prof. Titular da Área de Histologia e Embriologia da UGF, \*\*\*\*Profª Assistente da Área de Histologia e Embriologia da UGF, \*\*\*\*\*Prof. de Cinesioterapia da FESO, \*\*\*\*\*Prof. Titular de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da UGF, \*\*\*\*\*Profª e responsável técnica do Biotério da UGF, \*\*\*\*\*Diretor administrativo do Centro de Pesquisas Biomédicas Gonzaga da Gama Filho, \*\*\*\*\*Prof. Diretor do Curso de Fisioterapia da UGF

### Resumo

A aceleração do reparo tecidual pode propiciar a prevenção de inúmeras complicações associadas à perda de sua continuidade. Estudos utilizando o ultra-som (US) terapêutico têm demonstrado seu efeito benéfico sobre a regeneração de tecidos e, para a análise de seus efeitos sobre a concentração dos diferentes tipos celulares e componentes da matriz extracelular, durante o processo de reparo cutâneo, foi realizado um estudo histo-diferenciado, utilizando-se técnicas de coloração especiais na pele de 20 *Rattus Norvegicus* 5 dias após terem sido submetidos à incisão cutânea experimental. Os animais foram divididos em 5 grupos, sendo um grupo controle e quatro grupos sonados com diferentes intensidades, tendo como resultados menor quantidade de PMN (polimorfonucleares) e ausência de mastócitos granulosos no local da incisão nos animais sonados, quantidades de colágeno similares em todos os grupos embora mantendo, no grupo sonado, um padrão de organização cicatricial mais próximo do normal. O sistema elástico não apresentou recuperação levando-se a concluir que o US acelera o processo de reparo da pele de ratos, influencia no padrão de organização das fibras colágenas, sem, contudo parecer atuar na recuperação do sistema elástico na fase do reparo analisada.

**Palavras-chave:** cicatrização de feridas, colágeno, terapia por ultrassom, coloração.

### Abstract

The acceleration of the tissue repair can prevent a lot of complications associated to the loss of its continuity. Studies using therapeutic ultrasound (US) have demonstrated beneficial effect in the tissue regeneration. With the objective of analyzing its effects on the concentration of different cellular types and the extracellular matrix component during cutaneous repair process, a histo-differentiated study was carried out, using special stain techniques in the skin of 20 *Rattus Norvegicus*, 5 days after cutaneous incision. The animals were divided in 5 groups, a group control and four groups treated with different intensities of US. Were observed a decreasing of polymorphonuclear cells and absence of granular mast cell at the place of incision in animals treated with US, similar quantities of collagen in all the groups although maintaining, in the group treated with US, a closer to normal organization pattern. The elastic system did not present recovery. Was concluded that US accelerates the repair process in mice's skin, influences the pattern organization of collagen fibers, without acting in the recuperation of elastic system in the analyzed phase repair.

**Key-words:** wound healing, collagen, ultrasonic therapy, stain.

Recebido em 15 de abril de 2005; aceito em 12 de fevereiro de 2007.

**Endereço para correspondência:** Glória Maria Moraes Vianna da Rosa, Av. Oliveira Botelho, 504 Alto 25960-001 Teresópolis RJ, Tel: 26423545, [glrosa@terenet.com.br](mailto:glrosa@terenet.com.br)

## Introdução

A habilidade do organismo em reparar lesões é um dos pré-requisitos da integridade física. A aceleração do processo de cicatrização tecidual permite diminuir o tempo de permanência do paciente no leito, minimizando uma série de complicações como infecções hospitalares, assim como permite seu retorno mais rápido às atividades laborativas.

Nas últimas décadas, pesquisas têm sido realizadas visando desenvolver equipamentos e também metodologias que auxiliem os processos naturais de reparo de forma a obter um melhor e mais eficaz resultado no tratamento de sistemas biológicos [1]. Vários estudos, utilizando o ultra-som (US) terapêutico, têm demonstrado seu efeito benéfico sobre a regeneração de tecidos [2-4] e síntese das proteínas [5]. Contudo, a literatura sobre esses efeitos ainda é incompleta e muito conflitante [6].

Este trabalho tem por objetivo, através de um estudo histo-diferenciado, analisar, qualitativamente, os efeitos do US terapêutico de 3.0 MHz pulsado em intensidades diferentes sobre a concentração dos diferentes tipos celulares e componentes da matriz extracelular da pele de ratos em processo de cicatrização.

