

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

JACQUES DE LIMA FERREIRA

**EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS
INDUZIDAS EM RATOS HIPERGLICÊMICOS**

**CURITIBA
2010**

JACQUES DE LIMA FERREIRA

**EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS
INDUZIDAS EM RATOS HIPERGLICÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Josuê Bruginski de Paula
Co-Orientador: Prof. Dr. João Antonio Palma Setti

**CURITIBA
2010**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

F383e
2010 Ferreira, Jacques de Lima
 Efeito do ultrassom terapêutico na cicatrização das feridas induzidas em
 ratos hiperglicêmicos / Jacques de Lima Ferreira ; orientador, Josuê Bruginski
 de Paula ; co-orientador, João Antonio Palma Setti. – 2010.
 111 f. : il. ; 30 cm

 Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
 Curitiba, 2010
 Bibliografia: f. 81-92

 1. Ultra-sonografia. 2. Cicatrização de feridas. 3. Diabetes. 4. Rato como
 animal de laboratório. I. Paula, Josuê Bruginski de. II. Setti, João Antônio
 Palma. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-
 Graduação em Tecnologia em Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 616.07543



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 126

Aos 27 dias de agosto de 2010 realizou-se a sessão pública de defesa da dissertação **"Efeito do Ultrassom Terapêutico na Cicatrização das Feridas Induzidas em Ratos Hiperglicêmicos."**, apresentada por **Jacques de Lima Ferreira** como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde – Área de Concentração – **Bioengenharia** perante uma Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

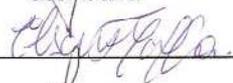
Prof. Dr. Josué Bruginski de Paula
PUCPR (Orientador)



assinatura

Aprovado
parecer (aprov/ reprov.)

Prof^ª. Dr^ª. Elisângela Ferretti Manfrea
PUCPR



APROVADO

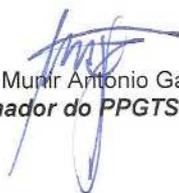
Prof^ª. Dr^ª. Djanira A. da Luz Veronez
UFPR



Aprovado

Conforme as normas regimentais do PPGTS e da PUCPR, o trabalho apresentado foi considerado Aprovado (aprovado/reprovado), segundo avaliação da maioria dos membros desta Banca Examinadora. Este resultado está condicionado ao cumprimento integral das solicitações da Banca Examinadora registradas no Livro de Defesas do Programa.

Prof. Dr. Munir Antonio Gariba,
Coordenador do PPGTS PUCPR



JACQUES DE LIMA FERREIRA

**EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS
INDUZIDAS EM RATOS HIPERGLICÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Josuê Bruginski de Paula
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Prof. Dr. João Antonio de Palma Setti
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Avaliador _____

IES _____

Avaliador _____

IES _____

Curitiba, _____ de _____ de 2010.

**“O HOMEM NÃO É NADA ALÉM DAQUILO QUE A EDUCAÇÃO FAZ DELE”
Immanuel Kant.**

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa a todas as pessoas que estiveram ao meu lado e que contribuíram direta ou indiretamente para que fosse realizada com dedicação e profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma especial, meu Orientador **Prof. Dr. Josuê Bruginski de Paula**, pelo incentivo, confiança, ensinamentos, competência e orientação durante a execução desta dissertação.

Ao meu Co-orientador **Prof. Dr. João Antonio de Palma Setti**, pelos valiosos ensinamentos, incentivos e apoio demonstrado durante toda jornada do Mestrado.

À **Profª. Dra. Thelma Alvim Veiga Ludwing**, do Laboratório de Ficologia do departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, que gentilmente permitiu o uso do laboratório para as fotomicrografias.

À **Profª. Dra. Elisangela Ferretti Manffra**, que participou e me ajudou com suas contribuições nas etapas do Mestrado.

Ao **Prof. Dr. Luiz Roberto Aguiar** que contribuiu com suas orientações em minha qualificação.

À **Profª. Dra. Sandra Honorato da Silva**, que com palavras de conforto e experiência me encorajou a realizar essa dissertação.

À **Profª. Dra. Marcia Regina Cubas**, que no início do Mestrado me incentivou a “escrever o meu nome nas estrelas”.

À **Profª. Dra. Marcia Olandoski**, que contribuiu com sua análise bioestatística.

À **Profª e amiga Maristela Palma de Oliveira**, que me ajudou e contribuiu para que eu fosse um “Fisioterapeuta” exemplar no período do Mestrado.

À **Profª e amiga Viviani de Marque Carrer**, que me ajudou e participou de todos os momentos do Mestrado. Querida amiga fica aqui registrado a minha gratidão por você ter me ajudado, me ouvido e principalmente por ter participado comigo desta jornada inesquecível que é a realização de um Mestrado.

À **Profª e amiga Adelita Gonzalez Denipote**, que esteve comigo participando e festejando das conquistas alcançadas no Mestrado.

À **Profª e amiga Lúcia Helena Linheira Bisetto**, que esteve comigo estudando, sorrindo e principalmente estando ao meu lado na hora de soltar o verbo em inglês.

Aos acadêmicos **Andressa Schuta, Bruna Burko Rocha e Misael Gomes Barbosa**, que contribuíram significativamente ao meu experimento de Mestrado. Deixo aqui minha gratidão e ajuda a todos vocês.

À **Profª e amiga Nara Maria Bernades Pasinato**, obrigado pela ajuda, por estar ao meu lado compartilhando e seguindo juntos o caminho do Mestrado que me leva a fazer parte do 1,7% da produção científica e intelectual que irá contribuir para o desenvolvimento do nosso país. Fica aqui registrado a minha admiração e carinho por você.

À **Profª e amiga Lucymara Carpim**, obrigado por tudo, por ter me ajudado nos momentos do Mestrado principalmente quando você tinha que fazer as “tarefas” da nova faculdade, obrigado pela força, pelas palavras amigas e acima de tudo por estar sempre ao meu lado. Deixo aqui a minha admiração por você como pessoa e como profissional.

À **Profª e amiga Margarete Virgínia Gonçalves da Silva**, você sabe o quanto eu te admiro como pessoa, como mãe, como profissional acima de tudo e agradeço sempre por encontrar em minha vida pessoas como você. Deixo aqui meu agradecimento pela ajuda na caminhada da pós-graduação.

À **secretária e amiga Erli Ivanilde Bianco**, minha querida Erli, como foi bom ter você ao meu lado nessa caminhada que é o Mestrado. Recomendo que todos façam Mestrado e que encontrem a primeira vista uma profissional como você. Agradeço por tudo do fundo do meu coração.

As companheiras, **Cleu e Mary** obrigado pela amizade, pelo companheirismo e acima de tudo obrigado por terem me ajudado a conquistar mais essa etapa em minha vida.

Ao meu amigo e companheiro de todas as horas **Dr. Giovani Cassol**, obrigado por tudo.

À minha Mãe, **Estela de Lima Ferreira**, “Eu tenho tanto pra lhe falar, mas com palavras não sei dizer, como é grande o meu amor por você...”

À minha Vó, **Maria Leonilda de Souza Melin**, obrigado Vozinha por tudo.

À minhas Tias **Anair e Leony** por estarem ao meu lado. Acredito que dias melhores virão e serão vocês as primeiras a fazerem parte desta conquista comigo.

Ao meu irmão **Everson de Lima Ferreira**, por ter contribuído pelo profissional que sou hoje.

A **todos os meus amigos do coração** que contribuíram diretamente ou não por esta jornada do Mestrado.

RESUMO

A cicatrização de feridas é um evento complexo que envolve a interação de diversos componentes celulares e bioquímicos. Vários fatores podem afetar a cicatrização, entre eles a diabetes, doença sistêmica que compromete a cicatrização quando não controlada e que diminui a síntese de colágeno, a fagocitose, a oxigenação dos tecidos, aumentando o risco de infecção e impedindo a reparação. O ultrassom terapêutico (UST) é um recurso utilizado para estimular a cicatrização de feridas. Estudos têm demonstrado que o UST interage com tecidos biológicos por meio de mecanismos relacionados aos efeitos térmico e mecânico. Apesar destas evidências, seu uso em feridas diabéticas não foi devidamente explorado como recurso terapêutico complementar. O objetivo desta pesquisa experimental foi avaliar a influência do ultrassom terapêutico na cicatrização de feridas em ratos diabéticos. Foram utilizados 96 ratos machos, da linhagem Wistar *albinus*, pesando entre 250 a 300g, divididos randomicamente em dois grupos: diabéticos (D) e não diabéticos (ND) respectivamente com 48 ratos em cada grupo. O estado diabético foi induzido pela droga Streptozotocina. Em todos os animais produziu-se uma ferida circular em região dorso-lombar, com um centímetro de diâmetro, usando-se um *punch*. Os dois grupos (D, ND) foram subdivididos formando quatro subgrupos com 24 animais em cada: diabéticos com ultrassom terapêutico (D/c), diabéticos sem ultrassom terapêutico (D/s), não diabéticos com ultrassom terapêutico (ND/c) e não diabéticos sem ultrassom terapêutico (ND/s). Estes subgrupos receberam a terapia ultrassônica uma vez ao dia, ou a simulação da aplicação com o aparelho desligado, desde 24 horas após o término do ato cirúrgico até o 14º dia. Aplicou-se UST na frequência de 3MHz, modo pulsado, intensidade de 0,5W/cm² e tempo de aplicação de 5 minutos sobre a ferida, utilizando-se a técnica de deslizamento. Os animais foram sacrificados, de acordo com as fases da cicatrização, no 3º, 7º e 14º dia e o material coletado foi submetido à análise histológica por microscopia óptica e pelo programa ImageProPlus®. Avaliou-se histomorfometricamente a extensão das feridas diabéticas e não diabéticas, a deposição de colágeno tipo I e III e a influência do UST no fluxo sanguíneo das feridas. Os resultados obtidos levaram à conclusão de que o UST pulsado influenciou o processo de cicatrização das feridas diabéticas e não-diabéticas que receberam o tratamento, promoveu uma maior predominância de colágeno tipo III e menor predominância de colágeno tipo I e não aumentou o fluxo sanguíneo no local da aplicação.

Palavras-chave: Ultrassom terapêutico; Cicatrização de feridas; Diabetes Mellitus; Ratos Wistar.

ABSTRACT

Wound healing is a complex event that involves the interaction of several biochemical and cellular components. Many factors can affect the healing process, among them, diabetes, a systemic disease that when uncontrolled compromises healing by decreasing collagen synthesis, fagocytosis, and tissue oxygenation increasing the risk of infection and impeding tissue repair. Ultrasound therapy (UST) is a resource utilized to stimulate wound healing. Studies have shown that UST interacts with biological tissue by means of mechanisms related to thermal and mechanical effects. Despite this evidence, its use in wound healing of diabetics has not been duly exploited as a complementary therapeutic technique. The objective of this study was to evaluate the influence of therapeutic ultrasound on wound healing in diabetic rats. We utilized 96 male Wistar *albinus* rats weighing from 250g to 300g, and randomly divided into two groups: diabetics (D) and non diabetics (ND), respectively, with 48 rats in each group. A diabetic state was induced using streptozotocin. A circular wound of one centimeter in diameter was produced in the dorsal lumbar region of each animal using the punch method. The two groups (D, ND) were subdivided forming four subgroups with 24 animals in each: diabetics using therapeutic ultrasound (D/c), diabetics without therapeutic ultrasound (D/s), non-diabetics with therapeutic ultrasound (ND/c), and non-diabetics without therapeutic ultrasound (ND/s). These subgroups received either ultrasound therapy once a day, or a simulation of the application with the equipment turned off, beginning 24 hours after the end of the surgical procedure and terminating on the 14th day. UST was applied over the wound at a frequency of 3MHz in a pulsating mode with an intensity of 0.5W/cm² and an application time of 5 minutes, utilizing a gliding technique. The animals were then sacrificed on the 3rd, 7th, and 14th day according to the healing phase and the collected material was sent for histological analysis by optic microscopy utilizing the ImageProPlus® program. The length of the wounds for diabetics and non-diabetics, the deposition of collagen type I and III, and the influence of UST on blood flow of the wound were evaluated histomorphometrically. The results obtained led us to the conclusion that pulsating UST did indeed influence the wound healing process in diabetics and non-diabetics that received the treatment, presenting predominance of type III collagen, lower predominance of type I collagen, and no increased blood flow in the area of application.

Keywords: Therapeutic ultrasound; Wound Healing; Diabetes Mellitus; Wistar rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Camadas principais da pele: epiderme, derme, hipoderme.....	20
Figura 2: Camadas da epiderme: basal, espinhosa, granulosa e córnea.....	21
Figura 3: Plexo Vascular superficial e plexo Vascular profundo.....	26
Figura 4: Fases da Cicatrização.....	28
Figura 5: Evolução do número relativo de células sanguíneas e fibroblastos nas fases sequenciais do processo de cicatrização.....	28
Figura 6: Equipamentos utilizados no experimento: A: Ultrassom Terapêutico; B: Fluxômetro a Laser; C: Microscópio óptico; D: Balancim e E: Termômetro Digital F: Glicosímetro.....	42
Figura 7: Grupos Experimentais.....	44
Figura 8: Indução a hiperglicemia. A: Droga Streptozotocina; B: Aplicação intraperitoneal da droga; C: Aferição da glicemia com o aparelho Accu-Chek; D: Resultado da glicemia.....	45
Figura 9: Animal anestesiado e posicionado em decúbito ventral, com região delimitada para o procedimento cirúrgico.....	46
Figura 10: Procedimento Cirúrgico. A: <i>Punch</i> ; B: Campo cirúrgico no local delimitado para o procedimento cirúrgico; C: Incisão circular na pele; D: Remoção do fragmento de pele.....	46
Figura 11: Ferida Cirúrgica, detalhe da ferida e fáscia muscular.....	47
Figura 12: Aferição do fluxo sanguíneo antes e após a cirurgia. A: regiões cervical e dorso-lombar. B: Fluxometria na região cervical. C: detalhe da fluxometria na ferida.....	48
Figura 13: Aplicação do UST. A: Aplicação do gel sobre a ferida; B: Aplicação da técnica de deslizamento; C: Detalhe da técnica de deslizamento.....	50
Figura 14: Mensuração da extensão da ferida apresentando os três campos direito, meio e esquerdo. Detalhe em vermelho representando o leito cicatricial no fundo da ferida.....	52
Figura 15: Fotomicrografia do animal do subgrupo D/s, no 14° dia. Vista panorâmica dos 3 campos únicos: Esquerdo, Médio e Direito formando a ferida com (aumento de 40x) e Coloração HE. Em destaque A: pele. B: Ferida. C:	

(Linha Vermelha) o traçado usado para mensuração da ferida.....	52
Figura 16: Gráfico 1- Com a evolução dos subgrupos em relação ao peso.....	58
Figura 17: Gráfico 2 - Comparação entre subgrupos em relação à diferença entre fluxometria pré e pós UST.....	65
Figura 18: Gráfico 3 - Extensão da ferida no 7º dia.....	67
Figura 19: Gráfico 4 - Colágeno tipo I.....	72
Figura 20: Gráfico 5 - Colágeno tipo III.....	72
Figura 21: Gráfico 6 - Evolução do peso dos subgrupos em relação aos dias.....	74
Figura 22: Gráfico 7 - Comparação do colágeno I, III e substância de fundo em relação aos dias do experimento.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação dos grupos D x grupo ND em relação à glicemia.....	54
Tabela 2: Subgrupos D/c e D/s em relação à glicemia.....	55
Tabela 3: Subgrupos ND/c e ND/s em relação à glicemia.....	56
Tabela 4: Comparação dos subgrupos em relação à variável peso.....	57
Tabela 5: Comparação entre os subgrupos nos momentos com diferença significativa em relação a variável peso.....	58
Tabela 6: Comparação entre os pesos nos momentos de avaliação do subgrupo D/c.....	59
Tabela 7: Comparação entre os pesos nos momentos de avaliação do subgrupo D/s.....	60
Tabela 8: Comparação intra subgrupos da Fluxometria entre os locais pele e ferida para cada momento de avaliação, pré e pós aplicação do UST.....	62
Tabela 9: Comparação entre subgrupos em relação à diferença entre a fluxometria pré e pós UST.....	64
Tabela 10: Comparação dos subgrupos dois a dois na ferida do 14º dia.....	64
Tabela 11: Extensão da Ferida dos subgrupos.....	66
Tabela 12: Extensão da Ferida no 7º dia.....	67
Tabela 13: Comparação dos subgrupos em relação ao percentual de colágeno no 3 dia.....	68
Tabela 14: Comparação dos subgrupos em relação ao percentual de colágeno no 7 dia.....	69
Tabela 15: Comparação dos subgrupos em relação ao percentual de colágeno no 14 dia.....	69
Tabela 16: Comparação dos subgrupos dois a dois em relação ao percentual de colágeno.....	70
Tabela 17: Momentos de avaliação dentro de cada subgrupo em relação do colágeno I e III.....	71
Tabela 18: Comparação dois a dois do colágeno I e III.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA - Comitê de Ética no uso de animais

D - diabético

D/c - diabético com ultrassom terapêutico

D/s - diabético sem ultrassom terapêutico

EGF - Fator de crescimento epidérmico

FGF - Fatores de crescimento fibroblástico

HE - Hematoxilina Eosina

ILs - Interleucinas

ND - não diabético

ND/c - não diabético com ultrassom terapêutico

ND/s - não diabético sem ultrassom terapêutico

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PPGTS - Programa de pós-graduação em Tecnologia em Saúde

PS - Picrosirius

TGFs - Fatores transformadores de crescimento

UST - Ultrassom terapêutico

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

Resumo	8
Abstract	9
Lista de Ilustrações	10
Lista de Tabelas	12
Lista de Abreviaturas e Siglas	13
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	18
1.1.1 Objetivo Geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 A Pele	20
2.2 Células presentes na Epiderme	22
2.3 Derme	23
2.3.1 Fibroblasto e Colágeno.....	24
2.3.2 Fibras Elásticas.....	25
2.3.3 Substância de Fundo.....	25
2.3.4 Vascularização.....	25
2.3.5 Vasos Linfáticos.....	26
2.3.6 Nervos.....	27
2.4 Cicatrização da Ferida	27
2.4.1 Fase Inflamatória.....	28
2.4.2 Fase Proliferativa.....	29
2.4.3 Angiogênese.....	30
2.4.4 Fase de Remodelagem.....	31
2.5 Diabetes e Cicatrização	32
2.6 Ultrassom Terapêutico	35
2.6.1 Definição.....	35
2.6.2 Características.....	35
2.6.3 Efeito Térmico.....	36
2.6.4 Efeito Mecânico.....	37
2.7 Mecanismo de Interação do Ultrassom com células e tecidos biológicos	38
3 MÉTODO	41
3.1 Linha de pesquisa	41
3.2 Locais de estudo	41
3.3 Materiais e Equipamentos	41
3.3.1 Ultrassom Terapêutico.....	41
3.3.2 Fluxômetro a Laser.....	41
3.3.3 Microscópio Óptico.....	42
3.3.4 Higrômetro e Termômetro digital.....	42
3.3.5 Glicosímetro.....	42
3.4 Amostra	43
3.5 Grupos Experimentais	43
3.6 Fases do Experimento	44

3.6.1	Indução a Hiperglicêmica	44
3.6.2	Procedimento Cirúrgico	45
3.6.3	Fluxometria a Laser.....	47
3.6.4	Aplicação do Ultrassom Terapêutico	49
3.6.5	Procedimento de Eutanásia.....	50
3.6.6	Coleta de Material e confecção das lâminas	50
3.6.7	Histomorfometria	51
3.6.8	Análise Estatística	52
4	RESULTADOS	54
4.1	Comparação dos grupos D e ND em relação à glicemia.....	54
4.2	Comparação intragrupo Diabéticos (D/c e D/s) em relação à glicemia	55
4.3	Comparação intragrupo Não Diabéticos (ND/c e ND/s) em relação à glicemia	56
4.4	Comparação dos pesos dos animais	57
4.5	Comparação intra-subgrupos do peso dos animais nos momentos de avaliação.....	59
4.6	Comparação da fluxometria entre os subgrupos.....	61
4.7	Comparação intra-subgrupos da Fluxometria entre os locais de aferição (pele e ferida), para cada momento de avaliação, pré e pós aplicação do UST	62
4.8	Comparação intragrupos da fluxometria entre os momentos de avaliação para um mesmo local de aferição (pele ou ferida) e condição pré ou pós-procedimento (cirurgia ou UST)	63
4.9	Comparação entre subgrupos em relação à diferença entre fluxometria pré e pós UST para um mesmo local de aferição e mesmo momento de avaliação.....	64
4.10	Comparação da extensão da ferida entre os subgrupos, nos momentos de avaliação 3º, 7º, 14º dia.....	66
4.11	Comparação entre os subgrupos em relação ao percentual de colágeno I, colágeno III e Substância de Fundo, nos momentos de avaliação 3º, 7º, 14º dia	68
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO A	93
	APÊNDICE A	95

1. INTRODUÇÃO

O complexo processo fisiológico na cicatrização de uma ferida é um fenômeno universal nos organismos vivos. Os danos na pele de qualquer natureza física, química ou biológica desencadeiam de imediato uma série de eventos. As tentativas do homem intervir neste processo remontam à antiguidade, a importância de proteger as feridas a fim de evitar complicações ao paciente vão muito além dos cuidados gerais ou da realização de um simples curativo. Os portadores de feridas desenvolvem com frequência sequelas com consequências sociais intensas, podendo ocorrer perdas de membros e funções, como no caso do pé diabético (BROUGHTON, JANIS e ATTINGER, 2006; HARVEY, 2005).

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença sistêmica importante que afeta adversamente a cicatrização e, quando não controlada, diminui a síntese de colágeno, a fagocitose, e aumenta o risco de infecção (MEARA *et al.*, 2000; WEINGARTEN *et al.*, 2005).

A hiperglicemia se refere a um grupo de desordens metabólicas complexas de carboidratos, lipídios e proteínas. Além da hiperglicemia a diabetes em estado crônico pode causar patologias como aterosclerose, desordens circulatórias, complicações cardíacas e renais (HARVEY, 2005).

Estima-se que 285 milhões de pessoas sofram de DM em todo o mundo, o que deve aumentar para 438 milhões em 20 anos. Na América Latina, o número estimado em 18 milhões deve aumentar 65%, chegando a quase 30 milhões de casos. O Brasil e o México estão entre os dez países com maior incidência do mundo, a prevalência hoje é de 6,4% da população brasileira (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

Visando minimizar os efeitos que a DM causa na cicatrização da ferida, buscam-se recursos terapêuticos que colaborem com a cicatrização. O Ultrassom Terapêutico (UST) é uma terapia utilizada para tratar lesões em diversos tecidos e pode ser uma opção na abordagem dos diabéticos.

Estudos evidenciaram os efeitos fisiológicos e os mecanismos de interação do efeito mecânico do UST sobre os tecidos vivos e verificaram seu efeito em feridas de

primeira e segunda intenção*, alterações na função da membrana celular, aumento da angiogênese e da permeabilidade vascular, estimulação da atividade fibroblástica e, conseqüentemente, aumento da síntese proteica e da tensão elástica do colágeno (KITCHEN e BAZIN, 1998; LOW e RED, 2001; VISARDI, 2007; WATSON, 2006).

Fyfe e Bullock (1985) investigaram alguns antecedentes históricos no desenvolvimento da interação entre o UST e os tecidos vivos. Atribui-se ao UST a capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo, a permeabilidade de membranas, a extensibilidade do tecido conjuntivo e a condução nervosa (FERREIRA e MENDONÇA, 2007).

O paciente diabético que apresenta complicações isquêmicas que podem ocorrer em áreas com a circulação comprometida por processos ateroscleróticos ou não. Este fenômeno ainda carece de explicações científicas, pois apesar de uma oxigenação adequada do sangue, pode não estar ocorrendo sua liberação no local da ferida (SUMITA e ANDRIOLO, 2008).

Esta condição parece estar vinculada ao estado hiperglicêmico dos diabéticos. Atribui-se ao UST a capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo no local de aplicação e faz-se necessário verificar se este fenômeno ocorre nas feridas diabéticas, já que poderia facilitar a permeabilidade das membranas celulares e auxiliar o processo cicatricial (BEM e KUNDE, 2006).

Experimentos têm demonstrado que o UST tem ação estimulatória sobre lesão de tecidos moles (SPEED, 2001), músculos (GOUVÊA; VIEIRAL e AMARA, 1998), enxertos de pele (AMÂNCIO, 2003), cicatrização por segunda intenção (MENDONÇA *et al.*, 2006), cicatrização tecidual (OLSSON *et al.*, 2008), anastomoses colônicas (GRECA *et al.*, 1999), regeneração de nervos (CRISCI, 2001) e úlceras venosas (RIET, KESSELS e KNIPSCHILD, 1996).

Publicações com trabalhos clínicos evidenciam o sucesso da regeneração tecidual na qual o tratamento com o UST foi utilizado na cicatrização de feridas. (AMÂNCIO, 2003; FERREIRA, 2005; OLSSON *et al.*, 2008; SPEED, 2001; STARKEY, 2001), e recomendam sua indicação como um método alternativo no tratamento em pacientes que apresentam dificuldades na cicatrização de feridas.

* Cicatrização por 1ª intenção - ferida limpa que recebe sutura; Cicatrização por 2ª intenção - ferida contaminada ou potencialmente contaminada, que não recebe sutura.

O movimento centrípeto dos limites da ferida em direção ao centro é chamado de contração, ocorre gradualmente com o objetivo de diminuir a área lesada a ser recoberta pelo epitélio de proliferação. A contração da ferida é desejável em pacientes diabéticos, pois reduz o risco de infecções e de perdas metabólicas (KAMAMOTO, 2007).

Pesquisas experimentais avaliaram histomorfometricamente feridas e verificaram em seus estudos que a histomorfometria possibilita verificar o processo de contração da ferida, avaliando assim, se o UST influenciou no processo fisiológico na contração da ferida diabética (HIRAOKA, 2007; KAMAMOTO, 2007; ORPHEU, 2008).

No paciente diabético a cicatrização apresenta diminuição do colágeno tipo III, falha na epitelização e na neovascularização. A deposição de colágeno do tipo III na ferida diabética revela a capacidade de cicatrização que poderá ocorrer na fase de remodelagem, quando será substituído por colágeno do tipo I, que por sua vez, tornar a ferida mais resistente e promove a sua contração. Estudos revelaram que a quantificação e a especificação do colágeno levam a uma melhor compreensão do complexo processo fisiológico na cicatrização de uma ferida (MEARA *et al.*, 2000).

A revisão de literatura evidenciou que são poucas as pesquisas realizadas com UST avaliando seu efeito mecânico em feridas diabéticas, pois a grande maioria dos trabalhos utilizou feridas hípidas e predominam aplicações com o UST no modo contínuo (NOLASCO, 1993).

Desta forma, esta pesquisa experimental pretende avaliar o efeito do UST no modo pulsado, até 14 dias de evolução, sobre o processo de cicatrização de feridas em ratos hípidos e hiperglicêmicos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

- Avaliar a influência do Ultrassom com frequência 3MHz no modo pulsado e intensidade de $0,5W/cm^2$ na cicatrização de feridas em ratos diabéticos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar histomorfometricamente a extensão das feridas em animais diabéticos e não diabéticos, utilizando a microscopia óptica e o programa de análise de imagens.
- Avaliar a deposição de colágenos tipos I e III no local das feridas.
- Avaliar a influência do ultrassom terapêutico no fluxo sanguíneo das feridas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e faz parte do sistema tegumentar. Contém uma camada de queratina que impede a desidratação excessiva e funciona como barreira protetora entre o corpo e o ambiente. A pele apresenta diferentes tipos de receptores sensoriais com terminações periféricas de nervos sensitivos que atuam como um grande receptor para as sensações gerais de dor, pressão e tato, bem como no mecanismo de regulação da temperatura. A pele exerce inúmeras funções na proteção dos tecidos contra a invasão de organismos estranhos, lesões físicas, químicas e biológicas. Protege contra radiação ultravioleta e atua na conversão de moléculas precursoras em vitamina D e na excreção de água através das glândulas sudoríparas (GUYTON e HALL, 2006; MANDELBAUM, DI SANTIS e SANT'ANA MANDELBAUM, 2003; TAZIMA, VICENTE e MORIYA, 2008).

A pele é constituída por duas camadas principais, epiderme e derme (Figura 1). A epiderme, ou cutícula (ectoderme), é a camada que está em contato com o meio externo sendo formada por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado. A derme (mesoderme) é a camada que fica sob a epiderme sendo formada por tecido conjuntivo. Abaixo da derme existe outra camada chamada de hipoderme, constituída por tecido adiposo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2007).

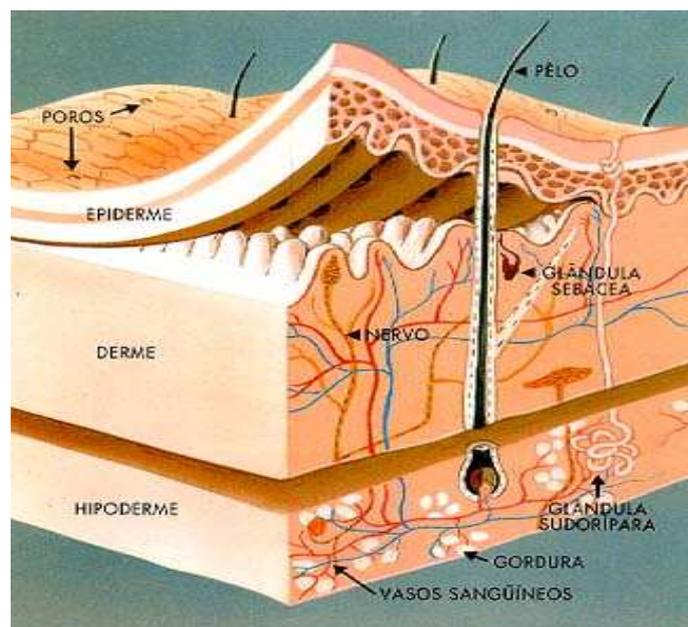


Figura 1 - Camadas principais da pele: epiderme, derme e hipoderme.
Fonte: cienciahoje.uol.com.br/.../images/che/pele2.jpg

A epiderme é formada de camadas distintas, definidas pelas alterações que envolvem a formação de queratina e graus crescentes de diferenciação dos queratinócitos. Da profundidade para a superfície a epiderme é formada pelas camadas basal, espinhosa, granulosa e córnea (Figura 2). As células viáveis e nucleadas das camadas da epiderme têm ciclo celular de 26 dias, sendo 13 dias o tempo necessário para a migração e diferenciação até a camada córnea, e mais 13 dias o tempo de eliminação das escamas córneas à superfície. Esse evento permite a renovação de toda a pele em cerca de 70 dias (MANDELBAUM, DI SANTIS e SANT'ANA MANDELBAUM, 2003).