## Material e métodos

A amostra constou de 20 *Rattus Norvegicus* (variedades Wistar) adulto-jovens, machos não consangüíneos e com cerca de 200g. Estes foram mantidos em caixas apropriadas, 1 animal por caixa, em biotério com ciclo de luz / escuro de 12/12 horas e cerca de 24 a 28 °C, recebendo ração balanceada (*Purina*). A manipulação e procedimentos com os animais obedeceram aos princípios do Comitê de Ética para o uso de animais em pesquisa da Universidade Gama Filho (UGF). Os animais sofreram anestesia gasosa por inalação de éter etílico seguido por tricotomia em região lateral de membro pélvico. O ato cirúrgico consistiu de incisão cutânea cortante e transversal, com 2cm de extensão seguida por rafia com fio de mononylon 5.0 com pontos equidistantes.

As patas tratadas receberam ultra-som de 3.0MHz nas proporções apresentadas no quadro I.

**Quadro I** - Detalhamento quanto à composição e características dos animais em estudo.

	Intensidade	Taxa de Repe- tição	Tempo
Grupo 1	0.3 w/cm <sup>2</sup>	10%	2 min
Grupo 2	1.0 w/cm <sup>2</sup>	20%	2 min
Grupo 3	1.0 w/cm <sup>2</sup>	10%	4 min
Grupo 4	1.0 w/cm <sup>2</sup>	10%	2 min
Grupo controle	Sofreram as mesmas aplicações, porém com o aparelho desligado.		

O ultra-som utilizado foi o Sonacel Expert de 3.0 MHz, da Bioset Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda, com área efetiva

de irradiação de 0,8 cm<sup>2</sup> com 100Hz de frequência de pulso sônico, sendo calibrado em balança de precisão acústica UPM.

A técnica de aplicação foi realizada de forma direta, com gel para acoplamento estéril, hipoalergênico e quimicamente inerte fabricado por Pointer Química Industrial Ltda.

Os movimentos do transdutor foram realizados longitudinal à lesão com velocidade 1cm/seg, de acordo com a indicação de Byl *et al.* [7].

Os fragmentos da pele do animal foram obtidos sob anestesia gasosa por inalação de éter etílico através de incisão elíptica em torno da ferida cirúrgica, com margem de segurança de 0,5 cm e excisão interessando o segmento de pele compreendendo a cicatriz.

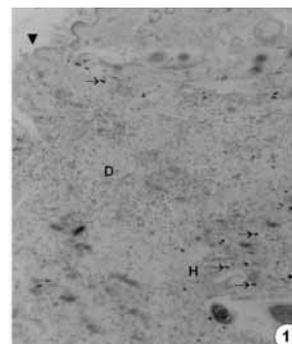
O material sofreu o tratamento padrão para análise histológica, sendo fixado com formol a 10%, lavado em álcool e incluído em parafina, segundo Bancroft & Stevens [8]. A clivagem foi realizada perpendicularmente à ferida, com cerca de 2 mm de espessura, cortes em micrótomo rotativo, tipo Minot com 5µm de espessura, corados com série de 5 cortes por lâmina, pelos Métodos Dominici, para evidenciar mastócitos, neutrófilos e eosinófilos; Picro Sirius Red para observar fibras colágenas; Tánzer Unna – Orceína para evidenciar fibras elásticas e Perls para evidenciar macrófago com hemossiderina [8]. A análise foi feita em microscópio óptico Binocular Leitz Ortholux e os parâmetros observados foram: presença de polimorfonucleares (PMN), de mastócitos e de macrófagos, fibroplasia, grau de densidade e de organização do colágeno e neoformação de fibras elásticas.

## Resultados

### Mastócito

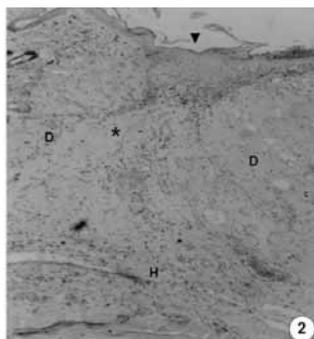
No grupo controle e no grupo 01, os mastócitos revelaram-se com menor volume a nível dérmico e mais volumoso a nível hipodérmico, sendo que, na hipoderme a congestão vascular estava presente com mastócitos mais constantes, comparados aos demais grupos (Figura 1). Nos demais grupos sonados, o método revelou ausência de mastócitos granulados na área cicatricial, porém, esta ausência foi melhor observada no grupo 04 (Figura 2).

**Figura 1** - Fotomicrografia óptica de pele de rato do grupo controle corado pela Técnica. de Dominici.



Observa-se mastócitos (→) dérmicos (D), ao lado do processo cicatricial da incisão (▼), menores e em menor quantidade do que os mastócitos (→) hipodérmicos (H), estes, próximos de vasos sanguíneos congestionados (VS). 40X.