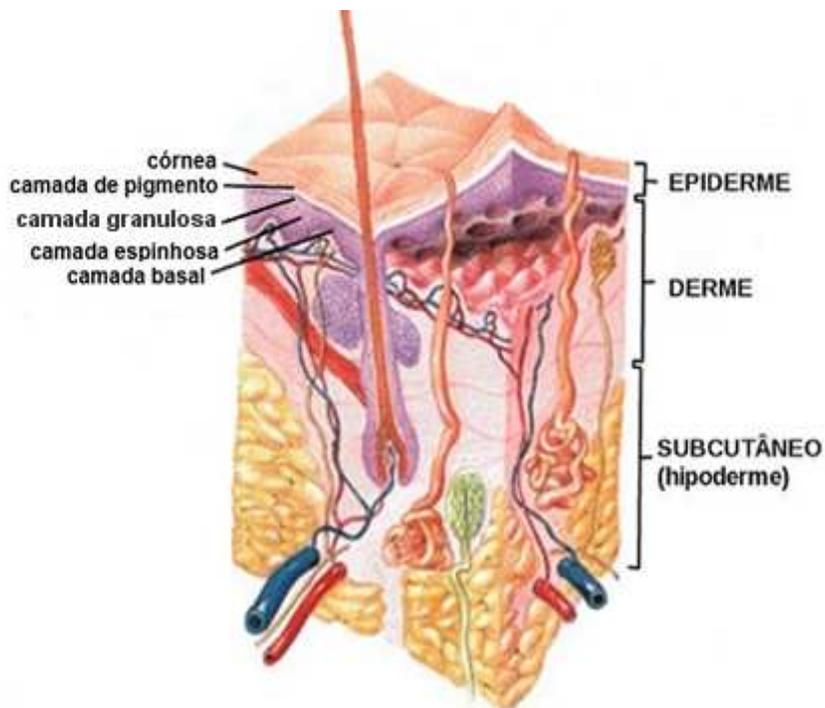


Figura 2 - Camadas da epiderme: basal, espinhosa, granulosa e córnea.
 Fonte: <http://upload.histologia.org/bsmmed/commons/3/34/Skin.jpg>

Camada Basal ou Germinativa: É o extrato mais profundo, formado por células colunares mitoticamente ativas, dando origem às demais células epidérmicas. São células com citoplasma escasso e por vezes pigmentadas, pela transferência de melanina a partir dos melanócitos vizinhos. Colada à camada basal encontra-se a membrana basal. As células basais fixam-se umas às outras através de desmossomos, e à membrana basal por meio de hemidesmossomos. A membrana basal separa a epiderme e a derme, regula a passagem de moléculas e células e influencia o comportamento dos queratinócitos (GOGIA, 2003; IRION, 2005; KEDE e SABATOVICH, 2004).

Camada Espinhosa: Tem esse nome porque a membrana plasmática dos queratinócitos se retrai durante o processo histológico, mas não os desmossomos. Dessa forma, ao microscópio óptico, essas pontes celulares são vistas como “espinhos” entre os queratinócitos. Esse estrato tem várias camadas de células, com queratinócitos de citoplasma amplo e eosinofílico. No estrato espinhoso iniciam-se fenômenos relacionados com a morte dos queratinócitos, incluindo a síntese de transglutaminase, essencial para a renovação da pele (IRION, 2005; JORGE e DANTAS, 2005).

Camada Granulosa: Na camada granulosa a principal característica morfológica é a presença de grânulos de querato-hialina que se coram intensamente pela hematoxilina, em azul profundo. Na camada espinhosa, e principalmente na granulosa, encontra-se os corpúsculos de Odland, com lipídios que, liberados, ajudam a manter uma superfície impermeável (JORGE e DANTAS, 2005).

Camada Córnea: A camada córnea é constituída basicamente de células mortas, aderidas à camada mediana através do colágeno e elastina. É formada por um Epitélio Estratificado Pavimentoso com camadas profundas que sofrem sucessivas mitoses, sendo chamadas de Germinativas ou de Malpighi. Conforme as células migram para a superfície são impregnadas por Queratina, uma proteína que protege contra a desidratação. A renovação celular constante da epiderme faz com que as células da camada córnea sejam gradativamente eliminadas e substituídas por outras. (GOGIA, 2003; KEDE e SABATOVICH, 2004).

2.2 Células presente na Epiderme

A pele é formada por duas camadas primárias e uma camada de gordura subcutânea. A epiderme é constituída principalmente de queratinócitos, nos seus vários estágios de diferenciação que irão compor a epiderme. É também formada por células epiteliais que proliferam continuamente promovendo a renovação celular. A epiderme é avascular, sua nutrição deriva dos capilares dérmicos e os nutrientes chegam a ela por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme (SAMPAIO e RIVITTI, 2001).

As células da epiderme são:

Melanócitos: Célula dendrítica que produz melanina. A melanina protege as células em mitose da camada basal contra os efeitos nocivos dos raios ultravioletas sobre o DNA. Nos cortes histológicos, os melanócitos aparecem por entre as células da camada basal com núcleo mais denso e menor que o dos queratinócitos (COSTIN e HEARING, 2007).

Células de Langherans: São células dendríticas abundantes na epiderme derivadas da medula óssea e fazem parte da linhagem macrófago-histiocitária. Aparecem na pele por volta da sétima semana gestacional. As células de Langherans são importantes elementos do sistema imunológico, estão presentes em outras áreas do corpo como nos linfonodos. No microscópio óptico, não é possível identificá-las com segurança, pois se parecem com linfócitos T e macrófagos que eventualmente permeiam a epiderme (JORGE e DANTAS, 2005).

Células de Merckel: As células de Merckel têm função sensorial de mecanorreceptores, associadas a terminações nervosas intraepidérmicas. Dessa forma, são mais numerosas em áreas de mãos, plantas dos pés e lábios. Situam-se geralmente logo acima da membrana basal, mas não podem ser identificadas ao microscópio óptico (GOGIA, 2003).

2.3 Derme

A derme ou córion é formada por fibras colágenas e fibras elásticas, sustenta a epiderme e envolve anexos cutâneos, vasos, nervos e músculos eretores do pelo. A derme não é simplesmente um envoltório, ela participa ativamente da nutrição cutânea, do sistema imune pelo tráfego seletivo de células inflamatórias e regula o tônus vascular. Pode ser dividida em duas camadas: a derme papilar e a derme reticular. A derme papilar é composta por fibroblastos, colágeno, fibras elásticas e reticulares. A derme reticular é mais espessa, composta por feixes de colágeno apresentando menor quantidade de fibroblastos. (GAWKRODGER, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2007; LAPLANTE *et al.*, 2001).

2.3.1 Fibroblastos e Colágeno

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo responsáveis pela síntese de colágeno. A porção papilar da derme contém maior número de fibroblastos do que na derme reticular. As fibras de colágeno são constituídas por colágeno tipo III e na derme reticular as fibras de colágeno são do tipo I (FREEDBERG *et al.*, 2005).

Os vários tipos de colágeno são proteínas complexas de alto peso molecular, composta de glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina, compreendendo pelo menos 20 variantes, codificadas por mais de sete cromossomos. Na derme, o colágeno é o elemento mais abundante, sendo fabricado principalmente pelos fibroblastos. As moléculas de pró-colágeno, em tripla hélice, passam da cisterna do retículo endoplasmático rugoso para o complexo golgiense, sendo então excretadas para o espaço extravascular através de vesículas. Só então, fora da célula, elas são convertidas em moléculas de colágeno. (FILHO *et al.*, 2007; FRAZIER *et al.*, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2003).

Na pele normal o colágeno é substituído continuamente, já em condição patológica, como nas feridas, há uma grande quantidade de fibras reticulares na qual os fibroblastos ativos formam novos colágenos em forma de fibras reticulares (FILHO *et al.*, 2007).

O colágeno tipo I está presente nos ossos, na pele, nos tendões, e nas cicatrizes maduras. Já o colágeno tipo II é encontrado nas cartilagens, e o tipo III no tecido embrionário, pele, nos vasos sanguíneos, no útero e no trato intestinal.

Colágeno tipo I: É o principal componente da pele e dos ossos, tem como unidade básica o tropocolágeno que é uma macromolécula de colágeno tipo I, semiflexível, de 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro em sua unidade básica. O colágeno tipo I é composto por três cadeias polipeptídicas, sendo que duas cadeias se enrolam entre si formando a chamada tripla hélice. O colágeno tipo I possui alta força tênsil com elasticidade limitada (VISNARDI, 2007).

Colágeno tipo III: Também conhecido como reticulina, formado por fibras reticulares com 1-4 μ m de diâmetro, as fibras deste tipo de colágeno apresentam certa elasticidade, e por isso são sempre encontradas em órgãos de forma variável, como intestino, útero e nas artérias (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2007).

2.3.2 Fibras Elásticas

As fibras elásticas são responsáveis pela elasticidade da pele, onde não são numerosas e se associam intimamente às fibras colágenas, às quais ficam entrelaçadas. As fibras elásticas cedem facilmente a trações mínimas, porém retornam facilmente a sua forma original, sendo capazes de distender duas vezes o seu tamanho normal. Elas são produzidas pelos fibroblastos e são polipeptídeos compostos de elastina, a proteína mais resistente do organismo, sendo encontrada em pequena quantidade na pele. Aparecem frouxamente dispostas em todas as direções da derme proporcionando elasticidade para a pele (CLARK, 1990; GAWKRODGER, 2002).

2.3.3 Substância de Fundo

A substância de fundo é comum a todos os tecidos do corpo, formando o meio para os elementos celulares e as fibras, além de transportar água e eletrólitos. É composta principalmente de fibronectina e glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de dermatan), sintetizados por fibroblastos e possivelmente por células musculares lisas e mastócitos. Os glicosaminoglicanos perfazem cerca de 0,2% do peso seco cutâneo, mas são os responsáveis por quase todo o peso da pele, uma vez que retêm água em mil vezes a seu volume (JORGE e DANTAS, 2005).

2.3.4 Vascularização

O fluxo sanguíneo é definido pela quantidade de sangue que passa por um dado ponto na circulação em um determinado período. A função do fluxo sanguíneo é a de atender às necessidades dos tecidos, transportando nutrientes, oxigênio, removendo produtos de excreções, levando hormônios e mantendo a temperatura corporal. O fluxo sanguíneo na pele determina a perda de calor pelo corpo e, assim, ajuda a controlar a temperatura corporal (GUYTON, 2006).

A partir dos vasos perfurantes do músculo esquelético e subcutâneo, dois plexos vasculares ascendem até a derme: o plexo vascular profundo, na interface entre subcutâneo e derme reticular, e o plexo vascular superficial, que irriga a derme

papilar com um sistema capilar em candelabro, correspondendo às papilas dérmicas (Figura 3) (TONNESEN, FENG e CLARK, 1990).

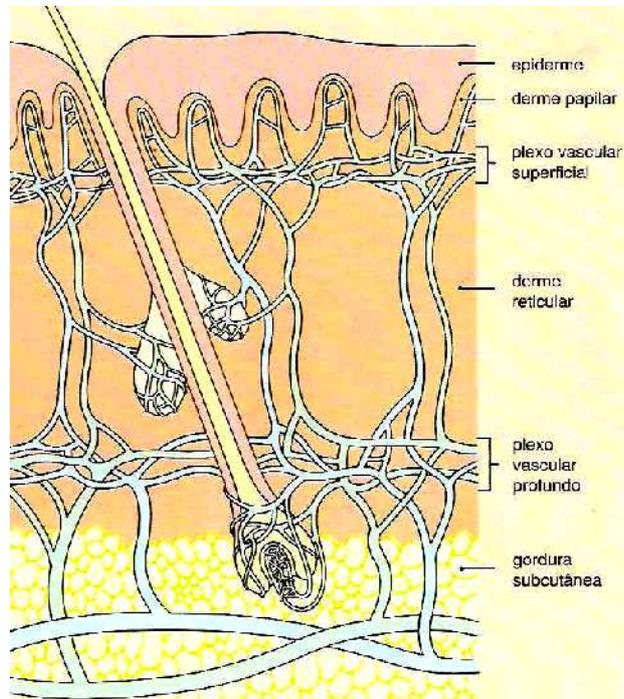


Figura 3 - Plexo vascular superficial e plexo vascular profundo.
 Fonte: <http://upload.histologia.org/bsmmed/commons/Skin.jpg>.

Em cada papila dérmica se localiza uma arteríola terminal, capilares arteriais e venosos e vênulas pós-capilares. No plexo vascular profundo localizam-se arteríolas musculares que se ramificam nas arteríolas do plexo superficial. Há numerosas anastomoses arteriovenosas na derme, criando atalhos que evitam os capilares. O plexo profundo situa-se na base da derme reticular e é composto por arteríolas e vênulas de paredes mais espessas. Há ligação íntima entre os plexos por meio dos vasos comunicantes, e o controle do fluxo sanguíneo dérmico por esses vasos contribui para o controle da temperatura corpórea. (TONNESEN, FENG e CLARK, 1990).

2.3.5 Vasos Linfáticos

Em condições normais é difícil identificar os vasos linfáticos da pele. No entanto, eles desempenham funções variadas e importantes, incluindo drenagem de *debris*, células e macromoléculas, participam da defesa contra microrganismos e são

canais de tráfego para as células de Langherans entre a pele e os linfonodos. (JORGE e DANTAS, 2005).

2.3.6 Nervos

A pele é importante meio de troca sensorial com o mundo exterior, sendo para isso ricamente innervada. Essa innervação compreende: um sistema eferente não mielinizado e um sistema aferente. O sistema eferente não mielinizado deriva da divisão simpática do sistema nervoso autônomo. Esse sistema modula as funções dos nervos, do músculo eretor do pelo, e das glândulas écrinas e apócrinas. As glândulas sebáceas não possuem innervação autônoma; sua função depende dos estímulos endócrinos. O sistema aferente é condutor da sensação cutânea através de órgãos sensoriais e terminais mucocutâneos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2007).

2.4 Cicatrização da Ferida

A cicatrização de uma ferida é conceituada como um conjunto de fases fisiológicas e bioquímicas que ocorrem no organismo, em resposta a uma agressão sofrida, finalizando com o reparo do tecido lesado. Após uma lesão, ocorre uma sequência determinada de eventos que levam à correção do defeito e à restauração da superfície da pele (FERREIRA *et al.*, 2007; HARDING, MORRIS e PATEL, 2002).

A cicatrização apresenta diferenças relacionadas com a profundidade da lesão. Feridas que acometem apenas parte da espessura da pele cicatrizam por reepitelização, enquanto as feridas que comprometem toda a espessura da pele podem cicatrizar tanto por primeira intenção como por segunda intenção. (FERREIRA *et al.*, 2007).

A primeira intenção refere-se ao fechamento cirúrgico de feridas limpas e estreitas. A cicatrização por segunda intenção exige uma coordenação entre hemostasia, inflamação, reepitelização, produção de tecido de granulação, contração da ferida e remodelação do tecido cicatricial (GAWKRODGER, 2002).

A regeneração tecidual é a restauração perfeita da arquitetura do tecido lesado envolvendo um processo complexo que apresenta sinais bioquímicos, interações entre células e mediadores químicos (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BAUM e ARPEY, 2005).

Os eventos da cicatrização ocorrem de forma dinâmica sob o ponto de vista morfológico, podendo ser divididos em três fases: fase inflamatória, proliferativa e de remodelagem ou maturação (Figura 4 e 5) (GILLITZER e GOEBELER, 2001).

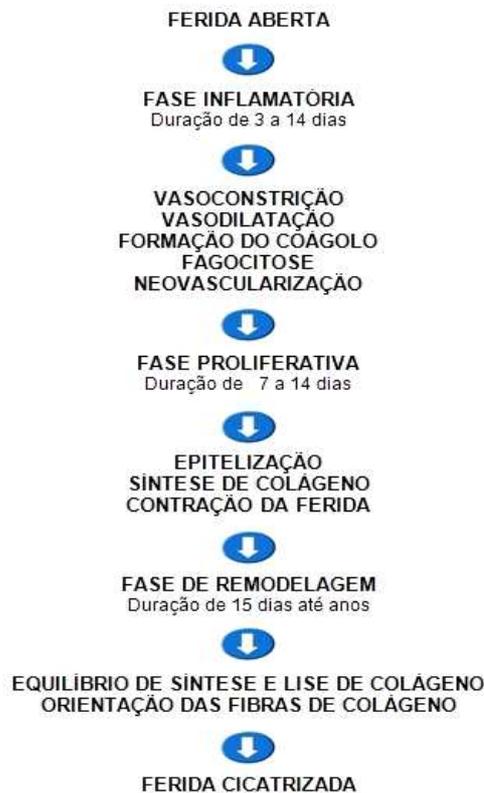


Figura 4 - Fases da Cicatrização. A duração de cada fase varia conforme a literatura consultada.