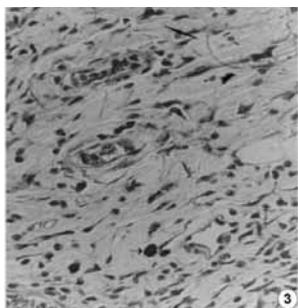
**Figura 2** - Fotomicrografia óptica de pele de rato do grupo 04 corado pela técnica de Dominici.



Verifica-se a epiderme hipertrófica no local da incisão (▼) e na região dérmica fibrose cicatricial intensa (D) e ausência de mastócitos junto da incisão (\*) e presença de apenas uma célula mastocitária (→) na região hipodérmica (H). 40X Macrófagos

No grupo controle, no qual houve uma congestão periférica mais intensa e um maior extravasamento hemorrágico, os macrófagos, em atividade fagocitária apresentaram-se em maior quantidade. Os grupos sonados revelaram a presença de macrófagos com hemossiderina (Figura 3).

**Figura 3** - Fotomicrografia óptica de pele de rato do grupo 04 corado pela Técnica de Perls.

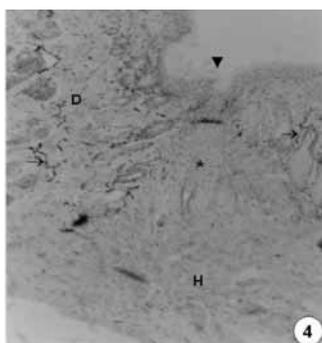


Observa-se macrófagos positivos para hemossiderina (→). 400X

### Fibras elásticas

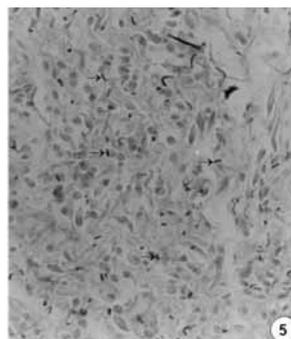
A incisão rompeu as fibras elásticas e o processo cicatricial não evidenciou fibroplasia elastogênica (Figura 4), o que se observou no local são fragmentos de fibras pré-existentes (Figura 5).

**Figura 4** - Fotomicrografia óptica de pele de rato do grupo 01 corada pela Técnica de Taenzer-Unna.



Observa-se que a trama elástica (→) dérmica (D) desfaz-se na área cicatricial da incisão (\*) Local da incisão (▼). Região hipodérmica (H).

**Figura 5** - Fotomicrografia óptica de pele de rato do grupo 04 corada pela Técnica. de Tánzer-Unna.

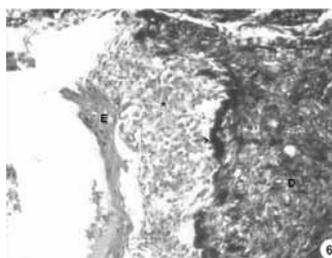


Vê-se fragmentos de fibras elásticas pré-existentes positivos (→) esparsos na cicatriz incisional. 400X

### Colágeno

A fibroplasia foi relativamente igual em todos os animais em estudo e o picro sírius permitiu observar poucos colágenos novos, no local da lesão, em todos os animais em estudo em contraste com o colágeno dérmico já existente. O padrão de organização colágena, contudo, mostrou-se mais próximo do normal apenas nos animais dos grupos 2, 3 e, principalmente, nos do grupo 4. Em um animal do grupo 04 inclusive, evidenciou-se fibras colágenas antigas a nível dérmico ligadas as poucas fibras colágenas subepidérmicas imaturas com tumefação nas áreas de fusão (Figura 6).

**Figura 6** - Fotomicrografia óptica de pele de rato do grupo 04 corada pela Técnica de Picro Sírius.



Vê-se a epiderme (E), uma área subepidérmica (\*) regenerativa predominando fibroblasto com poucas fibras colágenas imaturas, confrontando-se com derma (D) preservado em cuja interface sofreram tumefação (→). 100X

### Polimorfonucleares

Apresentou-se em maior quantidade no grupo controle e no grupo 01, próximo da área cicatricial e nos exsudatos formados nas fendas incisionais.

### Discussão

No processo de reparo, a fase inflamatória é marcada pela infiltração de neutrófilos, monócitos e células T. Cada tipo de célula parece ter papel importante nesse processo. Neutrófilos limpam os debris e micróbios de ferida; macrófagos são importantes na fagocitose de células apoptóticas e são

fonte de fatores de crescimento para estimular a proliferação e a regeneração da lesão tecidual, segundo Leibovic e Ross, citados por Egozi *et al.* [9]. O papel das células T não está totalmente claro, mas parece ser capaz de regular as fases tardias do reparo [10,11].