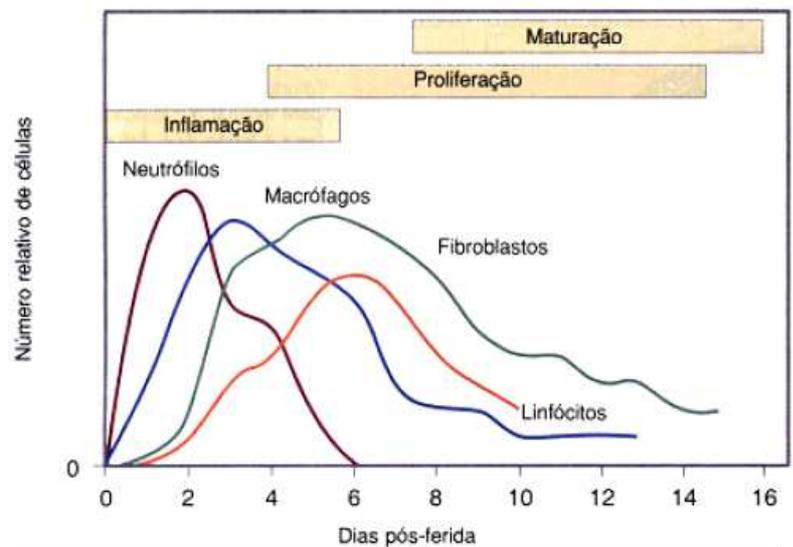


Figura 5 - Evolução do número relativo de células sanguíneas e fibroblastos nas fases sequenciais do processo de cicatrização. Fonte: Tazima M.F.G.S, Vicente Y.A.M.V.A, Moriya T (2008).

2.4.1 Fase Inflamatória

A fase de hemostasia e de inflamação inicia-se com a ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de sangue. A lesão de vasos sanguíneos é seguida rapidamente pela ativação da agregação plaquetária e da cascata de coagulação, resultando na formação de moléculas insolúveis de fibrina que promovem a hemostasia (LI, CHEN e KIRSNER, 2007; TAZIMA, VICENTE e MORIYA, 2008).

O sangramento traz consigo plaquetas, hemácias e fibrina, selando as bordas da ferida. A hemostasia acontece pela agregação das plaquetas e pela ativação da cascata de coagulação juntamente com a formação da rede de fibrina. O coágulo formado estabelece uma barreira impermeabilizante que protege a ferida. Com a lesão tecidual, há liberação local de histamina, serotonina e bradicinina que causam vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (TAZIMA, VICENTE e MORIYA, 2008).

As primeiras células que se apresentam ao sítio da lesão são as plaquetas. Elas possuem a propriedade hemostática e secretam vários mediadores envolvidos na cicatrização. O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), dentre outras funções, atrai e ativa macrófagos e fibroblastos no sítio da lesão (EMIMG, KRIEG e DAVIDSON, 2007; SCHUNCK, NEUMANN e PROKSCH, 2005).

Os mediadores vasoativos e os fatores quimiotáticos são produzidos pela cascata de coagulação que ativa o sistema complemento e as células do parênquima lesado. Os neutrófilos e os monócitos chegam à ferida com a função de debridar as superfícies da lesão e fagocitar as partículas antigênicas e os corpos estranhos. A fase inflamatória é caracterizada pela presença de leucócitos na área da lesão. Nas primeiras horas os neutrófilos participam ativamente do processo de cicatrização da ferida. Eles caracterizam a primeira defesa celular, eliminando partículas estranhas e destruindo microrganismos por fagocitose e pela liberação de enzimas (GILLITZER e GOEBELER, 2001; LI, CHEN e KIRSNER, 2007).

Os mastócitos e os fatores quimiotáticos liberados durante a fase de hemostasia são responsáveis pelo aparecimento dos neutrófilos e dos monócitos na lesão (EMIMG, KRIEG e DAVIDSON, 2007; GILLITZER e GOEBELER, 2001).

Mastócitos e os fatores quimiotáticos são importantes para induzir a migração e proliferação celular. Quando migram para a ferida, os monócitos transformam-se em macrófagos ativos, constituindo-se como as células predominantes na fase inflamatória. O macrófago também ativa os elementos celulares das fases subsequentes da cicatrização tais como fibroblastos e células endoteliais. (MILLER E NANCHAHAL, 2005; HARVEY, 2005).

2.4.2 Fase Proliferativa

A fase proliferativa, ou fase fibroblástica, tem a duração de 12 a 14 dias ou de até quatro semanas (HATANAKA e CURI, 2007). Esta fase é composta por três eventos importantes na cicatrização da ferida: neoangiogênese, fibroplastia e epitelização. A intensa migração e a proliferação dos fibroblastos favorecem a produção de colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular que contribuem para a formação do tecido de granulação (HARVEY, 2005; WERNER e GROSE, 2003).

Os fibroblastos migram para a matriz provisória e estimulam a síntese proteica que se transforma em uma matriz rica em colágeno, proteoglicanos e elastina. Os fibroblastos adquirem condições fenotípicas de miofibroblastos e participam do processo de contração da ferida. Os miofibroblastos são as células primárias responsáveis pela contração da ferida (WELCH, ODLAND e CLARK, 1990). Os fatores quimiotáticos que atraem os fibroblastos são derivados dos macrófagos que estão presentes na ferida, eles estimulam os fibroblastos em torno da ferida e se proliferarem. O fibroblasto só aparece no sítio da lesão a partir do 3º dia quando os leucócitos polimorfonucleares já realizaram a limpeza da ferida. (CLARK, 1990).

A função dos fibroblastos é sintetizar colágeno, que se organiza em cadeias longas de três feixes polipeptídicos em forma de hélice. A síntese de colágeno é dependente da oxigenação das células e da sustentação da força tênsil da cicatriz (TAZIMA, VICENTE e MORIYA, 2008).

Na fase fibroblástica a diminuição do pH e da pressão parcial de oxigênio na ferida modulam a migração e a proliferação dos fibroblastos. Além desses fatores, moléculas estruturais da matriz extracelular provisória também contribuem sobre a maneira da formação do tecido de granulação na fase proliferativa (LI, CHEN, e KIRSNER, 2007).

O número de fibroblastos na ferida diminui à medida que uma quantidade suficiente de colágeno é produzida. O desaparecimento dos fibroblastos marca o fim da fase fibroblástica e o início da fase de maturação da cicatrização (TAZIMA, VICENTE e MORIYA, 2008).

2.4.3 Angiogênese

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos necessários para prover nutrientes e oxigênio ao tecido cicatricial. É necessária para a cicatrização, pois permite que as células inflamatórias cheguem ao local da ferida para auxiliar no processo de reparação. Em todas as feridas, a resposta à lesão na pele, depende das células endoteliais que iniciam o processo angiogênico (SAARISTO *et al.*, 2006).

O processo de angiogênese é fundamental para eventos fisiológicos como a embriogênese, funções reprodutivas e cicatrização.

De acordo com Li, Chen e Kirsner (2007), o processo de angiogênese pode ser dividido em quatro etapas: degradação da matriz extracelular adjacente, migração, proliferação e alinhamento das células endoteliais para a formação do tubo capilar.

Desta forma, vasos da derme se dilatam, vasos estes que fornecem células endoteliais para a formação de brotos capilares. As células endoteliais penetram na membrana basal e por meio de liberação de enzimas proteolíticas degradam a matriz extracelular. Isto permite a migração de células guiadas por um agente quimiotático que leva um estímulo angiogênico para as células endoteliais que passam a ser multiplicadas formando tubos capilares. No estágio de proliferação os fatores de crescimento fibroblástico (FGF), as interleucinas (ILs), os fatores transformadores de crescimento (TGFs) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) estão envolvidos na proliferação endotelial que leva ao alinhamento das células endoteliais para a formação de um tubo capilar (LI, CHEN, e KIRSNER, 2007; SAARISTO *et al.*, 2006).

Os novos vasos formam-se a partir de brotos endoteliais sólidos e têm-se demonstrado que as lamininas são as proteínas mais importantes da matriz para o processo angiogênico (LI, CHEN, e KIRSNER, 2007). Quando a ferida é preenchida por tecido de granulação a angiogênese cessa e muitos dos vasos sanguíneos formados desintegram-se por apoptose.

2.4.4 Fase de Remodelagem

Essa fase é também chamada de maturação, dura aproximadamente duas a quatro semanas, dependendo do local e tamanho da ferida. A cicatriz formada durante a fibroplasia é uma estrutura densa e aumentada de fibras de colágeno, as quais são altamente desorganizadas (TAZIMA, VICENTE e MORIYA, 2008).

A maturação da ferida inicia durante há terceira semana e tem como característica um aumento da resistência sem um aumento na quantidade de colágeno. A fase de remodelagem é a mais longa fase do processo de cicatrização. Sua duração depende de variáveis como idade, estado nutricional do indivíduo, local da ferida, tipo de lesão e duração do processo inflamatório e proliferativo (SIMÕES *et al.*, 2005).

Durante a fase de remodelagem ocorrem mudanças na forma, tamanho e resistência da cicatriz. Pelo processo de cicatrização, o novo colágeno é produzido enquanto o colágeno antigo é degradado. Para uma formação normal de cicatriz, essa síntese e lise ocorrem de modo balanceado (CALIANO e JAKUBEK, 2006).

O arranjo das fibras de colágeno no tecido cicatricial é desorganizado e bastante diferente daquele do tecido circundante. O remodelamento do colágeno permite que o tecido cicatricial aleatoriamente depositado seja arranjado tanto em orientação linear como lateral (TAZIMA, VICENTE e MORIYA, 2008).

No período de um ano ou mais, a lesão cicatrizada assume características prévias à lesão, constituindo-se basicamente de colágeno tipo I. Em um mês, a força tênsil readquire 40% do estado original e pode continuar aumentando por um ano ou mais (BRADLEY, CLULLUM e SHELDON, 1999; LI, CHEN, e KIRSNER, 2007).

2.5 Diabetes e Cicatrização

O termo “cicatrização anormal de feridas” refere-se à incapacidade de uma ferida progredir através das fases da cicatrização. A cicatrização anormal pode manifestar-se na fase de inflamação, proliferação ou remodelagem.

Avaliar e tratar pacientes com feridas diabéticas requer cuidados específicos. Numerosas doenças sistêmicas podem afetar a cicatrização, direta ou indiretamente. A diabetes não controlada diminui a síntese de colágeno, a fagocitose e aumenta o risco de infecção. Outro fator importante da doença é a neuropatia diabética, aumentando a suscetibilidade de lesão em membro inferior e perda da sensibilidade. A diabetes também comumente causa aterosclerose, resultando em insuficiência circulatória (HOLST e DEACON, 2007).

Defeitos na fase inflamatória do tecido cicatricial, edema acentuado, reduzida proliferação vascular e endotelial e poucos elementos celulares na cicatriz, apontam que a cicatrização diabética está relacionada a uma grande rede de fatores que podem possibilitar ou não o processo de cicatrização (BLAKYTNY e JUDE, 2006; CAVALLINI, 2006; WAUGH e SHERRATT, 2007).

O paciente diabético diante da cicatrização apresenta interrupção da inflamação (BREM e TOMIC-CANIC, 2007), falha na contração da ferida (SIVAN-LOUKIANOVA *et al.*, 2003), falha na epitelização (GREENHALGH, 2003), falha na

produção e interligação do colágeno (KOMESU *et al.*, 2004) e na neovascularização (KIRCHNER *et al.*, 2003).

O paciente com diabetes pode apresentar macroangiopatia e microangiopatia. A macroangiopatia caracteriza-se pela diminuição da circulação sanguínea nos vasos de maior calibre e a microangiopatia caracteriza-se pela diminuição da circulação sanguínea nos pequenos vasos devido ao seu estreitamento. Morfologicamente apresenta espessamento difuso das membranas basais (KALANI *et al.*, 2003; KRISHNAN *et al.*, 2007).

A progressão da doença vascular pode atingir níveis tão graves de redução do fluxo sanguíneo que pode ocorrer dano tissular com o aparecimento de feridas, úlceras e gangrenas (FALANGA, 2005; HESS, 2003; PIAGGESI *et al.*, 2003).

A hemoglobina glicada, também denominada hemoglobina glicosilada, glicohemoglobina, conhecida ainda como HbA1C e, mais recentemente, apenas como A1C, é considerada hoje como um dos métodos mais fidedignos de avaliação do estado diabético. Embora seja utilizada desde 1958 como uma ferramenta de diagnóstico na avaliação do controle glicêmico em pacientes diabéticos, a dosagem da A1C passou a ser cada vez mais empregada e aceita pela comunidade científica após 1993, depois de ter sido validada através dos dois estudos clínicos (DCCT - *Diabetes Control and Complications Trial* - 1993 e UKPDS - *United Kingdom Prospective Diabetes Study* - 1998), considerados os mais importantes sobre as complicações crônicas do diabetes e a avaliação do impacto do controle glicêmico (SUMITA e ANDRIOLO, 2008).

A manutenção do nível de A1C abaixo de 7% é considerada como um dos principais objetivos para controlar a diabetes. As duas pesquisas citadas a cima indicaram que as complicações crônicas começam a se desenvolver quando os níveis de A1C estão acima de 7%. Sociedades médicas adotam, inclusive, como metas terapêuticas mais rígidas de 6,5% para os valores de A1C (SUMITA e ANDRIOLO, 2008).

A A1C é um componente menor da hemoglobina, sendo encontrada em indivíduos adultos não diabéticos em uma proporção de 1% a 4% dos indivíduos normais. Os valores normais de referência vão de 4% a 6%. Níveis de A1C acima de 7% estão associados a um risco maior de complicações crônicas (BEM e KUNDE, 2006).

A hiperglicemia prolongada promove o desenvolvimento de lesões orgânicas extensas e irreversíveis, afetando os olhos, os rins, os nervos, os vasos grandes e pequenos, assim como a coagulação sanguínea. Os níveis de glicose sanguínea quando persistem elevados são tóxicos ao organismo por três mecanismos diferentes: mediante a promoção da glicação de proteínas, de um estado de hiperosmolaridade e pelo aumento dos níveis de sorbitol dentro da célula (SUMITA e ANDRIOLO, 2008).

Uma série de pesquisas com ratos diabéticos induzidos por Streptozotocina tem sido realizada com a finalidade de investigar as deficiências na cicatrização, assim como possibilidades de acelerar este processo (ALMEIDA, FERREIRA e BÓSCOLO, 2002; CARDENAS, 2005; KVETNOI *et al.*, 2006; SATO *et al.*, 2006; SENNOUNE *et al.*, 2000; THULESEN *et al.*, 1997).

Goova *et al* (2001) e Peppa *et al* (2003) realizaram experimentos em camundongos e ratos diabéticos e verificaram que a cicatrização deficiente do animal diabético é devida a má formação de colágeno, defeitos no tecido de granulação e vasos sanguíneos.

Komesu *et al* (2004), em uma pesquisa experimental, avaliaram o processo de cicatrização da pele de ratos diabéticos durante a fase inflamatória da cicatrização e observaram que nestes animais a inflamação da ferida é lenta e tende a durar mais tempo, com uma menor densidade de neutrófilos na área de cicatrização até três dias após a cirurgia. Além disso, depois de três dias, quando os neutrófilos deveriam deixar a área da cicatriz para serem substituídos por macrófagos, em comparação com o grupo controle, os ratos diabéticos apresentaram maior número de neutrófilos.