Evidências sugerem que os mastócitos, encontrados no tecido conectivo, com mais frequência na pele e próximos a vasos sanguíneos e linfáticos [9,12-14], têm papel chave no reparo de feridas, influenciando o recrutamento de neutrófilos na fase inflamatória. No trabalho de Egozi *et al.* [9] foi observada uma diminuição no recrutamento dos neutrófilos nos animais com deficiência de mastócitos no primeiro e terceiro dias pós-lesão.

Com respeito à ativação funcional, o mastócito da pele, o qual está estrategicamente localizado entre vasos e nervos, é estimulado diretamente por sinais imunológicos (citocinas IgE e frações complemento) e por estímulos de origem nervosa, segundo autores citados por Noli e Miolo [15].

As células endoteliais em torno da lesão, uma vez ativadas pela inflamação, liberam substâncias químicas que aumentam a migração, proliferação e diferenciação de mastócitos, como observado por Metcalfe *et al.* e Baghestanian *et al.*, citados por Noli e Miolo [15].

Os mastócitos, então, desgranulam e diminuem drasticamente em número, em poucas horas após a lesão, tendo seus níveis normalizados cerca de 48 horas [16-18].

Montenegro e Franco [19] descreveram que quando os mastócitos são estimulados, os grânulos aumentam de volume e fundem-se na parede da membrana celular abrindo-se para o interstício.

Os resultados do nosso trabalho não evidenciaram mastócitos granulados, próximo e no interior da incisão, na maioria dos animais que compõem os grupos sonados; o mesmo não ocorrendo com o grupo controle e com o grupo 1 cujos mastócitos, a nível hipodérmico, apresentaram-se inclusive mais volumosos que a nível dérmico. A hipoderme dos animais desses grupos apresentou-se com maior congestão do que a nível dérmico. A presença de mastócitos mais volumosos nessa região congestionada evidencia o estágio ainda inicial da fase inflamatória do processo de reparo tecidual.

As colorações especiais utilizadas também revelaram maior quantidade de polimorfonucleares (PMN) no grupo controle e no grupo 1, comparando-os aos animais dos grupos tratados com US por cinco dias na incisão cutânea, o que ratifica a afirmativa anterior já que os mastócitos quando estimulados proporcionam aumento no número de neutrófilos.

A menor quantidade de PMN associado à ausência de mastócitos granulados no local da incisão dos animais sonados, com doses mais elevadas, parece, então, indicar uma aceleração da fase inicial do processo de reparo tecidual concordando com os resultados dos trabalhos de Young e Dyson [20-22]. Com relação a quantidade de macrófagos, Young e Dyson [20] observaram maior quantidade destas células no grupo

controle comparado com o grupo sonado. Nossos resultados também demonstraram uma quantidade maior destas células fagocitárias no grupo controle, e pela técnica histológica utilizada, também, pudemos perceber maior extravasamento hemorrágico e atividade inflamatória nos animais do grupo controle e grupo 1.

Os resultados deste trabalho não detectaram grandes diferenças com relação à fibroplasia colagênica entre os grupos sonados e controle o que está de acordo com Kaurfman [23] e Loch *et al.* [24].

A coloração com Picro Sirius permitiu-nos observar presença de poucos colágenos novos no local da reparação da incisão em todos os animais em estudo.

Trabalhos como os de Egozi *et al.* [9] ressaltam que o conteúdo de colágeno tem seus níveis aumentados gradativamente, durante o processo de reparo, atingindo seu pico máximo em 10 a 14 dias pós-lesão. O tempo do trabalho de cinco dias pode não ter sido suficiente para promover a colagenização máxima.

Embora a fibroplasia não tenha demonstrado grandes diferenças, o padrão organizacional colagênico mostrou-se mais próximo do normal nos grupos sonados, principalmente no grupo 04 comparados ao grupo controle. Byl *et al.* [25] observaram o mesmo resultado nos grupos sonados com 0,5 w/cm<sup>2</sup> e 1,5 w/cm<sup>2</sup> tratados por três dias, não sendo, contudo as diferenças estaticamente significativas. Para Dyson [26] e Webster [4] o US também pareceu atuar no padrão de deposição do colágeno, assumindo a pele sonada, uma arquitetura tridimensional semelhante a não lesionada.

Com relação às fibras elásticas, os resultados deste trabalho, obtidos através do método de Orceína, não revelaram neoformação, no local da incisão, nos animais estudados no período observado.

É provável que o período de 5 dias tenha sido insuficiente para estimular a atividade elastogênica, já que nenhum animal do estudo apresentou neoformação de fibras elásticas. Por isso, torna-se precoce afirmar que o US não tem influência na produção das mesmas durante todo o processo cicatricial.

## Conclusão

O US parece realmente acelerar o processo de reparo evidenciado por um menor número de mastócitos granulados, de PMN e de macrófagos na maioria dos animais do grupo sonado. O período de 5 dias não se mostrou suficiente para alterar o conteúdo de novas fibras elásticas no grupo de animais em estudo, parecendo, desta forma, não ter o US ação sobre esse processo, durante o período em estudo, embora outros trabalhos tenham que ser desenvolvidos para melhor exploração deste efeito. Embora não havendo atividade fibroblástica colagênica intensa, o US parece influenciar no padrão organizacional do colágeno tornando a pele com uma aparência mais próxima da normal.

## Referências

1. Viljanto J. Biochemical basis of tensile strength in wound healing. *Acta Chir Scand Suppl* 1964; 333.
2. Dyson M, Pond JB, Joseph J, Warwick R. Stimulation of tissue repair by pulsed wave ultrasound. *IEEE Transaction on Sonics and Ultrasonics* 1968;17:133-40.
3. Dyson M, Franks C, Suckling J. Stimulation of healing varicose ulcers by ultrasound. *Ultrasonics* 1976;14:232-36.
4. Rosa GMMV, Chagas WA, Orofino LHS, Gaban GA, Pinto LDP, Sobreira RV et al. Análise histológica do processo de reparo da pele de *Rattus Norvegicus* (variedades Wistar) tratados por ultra-som terapêutico pulsado de 3 mhz. *Rev Bras Med Vet* 2003;25(2):80-85.
5. Webster DF. The effect of ultrasound on wound healing [thesis]. London: University of London; 1980.
6. Robertson VJ, Baker K. A review of therapeutic ultrasound: Effectiveness studies. *Phys Ther* 2001;81(7):1339-1358.
7. Byl NN, Mckenzie AL, Wong T et al. Incisional wound healing: a controlled study of low and high dose ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther* 1993;18:619-628.
8. Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. 4a ed. New York: Churchill Livingstone; 1996. 766p.
9. Egozi EI, Ferreira AM, Burns AL, Gamelli RL, Dipietro LA. Mast cell modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair Regen* 2003;11(1):46-54.
10. Barbul A, Regan MC. Immune involvement in wound healing. *Otolaryngol Clin North Am* 1995; 28:955-68.
11. Schaffer M, Barbuç A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg* 1998;85:444-60.
12. Galli SJ. New insight into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990; 62:5-33.
13. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, Deblois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:4464-68.
14. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 1989;7:59-76.
15. Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol* 2001;12:303-13.
16. Hebda PA, Coliins MA, Tharp MD. Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermatol Clin* 1993;11:685-696.
17. Persinger MA, Lepage P, Simard JP, Parker GH. Mast cell numbers in incisional wounds in rat skin as a function of distance, time and treatment. *Br J Dermatol* 1983; 108:179-87.
18. Trautmann A, Toksoy A, Engelhardt E, Brocker EB, Gillitzer R. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J Pathol* 2000;190:100-6.
19. Montenegro MR, Franco M (ed). *Patologia: processos gerais*. 3a ed. São Paulo: Atheneu; 1992.
20. Young SR, Dyson M. Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1990;16:809-16.
21. Young SR, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics* 1990;28(3):175-80.
22. Young SR, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. *Ultrasound Med Biol* 1990;16(3):261-9.
23. Kaufman GE, Miller MW, Griffiths TD, Ciaravino V, Carstenosn EL. Lysis and viability of cultured mammalian cells exposed to 1 MHz ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1977;3(1):21-25.
24. Loch EG, Fisher AB, Kuwert E. Effect of diagnostic and therapeutic intensities of ultrasonics on normal and malignant human cells in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1971;110(4):457-60.
25. Byl NN, Mckenzie AL, West JM et al. Low - dose ultrasound effects on wound healing: a controlled study with yucatan pigs. *Arch Phys Med Rehabil* 1992;73(7): 656-64.
26. Dyson, M. The effect of ultrasound on the rate of wound healing and the quality of scar tissue. In: Mortimer AJ, Lee N, eds. *Proceedings of the International Symposium on Therapeutic Ultrasound*. Winnipeg: Canadian Physiotherapy Association; 1981. p.110-123.