2.6 Ultrassom Terapêutico (UST)

2.6.1 Definição

A utilização do ultrassom como recurso tecnológico teve início na Segunda Guerra Mundial para a detecção de submarinos pelo método ecopulso. Somente na década de 80 iniciou-se sua utilização e investigação na área da saúde, resultando em diversas formas de aplicações diagnósticas e terapêuticas. O primeiro efeito considerado para uso médico foi o aumento da temperatura nos tecidos biológicos submetidos ao campo acústico (KITCHEN e BAZIN, 1998).

Atualmente o UST tem sido muito utilizado em clínicas de fisioterapia e de medicina estética. O UST é uma vibração mecânica transmitida a uma frequência acima de 20 KHz, superior aos limites da audição humana. As ondas ultrassônicas causam agitação nas moléculas do meio em que estão se propagando, fazendo-as oscilar (TER HAAR, 1999).

A onda produzida pelo aparelho de ultrassom possui modo de emissão pulsado ou contínuo, frequência de 1 a 3 MHz e intensidade de 0 a 3,0 W/cm², ajustada pelo fisioterapeuta com a intenção de alcançar resposta terapêutica.

O UST é utilizado em úlceras venosas (PESCHEN *et al.*,1997), úlcera de pressão (MACDIARMID, BURNS e LEWITH, 1985), cicatrização tendinosa (TURNER *et al.*,1989), consolidação de fraturas (DUARTE e XAVIER, 1983), reparação de tecido ósseo animal (COLOMBO *et al.*,1991), regeneração muscular (MENEZES, 1997), estímulo à angiogênese (DIONISIO, 1998) e na melhora do tecido cicatricial (MENDONÇA *et al.*, 2006).

2.6.2 Características

O equipamento de UST consiste de um gerador de corrente elétrica de alta frequência, conectado a uma cerâmica piezo-elétrica sintética de titanato zirconato de chumbo, a qual se deforma na presença de um campo elétrico. A cerâmica encontra-se acoplada a uma peça metálica no interior do transdutor que converte energia elétrica em energia mecânica (ROBERTSON e BAKER, 2001). Sua unidade de intensidade é expressa em W/cm².

Os movimentos unilaterais do UST ocorrem em fluídos submetidos a um campo ultrassônico que originam forças e tensões que podem modificar a posição das partículas intra e extracelular ou até mesmo a configuração normal das células (HAAR, 1999).

As vibrações ultrassônicas requerem um meio elástico para se propagarem. Este meio irradiado oscila ritmicamente com a frequência do gerador ultrassônico ao comprimir e expandir a matéria, tratando-se de uma forma de energia mecânica que se propaga através de compressões e rarefações (BYL, *et al.*, 1993).

Para ocorrer à transmissão de ondas nos tecidos biológicos é necessário um meio acoplador, com a função de eliminar o ar entre o transdutor e o tecido, assegurando que a energia ultrassônica chegue ao tecido alvo (DALECKI, 2004; KITCHEN e BAZIN, 1998).

A velocidade de transmissão do som está relacionada com a composição do material e as características do meio que transmite a onda sonora. Os materiais mais utilizados para o acoplamento são água, géis e alguns óleos.

As ondas mecânicas produzidas pelo ultrassom causam movimento de pressão e descompressão produzindo um efeito de micromassagem (PRENTICE; QUILLEN e UNDERWOOD, 2004; TIPLER, 1991).

Quanto maior a frequência, menor é a penetração da onda. A frequência mais utilizada, e que melhor mostrou resultados em pesquisas em pele é a frequência de 3MHz, com até 5cm de penetração no tecido biológico (KITCHEN e BAZIN, 1998; LOW e REED, 2001; SORIANO; PÉREZ e BAQUÉS, 2003). Atualmente usa-se a frequência de 3MHz em lesões superficiais e 1MHz em lesões mais profundas nos músculos e ossos (PRENTICE; QUILLEN e UNDERWOOD, 2004).

Kitchen e Bazin, (1998) afirmam que os tecidos com alta quantidade de proteína absorvem mais energia rapidamente, quando comparado com tecidos de elevado teor de gordura ou água.

Quanto à intensidade, recomenda-se $0,5W/cm^2$ para acelerar o processo de cicatrização dos tecidos como pele, tendões e ossos (KITCHEN e BAZIN, 1998).

2.6.3 Efeito térmico

O aumento da temperatura nos tecidos causado pelas ondas do UST depende da intensidade de saída (W/cm^2) do equipamento e da duração do

tratamento e do modo de emissão de onda (STARKEY, 2001). O aquecimento ocorre devido às oscilações das partículas em torno de sua posição média, a energia cinética é convertida em energia térmica sendo esta proporcional à intensidade. O aumento da temperatura é mais facilmente obtido no modo contínuo. O efeito térmico pode atingir 5 cm ou mais de profundidade (WATSON, 2006).

O aquecimento do local atingido pelo UST depende do tipo de tecido, do fluxo sanguíneo que irriga o local e da frequência ultrassônica aplicada. Os tecidos proteicos como músculos e tendões absorvem mais energia do que os tecidos com alto teor de gordura, o calor pode ser dissipado pela corrente sanguínea e as altas frequências são absorvidas mais superficialmente (WATSON, 2006).

O aquecimento produz na pele um aumento do metabolismo celular, aumento do fluxo sanguíneo, redução da dor e de espasmos musculares, aumento da extensibilidade das estruturas de colágeno elevando a temperatura local até 45°C e auxilia no processo de cicatrização. A vasodilatação em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo causado pelo UST pode ser considerada em parte como um fenômeno protetor, destinado a manter a temperatura corporal dentro dos limites da normalidade (KITCHEN e BAZIN, 1998).

As causas que levam à dilatação podem estar relacionadas à liberação de estímulos tissulares em consequência da agressão celular causada pela vibração mecânica das ondas do UST (WATSON, 2006).

2.6.4 Efeito Mecânico

O efeito mecânico é priorizado quando se utiliza o modo pulsado. Durante a emissão pulsada o intervalo da onda facilita a dispersão do calor, com um efeito térmico menor e um efeito mecânico maior (BORGES, 2006; LOW e REED, 2001).

O efeito mecânico aumenta a permeabilidade da membrana, acelera as trocas metabólicas, desagrega complexos celulares e macromoléculas e estimula a liberação de aderências separando as fibras de colágeno (SORIANO; PÉREZ e BAQUÉS, 2003). Pode ser terapeuticamente significativo na estimulação da regeneração dos tecidos, reparo do tecido mole, fluxo sanguíneo em tecidos cronicamente isquêmicos, síntese de proteínas e reparo ósseo (KITCHEN e BAZIN, 1998).

2.7 Mecanismos de Interação do Ultrassom com células e tecidos biológicos

O ultrassom interage com os tecidos biológicos por meio de mecanismos térmicos e mecânicos que prevalecem de acordo com o modo de propagação da onda (CIVITELLO *et al.*, 2004; WATSON, 2006).

A absorção de parte da energia mecânica do ultrassom promove o aquecimento dos tecidos biológicos causando um aumento do fluxo sanguíneo local, aumento temporário na extensibilidade das estruturas colagenosas, como os tendões, ligamentos e cápsulas articulares; diminuição da rigidez articular, redução da dor e do espasmo muscular e produção de uma discreta reação inflamatória (KITCHEN e BAZIN, 1998).

Os efeitos fisiológicos e os mecanismos de interação do efeito mecânico do UST foram evidenciados em estudos, incluindo o de granulação de células de sustentação, alterações na função da membrana celular, aumento dos níveis intracelulares de cálcio, aumento da angiogênese e da permeabilidade vascular, estimulação da atividade fibroblástica e, conseqüentemente, aumento da síntese proteica e da tensão elástica do colágeno (KITCHEN e BAZIN, 1998; LOW e RED, 2001; STARKEY, 2001; WATSON, 2006).

As referências apoiam o uso da intensidade de 0,5 W/cm², ou até inferiores, para que seja acelerada a cicatrização de tecidos como a pele, ossos e tendões (DALECKI, 2004; FREITAS, 2007; LEUNG, NG e YIP, 2005; LOPES, 2006; ROBERSTON e BAKER, 2001; ROMANO, 2001; TER HAAR e COUSSIOS, 2007; WATSON, 2006).

Young e Dyson (1990) observaram os efeitos do ultrassom pulsado (0,1 W/cm², frequências de 0,75 e 3 MHz) em lesões de pele total em camundongos, com aplicações diárias de 5 minutos cada durante 7 dias, iniciando imediatamente após a produção da lesão. Concluíram que o UST pode acelerar o processo inflamatório do reparo e os estágios de proliferação celular em ambas as frequências utilizadas.

Lowe *et al* (2001) verificaram em seu experimento o modo pulsado com frequência 1 e 3 MHz, 0,5 W/cm², com 5 minutos de aplicação, na pele de camundongos com atraso no fechamento das feridas cutâneas obtido por exposição radioativa. Concluíram que o UST contribuiu com o fechamento da ferida com ambas as frequências.

Amâncio (2003) observou um aumento significativo no número de células em

proliferação na epiderme e neoformação vascular, com aceleração e melhora na integração de enxertos de pele total após irradiação com o UST pulsado (3 MHz, 05 W/cm², 5 minutos) em coelhos.

Pesquisa realizada por Deyne e Kirsch-volders (1995) demonstrou que macrófagos expostos a níveis terapêuticos de ultrassom *in vitro*, e em seguida removidos do meio de cultura circunjacente e depositados em culturas de fibroblastos, provocam um grande efeito estimulador sobre a proliferação dos fibroblastos. Quando os fibroblastos são expostos ao ultrassom *in vitro*, pode ser detectada uma significativa estimulação na secreção de colágeno. Quando os fibroblastos foram expostos a uma aplicação contínua de ultrassom 0,5 W/cm², foi registrado um aumento de 20% na secreção do colágeno, contudo, quando o ultrassom foi pulsado, registrou-se um aumento de 30%. Demonstraram uma elevação na síntese das proteínas, quando fibroblastos foram expostos ao ultrassom e verificaram que o macrófago é sensível ao ultrassom em resposta a níveis terapêuticos nesta modalidade (0,5 W/cm²).

Mendonça *et al* (2006) realizaram um experimento na pele de ratos para verificar a cicatrização por segunda intenção e concluíram que o ultrassom pulsado estimula a neoangiogênese em 3 dias, melhora a concentração e a qualidade do colágeno, melhora a reepitelização em 7 dias e apresenta anexos cutâneos em 14 dias quando comparados com grupos não estimulados.

Barros Jr. (2001) pesquisou os efeitos precoce e tardio do ultrassom pulsado sobre o processo de cicatrização de tendões flexores profundos em coelhos. Os resultados obtidos pela análise histológica demonstraram uma diminuição da reação inflamatória, um menor grau de necrose, aumento da deposição das fibras de colágeno na fase tardia da cicatrização do tendão e aumento da proliferação de fibroblastos mostrando uma ação positiva do UST no período de cicatrização.

Cunha *et al* (2001) demonstraram que o UST no modo pulsátil utilizado em ratos após a tendinotomia do tendão de Aquiles estimula a produção de tecido de reparação, aumentando a síntese de colágeno e uma melhor alinhamento das fibras de colágeno no eixo do tendão. Foi utilizado ultrassom no modo pulsátil, intensidade de 0,5 W/cm², na frequência de 1 MHz, por 5 minutos durante 14 dias consecutivos.

O UST acelera o processo de cicatrização cutânea em feridas de diversas origens e mostra evidências que sua correta aplicação numa fase precoce da inflamação pode contribuir para o reparo de tecidos moles (HART, 1993).

Nolasco (1993) verificou a influência do UST na cicatrização da ferida diabética. Pesquisou os efeitos de 10 dias de tratamento com ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre incisões de pele de ratos diabéticos aloxânicos. Uma avaliação macroscópica das fotos do histopatológico relevou uma maior deposição de fibras colágenas e elevado número de fibroblastos nas cicatrizes estimuladas pelo ultrassom comparadas ao grupo controle. Ensaio mecânico foram realizados na pele dos ratos do experimento e revelaram que as cicatrizes tratadas com ultrassom terapêutico tinham em média uma tensão 30% maior para se romper em relação ao grupo controle.

3. MÉTODO

3.1 Linha de Pesquisa

Esta pesquisa está inserida no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia da Saúde (PPGTS), da linha de pesquisa em Avaliação de Tecnologia em Saúde na área de concentração de Bioengenharia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

3.2 Locais de Estudo

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR. As lâminas histológicas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR. As fotomicrografias digitais foram captadas no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

3.3 Materiais e Equipamentos

3.3.1 Ultrassom Terapêutico

Para a realização da terapia ultrassônica foi utilizado um equipamento modelo Sonacel dual, da empresa Bioset®, Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda., com frequência de modulação contínua até 96Hz disponibilizado pela Clínica de Fisioterapia da PUCPR (Figura 6-A). Para o adequado acoplamento cabeçote-pele, utilizou-se gel à base de água e carbopol da empresa KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda,

3.3.2 Fluxômetro a Laser

Foi utilizado um fluxômetro a laser da marca Laserflo®, da empresa Vasamedics Tecnologia em Saúde Ltda, disponibilizado pela PUCPR para aferir o fluxo sanguíneo (Figura 6-B). Para que se pudesse realizar a mensuração do fluxo sanguíneo sem a produção de artefatos pelo deslocamento entre a pele e a ponta da

sonda, foi confeccionado, pelo Laboratório de Engenharia Mecânica da PUCPR, um balancim para a sonda do fluxômetro a laser (Figura 6-D).

3.3.3 Microscópio Óptico

Um Microscópio Olympus BX50 com câmera de captura 3CCD pró-séries fornecido pelo Laboratório de Ficologia da UFPR foi utilizado para visualização e digitalização das imagens das lâminas coradas em Hematoxilina-Eosina e Picrosirius (Figura 6-C).

3.3.4 Higrômetro e Termômetro Digital

Utilizou-se um termômetro digital e higrômetro da marca Impac (Figura 6-E), disponibilizado pela PUCPR para monitorar a temperatura e a umidade relativa do ar em todos os momentos da cirurgia e aplicação do UST.

3.3.5 Glicosímetro

Para a aferição da glicemia dos animais foi utilizado um glicosímetro da marca Accu-Chek® Advantage-Roche (Figura 6-F) (One Touche Ultra, 2008, sensibilidade de 0 até 550 e margem de erro de 1%).



Figura 6 - Equipamentos utilizados no experimento: A: Ultrassom Terapêutico; B: Fluxômetro a Laser; C: Microscópio óptico; D: Balancim e E: Termômetro Digital F: Glicosímetro.

3.4 Amostra

O experimento utilizou 96 ratos machos da linhagem *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, adultos, pesando entre 250 e 300g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da PUCPR e mantidos em gaiolas com as mesmas condições ambientais, ciclo claro/escuro de 12h, recebendo água e ração *ad libidum*, durante 14 dias. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da PUCPR, parecer nº 399, emitido 04/12/2008 (Anexo A), observando as determinações da Lei Federal nº 6638 e recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram realizados dois estudos piloto, um com quatro ratos para avaliar a evolução natural da cicatrização e a aplicabilidade do estudo histomorfométrico na extensão da ferida, e outro realizado com seis ratos com o objetivo de dominar a técnica de indução medicamentosa da diabetes e testar o método de avaliação da glicemia e o estado hiperglicêmico dos animais.

3.5 Grupos Experimentais

Os 96 ratos foram pesados e randomicamente divididos em dois grupos: diabéticos (D) e não diabéticos (ND) com 48 ratos em cada grupo. Estes dois grupos (D, ND) eram novamente subdivididos em quatro subgrupos com 24 ratos cada, identificando se os animais eram ou não expostos ao UST: diabético com ultrassom (D/c), diabético sem ultrassom (D/s), não diabético com ultrassom (ND/c) e não diabético sem ultrassom (ND/s). Oito animais de cada subgrupo foram submetidos à eutanásia e coleta de material para confecção das lâminas, no 3º, 7º, e 14º dia após o início do experimento (Figura 7). Para viabilizar a execução do experimento, ele foi realizado em quatro etapas com 24 animais cada, subdivididos proporcionalmente entre os quatro subgrupos (6 animais em cada) e entre os períodos de eutanásia (2 animais de cada subgrupo para cada dia previsto para eutanásia e coleta de material).

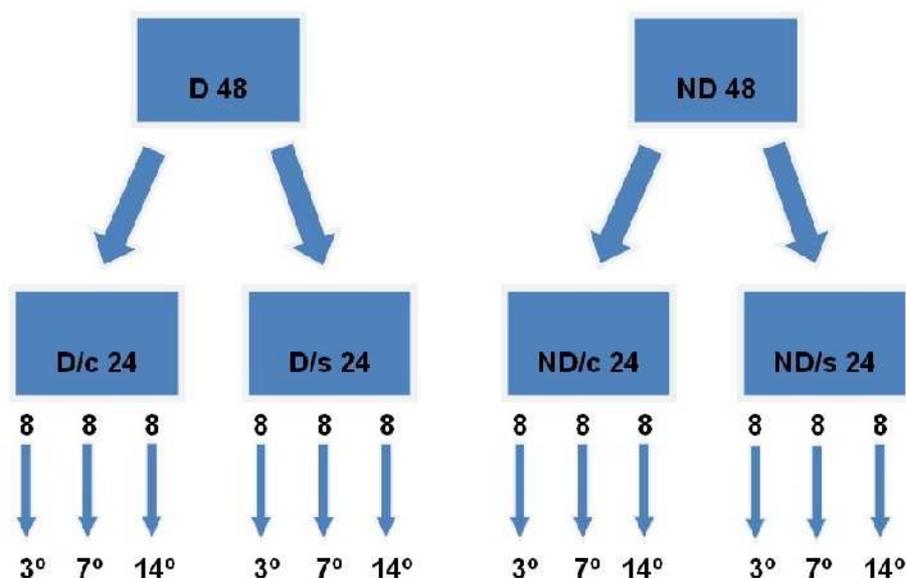


Figura 7 - Grupos Experimentais.

3.6 Fases do Experimento

3.6.1 Indução a hiperglicemia

Antes da indução da hiperglicemia nos animais do grupo D (diabéticos), todos os animais foram pesados e tiveram a glicemia aferida através do sistema Accu-Chek® Advantage-Roche, utilizando uma gota de sangue da extremidade distal da cauda (Figura 8-C). Os animais ficaram em jejum no mínimo por 8 horas antes de receber a injeção de Streptozotocina (Sigma®) (Figura 8-A) por via intraperitoneal, na dose de 50mg/kg (Figura 8-B). Após vinte quatro horas foi novamente aferida à glicemia, sendo que foram considerados hiperglicêmicos os animais que apresentaram uma glicemia superior a 250mg de glicose por 100ml de sangue (Figura 8-D). Depois de confirmada a hiperglicemia nos animais, a glicemia era aferida de dois em dois dias até o último dia do experimento, sempre no início do período noturno, quando os animais se encontram mais ativos. A manutenção da hiperglicemia caracterizou o estado diabético dos animais. Todos os animais que receberam a injeção de Streptozotocina tornaram-se hiperglicêmicos até o último dia do experimento. Não houve necessidade de indução de novos animais, pois não se deve fazer uma nova aplicação de Streptozotocina no animal que já recebeu a

droga, a dose deve ser única e novas aplicações podem causar intoxicação ou pancreatite aguda.

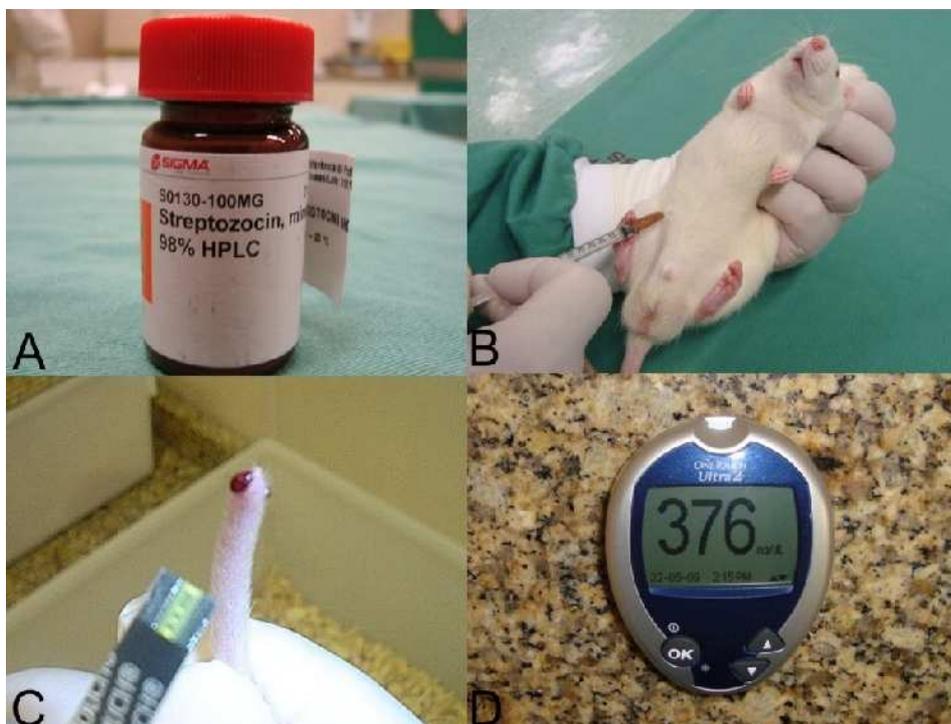


Figura 8 - Indução a hiperglicemia. A: Droga Streptozotocina; B: Aplicação intraperitoneal da droga; C: Aferição da glicemia com o aparelho Accu-Chek; D: Resultado da glicemia.

3.6.2 Procedimento Cirúrgico

Todos os animais, diabéticos e não diabéticos, foram pesados e anestesiados utilizando uma anestesia dissociativa dos fármacos Cetamina (60mg/kg) e Xilazina (10mg/kg), tendo sido administrado 0,2ml para cada 100g de peso animal, pela via intramuscular no músculo semi-tendinoso posterior da coxa. Em seguida, os animais eram posicionados em decúbito ventral, fixando os membros em um suporte de madeira para realização da tricotomia da região dorsal e antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo (Figura 9). Estes procedimentos ocorreram vinte quatro horas após a indução da hiperglicemia no grupo diabético. A região do corpo do animal escolhida para a realização do procedimento cirúrgico foi a dorso-lombar, seguindo trabalhos realizados em pele tais como, Barros (2002) e Mendonça (2006), já que é uma área ampla e de fácil acesso, permitindo que pudesse ser realizada a avaliação com o fluxômetro a laser e a técnica de deslizamento do UST.

Realizava-se então a fluxometria a laser pré-cirurgia que será descrita em detalhes no próximo tópico. Finalizada esta medida, procedia-se a proteção com

campo cirúrgico estéril da região delimitada para o procedimento cirúrgico (Figura 10-B). Com o auxílio de um *punch* (Figura 10-A), instrumento dotado de superfície circular cortante, com 1 cm de diâmetro, foi feita uma incisão circular na pele da região dorsal-lombar (Figura 10-C e 10-D), ao nível da última vértebra lombar. A remoção do fragmento de pele era completada com pinça anatômica e tesoura, respeitando a fáscia muscular (Figura 11). Após o término do ato cirúrgico, os animais receberam cobertura antibiótica com Cefalexina, 15mg/Kg, via subcutânea, uma vez ao dia durante 5 dias (BIRCHARD e SHERDING, 2004).



Figura 9 - Animal anestesiado e posicionado em decúbito ventral, com região delimitada para o procedimento cirúrgico.

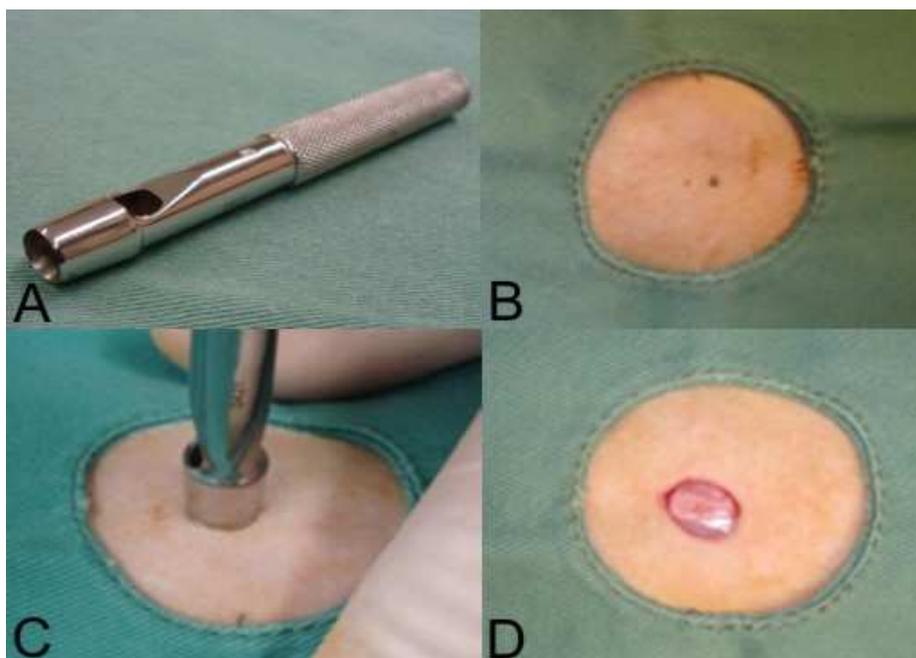


Figura 10 - Procedimento Cirúrgico. A: *Punch*; B: Campo cirúrgico no local delimitado para o procedimento cirúrgico; C: Incisão circular na pele; D: Remoção do fragmento de pele.

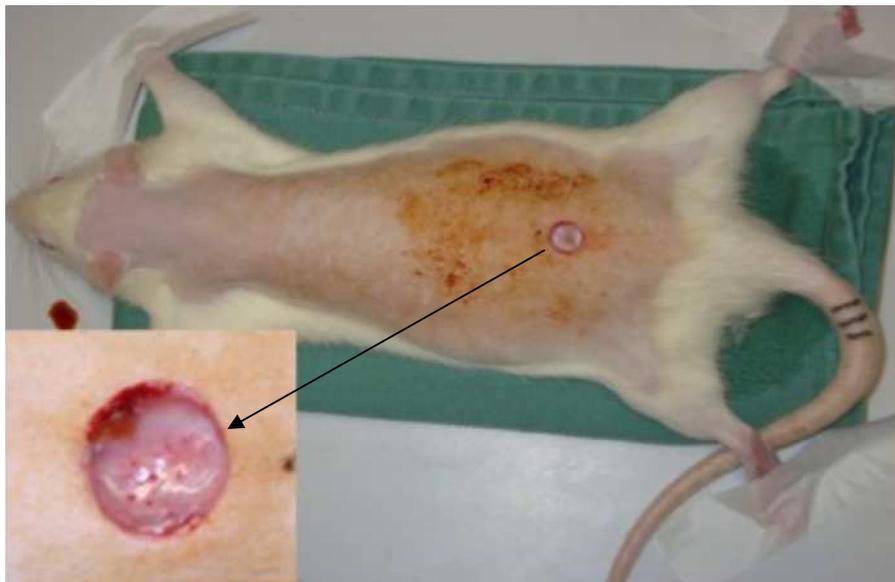


Figura 11 - Ferida cirúrgica, detalhe da ferida e fásia muscular.

3.6.3 Fluxometria a Laser

As regiões delimitadas para avaliação por fluxometria foram a cervical e a dorso-lombar (Figura 12-A). A região cervical (Figura 12-B) (pele) foi definida como a porção caudal logo após o fim da curvatura da caixa craniana. Esta região servia como referência no próprio animal, uma vez que esta região não receberia aplicação do UST. A região dorso-lombar (Figura 12-C) (ferida) foi localizada a 5 mm região da borda da ferida, no sentido cranial, sobre a linha média. A fluxometria a laser foi realizada pré e pós-cirurgia em todos os animais dos quatro subgrupos (D/c,D/s,ND/c,ND/s) nas regiões delimitadas. No pós-operatório o fluxo sanguíneo foi aferido antes e após a aplicação do UST no 3°, 7°, 10° e 14° dia, nas mesmas regiões anatômicas. O tempo necessário para aferição do fluxo sanguíneo foi de 1 minuto para cada leitura em cada uma das regiões descritas (pele e ferida). A unidade de medida fornecida pelo equipamento era expressa em ml/min/100g de peso.

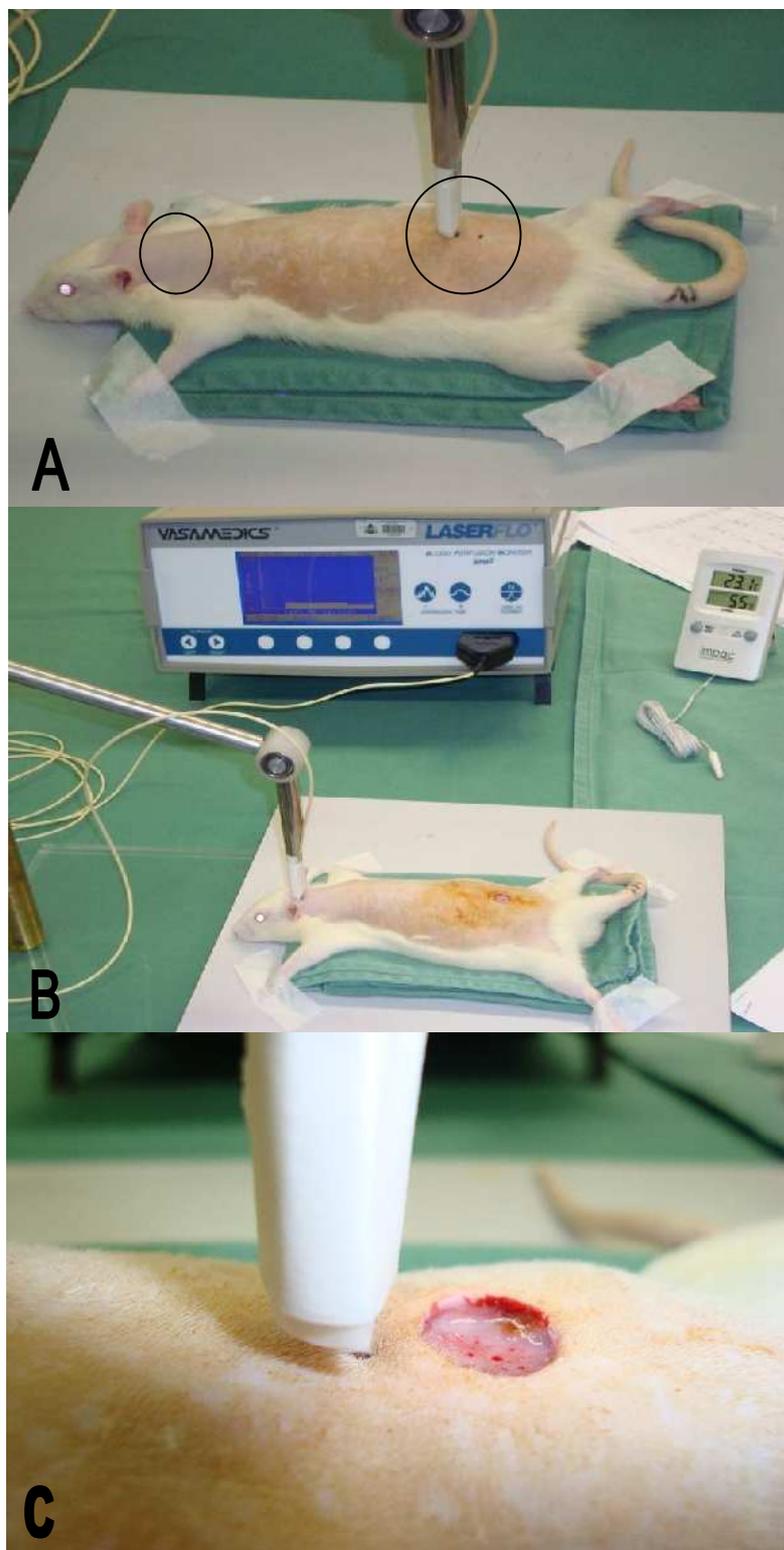


Figura 12 - Aferição do fluxo sanguíneo antes e após a cirurgia. A: regiões cervical e dorso-lombar. B: Fluxometria na região cervical. C: detalhe da fluxometria na ferida.

3.6.4 Aplicação do Ultrassom Terapêutico

Antes do início dos experimentos, o equipamento de UST foi aferido através de um dosímetro de precisão (*Ultra Sonic Power Meter*®, modelo UPM-DT-1) na UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) para verificar se a intensidade de saída do transdutor obtinha um desvio máximo de 20%. Este é o valor tolerável pela norma NBR 60601-2-5 que estabelece prescrições particulares para segurança de equipamentos por ultrassom para terapia (ABNT, 2000).

O UST foi aplicado diariamente em todos os quatro subgrupos, após 24 horas do procedimento cirúrgico. Após a indução anestésica e procedimento de fluxometria, os animais eram colocados numa superfície plana e aplicava-se o hidrogel, (Figura 13-A) para facilitar o acoplamento e deslizamento do transdutor sobre a ferida. A técnica de aplicação foi a de deslizamento (Figura 13-B) que consiste no deslocamento do transdutor com movimentos lentos, lineares, de vai e vem sobre a ferida (Figura 13-C), nunca permanecendo imóvel sobre a mesma (KITCHEN e BAZIN, 1998). O tempo de aplicação do UST foi de 5 minutos sobre a região da ferida, sempre no mesmo período do dia. Após a aplicação, o gel remanescente era removido com gaze esterilizada.

Os animais dos subgrupos D/s e ND/s receberam uma simulação da aplicação do UST descrita acima, porém com o aparelho desligado. A região utilizada para a confecção da ferida e aplicação do UST foi escolhida pelo fato de possuir uma área em que se pode utilizar adequadamente a técnica de deslizamento, e por não ser recomendada a utilização do UST nas regiões torácica, cardíaca, gonadal ou com neoplasias (SORIANO, PÉREZ e BAQUÉS, 2003).

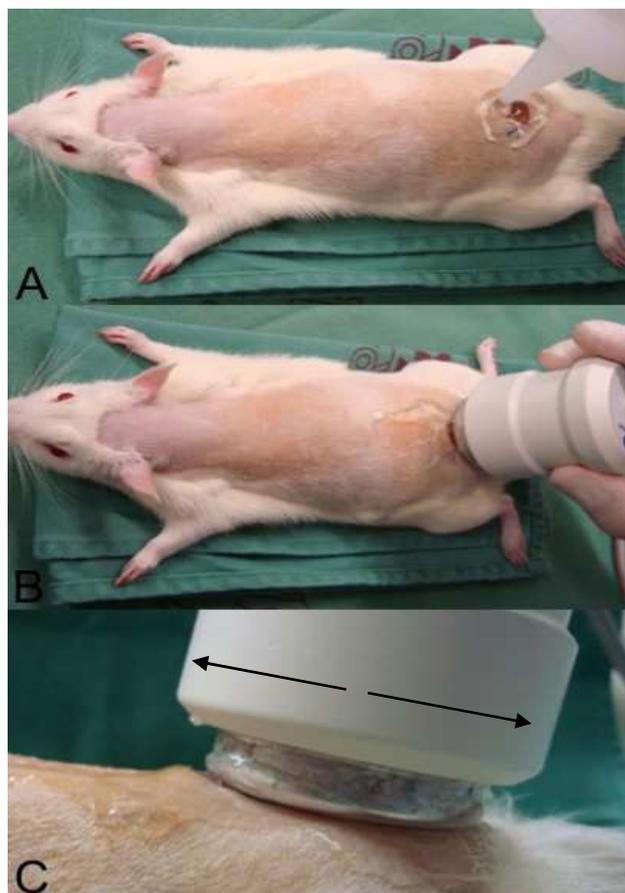


Figura 13 - Aplicação do UST. A: Aplicação do gel sobre a ferida; B: Aplicação da técnica de deslizamento; C: Detalhe da técnica de deslizamento.

3.6.5 Procedimento de Eutanásia

No 3º, 7º e 14º dia de tratamento, oito animais de cada subgrupo sofreram eutanásia por dose letal de tiopental sódico intraperitoneal (120mg/Kg), método de eutanásia recomendado para roedores e outros pequenos mamíferos, contido na Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de julho de 2002 (CFMV, 2010).

3.6.6 Coleta de Material e Confecção de Lâminas

Imediatamente após a eutanásia foi retirado o segmento do dorso no qual a cicatriz estava contida, com larga margem de segurança, produzindo uma peça de seis centímetros de comprimento por três de largura. Os segmentos foram fixados em formol 10% por 24 horas.

Após este período, foi realizada a clivagem das peças com 3 cortes sobre a região média da ferida. Os cortes foram incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes de 4 micrômetros, preparando duas lâminas com 3 cortes cada,

uma para coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), para a avaliação da contração da ferida, e outra para a coloração de Picrosirius (PS), que promove um aumento da birrefringência específica para a estrutura do colágeno I e III, sendo analisado num microscópio de luz polarizada, onde as fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes se apresentam coradas de tons de laranja e vermelho e representam o colágeno tipo I, enquanto que as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringente se apresentam coradas de verde e representam o colágeno tipo III.

3.6.7 Histomorfometria

Para a leitura das lâminas em HE foram capturadas três fotomicrografias panorâmicas com aumento de 40x referentes a três campos (direito, médio e esquerdo) e uma fotomicrografia com aumento de 400x da região média da ferida. Utilizando como referência o fundo da ferida e as fibras musculares, foi delimitado o meio da ferida e realizada a fotomicrografia referente ao campo médio. Deslocando-se o campo de visão para a esquerda e para a direita, até não haver sobreposição com a imagem do campo médio, eram obtidas as imagens dos campos esquerdo e direito. Para a fotomicrografia com aumento de 400x foi utilizada a mesma técnica dos três campos, a partir do campo médio no fundo da ferida. Para a leitura das lâminas em PS foi utilizada a mesma técnica descrita acima.

O microscópio utilizado para captação das imagens foi da marca Olympus® BX50 com câmaras de captura 3CCD pró-séries e o programa de captura de imagens foi o ImageProPlus® versão 4.5 da Cybermetics. As imagens foram captadas por uma câmera Olympus® DP71, enviadas a um monitor Sony Trinitron® colorido, congeladas e digitalizadas por uma placa digitadora Oculus TCX®, e analisadas pelo aplicativo ImageProPlus® 4.5 para Windows, em computador Pentium.

Com as imagens panorâmica obtidas das lâminas em HE, com aumento de 40x, foi realizado o estudo histomorfomicrométrico da extensão da ferida. A mensuração da extensão foi realizada para avaliar a influência do UST na reposição tecidual e na contração das feridas diabéticas e não diabéticas.

A histomorfomicrometria foi realizada com o programa ImageProPlus®, utilizando a ferramenta de medida linear, em número de pixels. Excluindo-se a crosta de coagulação e as porções de pele íntegra, era traçada uma linha contínua

de uma borda à outra da ferida, acompanhando o leito cicatricial. Os valores medidos em cada um dos campos (esquerdo, médio e direito) eram somados para se obter a extensão total da ferida (Figura 14 e 15).

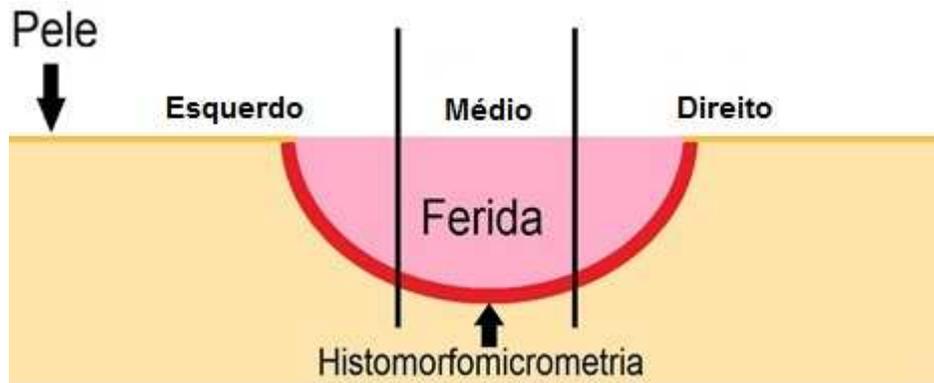


Figura 14 - Mensuração da extensão da ferida apresentando os três campos direito, médio e esquerdo. Detalhe em vermelho representando o leito cicatricial no fundo da ferida.

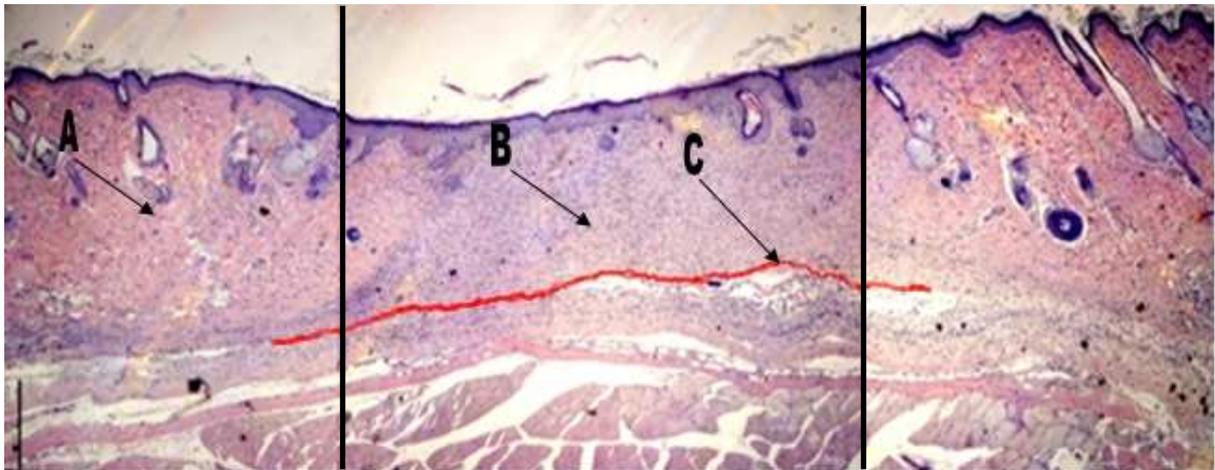


Figura 15 - Fotomicrografia do animal do subgrupo D/s, no 14º dia. Vista panorâmica dos 3 campos únicos: Esquerdo, Médio e Direito formando a ferida com (aumento de 40x) e Coloração HE. Em destaque A: pele. B: Ferida. C: (Linha vermelha) o traçado usado para mensuração da extensão da ferida.

3.6.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis do estudo, foi considerado o modelo de análise de variância (ANOVA) com um fator e o teste LSD (least significant difference) para as comparações múltiplas. A comparação de dois grupos foi feita usando-se o teste *t de*

Student para amostras independentes. Nas comparações entre os locais pele e ferida, foi usado o teste *t de Student* para amostras pareadas. Para a comparação das avaliações consecutivas, foi usado o modelo de análise de variância com medidas repetidas. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov antes das comparações intra grupos 2 a 2. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional Statistica v.8.0

4. RESULTADOS

Para a descrição dos resultados, as tabelas de análise estatística foram simplificadas aos dados de maior interesse, mas os dados completos da análise de cada item avaliado podem ser consultados no Apêndice A.

4.1 Comparação dos grupos D e ND em relação à glicemia

Para verificar o estado diabético dos animais, para cada momento de avaliação, testou-se a hipótese nula de que as médias de glicemia são iguais para os grupos D e ND, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes.

Tabela 1 - Comparação do grupo D x grupo ND em relação à glicemia.

Momento	Grupo	n	Glicemia Média (\pm DP) mg/dl de sangue	Valor de p*
Cirurg	D	48	331.3 (\pm 28.4)	<0.001
	ND	48	72.8 (\pm 7.3)	
3 dias	D	48	329.4 (\pm 31.0)	<0.001
	ND	48	75.5 (\pm 7.8)	
7 dias	D	32	343.1 (\pm 33.1)	<0.001
	ND	32	74.9 (\pm 8.0)	
10 dias	D	16	365.5 (\pm 31.4)	<0.001
	ND	16	75.8 (\pm 6.6)	
14 dias	D	16	384.1 (\pm 40.6)	-
	ND	-	-	

*Teste *t de Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Há diferença significativa da glicemia entre os grupos, em todos os momentos avaliados, comprovando o estado diabético dos animais induzidos com o uso da Streptozotocina.

4.2 Comparação intragrupo Diabéticos (D/c e D/s) em relação à glicemia

Inicialmente, dentro do grupo D, em cada momento de avaliação, testou-se a hipótese nula de que as médias de glicemia são iguais para os subgrupos D/c e D/s, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes.

Tabela 2 - Subgrupos D/c e D/s em relação à glicemia.

Momento	Subgrupo D:	n	Glicemia Média (\pm DP) mg/dl de sangue	Valor de p*
Cirurg	D/c	24	337.4 (\pm 28.0)	0.134
	D/s	24	325.1 (\pm 28.0)	
3 dias	D/c	24	337.3 (\pm 34.1)	0.079
	D/s	24	321.5 (\pm 25.8)	
7 dias	D/c	16	341.8 (\pm 39.0)	0.831
	D/s	16	344.4 (\pm 27.2)	
10 dias	D/c	8	359.6 (\pm 31.6)	0.473
	D/s	8	371.4 (\pm 32.2)	
14 dias	D/c	8	387.6 (\pm 50.1)	0.743
	D/s	8	380.6 (\pm 31.5)	

* Teste *t de Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

A comparação da glicemia entre os subgrupos D/c e D/s não apresentou significância estatística, indicando a homogeneidade do estado diabético entre os dois subgrupos.

4.3 Comparação intragrupo Não Diabéticos (ND/c e ND/s) em relação à glicemia

Inicialmente, dentro do grupo ND, em cada momento de avaliação testou-se a hipótese nula de que as médias de glicemia são iguais para os subgrupos ND/c e ND/S, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes.

Tabela 3 - Subgrupos ND/c e ND/s em relação à glicemia.

Momento	Subgrupo ND:	n	Glicemia Média (\pm DP) mg/dl de sangue	Valor de p*
Cirurg	ND/c	24	69.9 (\pm 6.3)	<0.005
	ND/s	24	75.7 (\pm 7.2)	
3 dias	ND/c	24	76.3 (\pm 7.3)	0.489
	ND/s	24	74.7 (\pm 8.4)	
7 dias	ND/c	16	74.7 (\pm 8.2)	0.862
	ND/s	16	75.2 (\pm 7.9)	
10 dias	ND/c	8	74.9 (\pm 7.5)	0.614
	ND/s	8	76.6 (\pm 6.0)	
14 dias	ND/c	-	-	-
	ND/s	-	-	

* Teste *t de Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Somente no dia da cirurgia houve significância estatística entre os subgrupos ND/c ND/s, com o subgrupo ND/c apresentando valor médio inferior ao subgrupo ND/s. Nos demais momentos avaliados não houve diferença entre os dois subgrupos, indicando homogeneidade do padrão glicêmico entre os dois subgrupos.

4.4 Comparação dos pesos dos animais

Para comparar o peso dos animais para cada momento de avaliação, testou-se a hipótese nula de que as médias de peso são iguais para os quatro subgrupos, versus a hipótese alternativa de médias diferentes.

Tabela 4 - Comparação dos subgrupos em relação à variável peso.

Variável	Subgrupo	N	Média	Desvio padrão	Valor de p*
Peso cx	D/c	24	264	8	0.164
	D/s	24	271	15	
	ND/c	24	266	9	
	ND/s	24	267	10	
Peso 3d	D/c	24	259	9	<0.038
	D/s	24	267	14	
	ND/c	24	265	8	
	ND/s	24	267	10	
Peso 7d	D/c	16	255	10	<0.006
	D/s	16	265	14	
	ND/c	16	266	7	
	ND/s	16	267	8	
Peso 10d	D/c	8	254	8	<0.023
	D/s	8	264	18	
	ND/c	8	272	9	
	ND/s	8	268	7	
Peso 14d	D/c	8	249	6	<0.001
	D/s	8	263	17	
	ND/c	8	272	9	
	ND/s	8	269	6	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$.

No dia da cirurgia, o peso entre os subgrupos foi semelhante e não houve significância estatística, indicando homogeneidade da amostra no início do experimento. Para os momentos de avaliação em que houve diferença significativa, os subgrupos foram comparados dois a dois. Os valores de p são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação entre os subgrupos nos momentos com diferença significativa em relação a variável peso.

Subgrupos comparados	Valor de p*			
	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
D/c x D/s	<0.012	<0.011	0.099	<0.015
D/c x ND/c	<0.041	<0.003	<0.004	<0.001
D/c x ND/s	<0.013	<0.002	<0.018	<0.001
D/s x ND/c	0.637	0.626	0.160	0.080
D/s x ND/s	0.978	0.602	0.425	0.265
ND/c x ND/s	0.657	0.972	0.531	0.504

* Teste LSD, $p < 0,05$

O subgrupo D/c obteve uma média de peso menor que todos os demais subgrupos, em todos os dias após a cirurgia, exceto no 10º dia em relação ao subgrupo D/s. O gráfico abaixo ilustra a evolução da média do peso dos animais, desvios-padrão (retângulos) e valores máximo e mínimo (linhas verticais) para cada subgrupo com resultados obtidos para o peso dos animais.

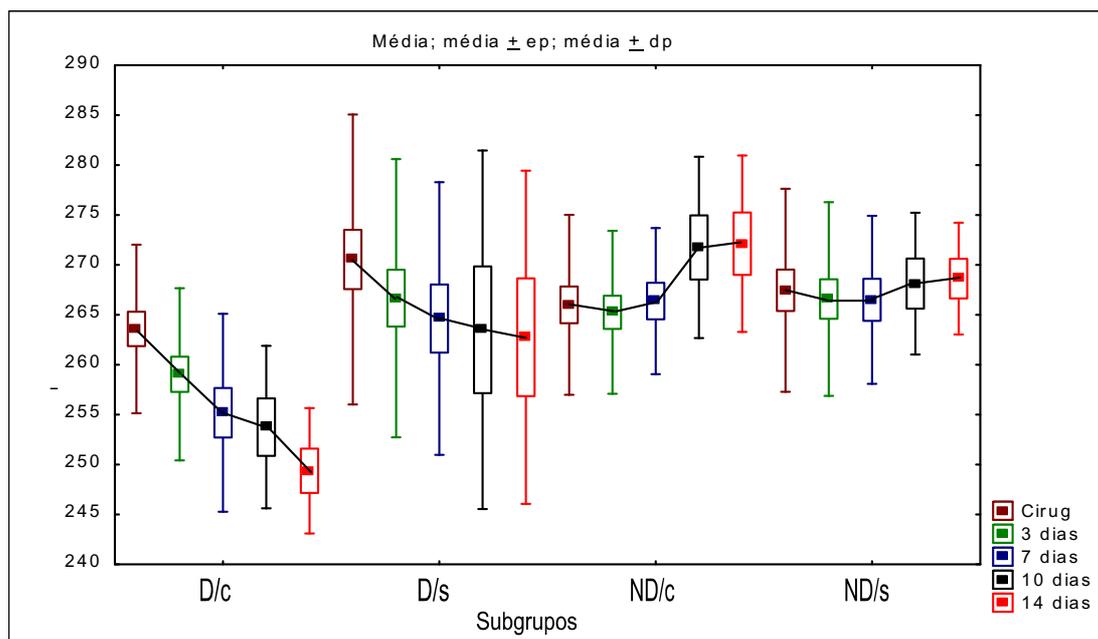


Figura 16: Gráfico 1 - Evolução dos subgrupos em relação ao peso.

O gráfico 1 apresenta a evolução do peso dos subgrupos desde o dia da cirurgia (cor marron) até o 14º dia do experimento (cor vermelha). O subgrupo D/c teve uma média de peso menor que todos os outros subgrupos. O subgrupo D/s também perdeu peso, mais acentuadamente até o 7º dia de experimento. O subgrupo ND/c obteve ganho de peso a partir do 7º dia, assim como o subgrupo ND/s, porém com valores médios menores.

4.5 Comparação intra-subgrupos do peso dos animais nos momentos de avaliação

Para cada um dos subgrupos, testou-se a hipótese nula de que as médias de peso dos animais são iguais em todos os momentos de avaliação, *versus* a hipótese alternativa de que, em pelo menos um dos momentos, a média do peso é diferente dos demais. Se houve rejeição da hipótese nula, então os momentos de avaliação foram comparados dois a dois.

Os subgrupos ND/c e ND/s, embora tenham aumento do peso médio, este ganho não apresenta significância estatística (ND/c $p=0,363$, ND/s $p=0,654$). Os subgrupos D/c e D/s apresentaram variações significativas de peso (D/c $p < 0,001$, D/s $p < 0,001$) e para estes subgrupos procedeu-se a comparação entre os momentos, dois a dois. Os resultados são apresentados abaixo.

Tabela 6 - Comparação entre os pesos nos momentos de avaliação do subgrupo D/c.

Momentos comparados	Valor de p*
Cirurgia x 3d	0,611
Cirurgia x 7d	<0,027
Cirurgia x 10d	<0,001
Cirurgia x 14d	<0,001
3d x 7d	0,078
3d x 10d	<0,001
3d x 14d	<0,001
7d x 10d	<0,023
7d x 14d	<0,001
10d x 14d	0,056

* Teste LSD, $p < 0,05$

Observou-se que houve perda de peso significativa no subgrupo D/c entre os períodos cirurgia e 10º dia, e cirurgia e 14º dia. Constata-se também uma diferença significativa também entre o 3º e o 10º dia, e entre o 3º e o 14º dia.

Tabela 7 - Comparação entre os pesos nos momentos de avaliação do subgrupo D/s.

Grupos comparados	Valor de p*
Cirurgia x 3d	<0,004
Cirurgia x 7d	<0,001
Cirurgia x 10d	<0,001
Cirurgia x 14d	<0,001
3d x 7d	<0,025
3d x 10d	<0,001
3d x 14d	<0,001
7d x 10d	0,054
7d x 14d	<0,017
10d x 14d	0,604

* Teste LSD, $p < 0,05$

Observa-se que houve perda de peso significativa neste subgrupo (D/s) entre os períodos cirurgia e 7º, cirurgia e 10º dia, e cirurgia e 14º dia. Constata-se também uma diferença significativa entre o 3º e o 10º dia, e entre o 3º e o 14º dia.

4.6 Comparação da fluxometria entre os subgrupos

Para comparar o fluxo sanguíneo entre dos subgrupos para cada momento de avaliação, local de aferição (ferida e pele) e condição pré e pós aplicação do UST, os 4 subgrupos foram comparados testando-se a hipótese nula de que as médias da variável do fluxômetro são iguais para os 4 grupos, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes.

Em nenhum momento das comparações ocorreu diferença significativa, indicando que todos os subgrupos apresentaram valores semelhantes para um mesmo momento e local de avaliação, e condição pré e pós UST, não apresentando diferenças com significância estatística. Convém observar que nos dia de cirurgia não houve aplicação do UST, nem simulação de aplicação, e as medidas se referem aos momentos pré e pós cirurgia.

4.7 Comparação intra-subgrupos da Fluxometria entre os locais de aferição (pele e ferida), para cada momento de avaliação, pré e pós aplicação do UST

Para verificar diferenças intra subgrupos do fluxo sanguíneo nos locais de aferição, para cada momento de avaliação, pré e pós aplicação do UST, testou-se a hipótese nula de que as médias da fluxometria na pele e na ferida são iguais, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes. Na Tabela 9 é apresentado um resumo dos resultados desta análise.

Tabela 8 - Comparação intra subgrupos da Fluxometria entre os locais pele e ferida para cada momento de avaliação, pré e pós aplicação do UST.

	D/c Pele x Ferida	D/s Pele x Ferida	ND/c Pele x Ferida	ND/s Pele x Ferida
Pré Cirurgia	NS	<0.030	NS	NS
Pós Cirurgia	<0.012	NS	NS	NS
Pré 3 dias	<0.008	NS	<0.023	NS
Pós 3 dias	<0.021	NS	NS	NS
Pré 7 dias	NS	NS	NS	NS
Pós 7 dias	NS	NS	NS	NS
Pré 10 dias	NS	NS	NS	NS
Pós 10 dias	NS	NS	NS	NS
Pré 14 dias	NS	NS	NS	NS
Pós 14 dias	NS	NS	NS	NS

NS: Não significativo

Antes da cirurgia, os valores médios do fluxo sanguíneo não apresentaram diferença significativa entre a ferida e a pele em todos os subgrupos, exceto no subgrupo D/s, onde a pele apresentou média de fluxo inferior ao local em que seria produzida a ferida. Após a cirurgia, o subgrupo D/c apresentou variação significativa do fluxo, com valor médio maior na pele em relação à ferida.

No 3º dia os subgrupos D/c e ND/c apresentaram diferença significativa entre o fluxo sanguíneo da pele e o da ferida no 3º dia, antes do uso do UST, estando à pele com o fluxo médio menor do que na ferida em ambos os subgrupos. Após o UST, somente o subgrupo D/c apresentou diferença significativa entre os fluxos sanguíneos da pele e da ferida, sendo os valores médios na ferida superiores aos da pele. Nos demais subgrupos essa diferença não foi observada.

No 7º, 10º e 14º dia não houve diferença significativa entre os valores médios de fluxo entre a pele e a ferida, em nenhum dos subgrupos.

4.8 Comparação intragrupos da Fluxometria entre os momentos de avaliação para um mesmo local de aferição (pele ou ferida) e condição pré ou pós procedimento (cirurgia ou UST)

Para cada subgrupo foram comparados os valores médios da fluxometria entre os vários momentos de avaliação, para cada local de aferição, pré ou pós procedimento (cirurgia ou UST). Testou-se a hipótese nula de que as médias da variável fluxo sanguíneo são iguais em todos os momentos de avaliação, *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um dos momentos tem média diferente dos demais.

Em nenhuma das comparações ocorreu significância estatística. As alterações intra-subgrupos do fluxo sanguíneo não foram significativas entre os vários momentos (cirurgia, 3º, 7º, 10º e 14º dia), para um mesmo local de aferição, nas condições pré e pós procedimento (cirurgia ou UST).

4.9 Comparação entre subgrupos em relação à diferença entre a fluxometria pré e pós UST para um mesmo local de aferição e mesmo momento de avaliação

Para cada local (ferida e pele) e momento de avaliação (cirurgia, 3º, 7º, 10º ou 14º dia), testou-se a hipótese nula de que as médias da diferença entre pré e pós UST são iguais em todos os subgrupos, *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um dos subgrupos tem média diferente dos demais.

Tabela 9 - Comparação entre subgrupos em relação à diferença entre a fluxometria pré e pós UST.

Momento	Local	D/c x D/s x ND/c x ND/s
Cirurgia	Ferida	NS
	Pele	NS
3º dia	Ferida	NS
	Pele	NS
7º dia	Ferida	NS
	Pele	NS
10º dia	Ferida	NS
	Pele	NS
14º dia	Ferida	<0,024
	Pele	NS

NS: Não significativo

A diferença entre o valor do fluxo sanguíneo antes e depois do ultrassom não apresentou variações significantes entre os subgrupos, exceto no local ferida, no 14º dia. Para este local e momento, os subgrupos foram comparados dois a dois. O resultado desta análise é apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação dos subgrupos dois a dois na ferida do 14º dia.

Subgrupos comparados	Valor de p*
D/c x D/s	0,518
D/c x ND/c	<0,008
D/c x ND/s	0,970
D/s x ND/c	<0,035
D/s x ND/s	0,542
ND/c x ND/s	<0,008

* Teste LSD, $p < 0,05$

Observa-se que, no 14º dia, no local ferida, o subgrupo ND/c apresentou valores médios menores, com significância estatística, quando comparado aos demais subgrupos.

No gráfico 2 verifica-se a diferença dos valores do subgrupo ND/c em relação aos demais. Acima da linha vermelha o fluxo pós UST é maior do que o pré UST (aumento do fluxo), abaixo da linha ele é menor no pós do que no pré (redução de fluxo) e a linha representa o ponto de nulidade, em que não há diferença entre os fluxos pré e pós UST. Entre os subgrupos D/c, D/s e ND/s não houve diferença significativa, e, embora estejam um pouco acima da linha vermelha, não apresentaram aumento de fluxo sanguíneo estatisticamente significativo. Embora o subgrupo ND/c esteja a baixo da linha, essa diferença em relação aos demais subgrupos não é significativa ($p=0,068$).

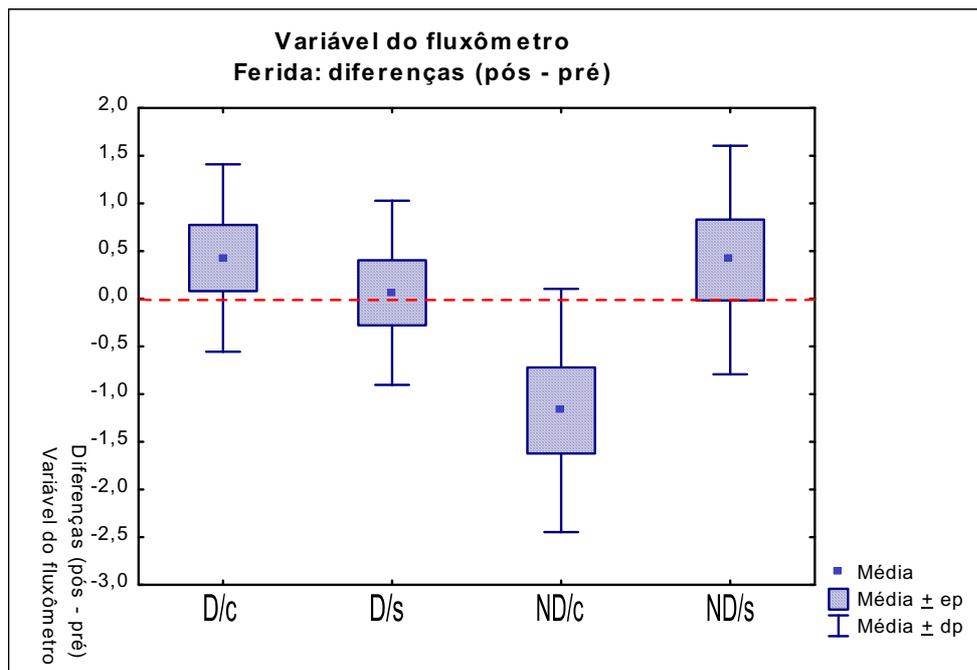


Figura 17: Gráfico 2 - Comparação entre subgrupos em relação à diferença entre fluxometria pré e pós UST.

4.10 Comparação da extensão da ferida entre os subgrupos, nos momentos de avaliação 3º, 7º e 14º dia

Para cada momento de avaliação (3º, 7º e 14º dia), testou-se a hipótese nula de que as médias da extensão da ferida são iguais em todos os subgrupos, *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um dos subgrupos tem média diferente dos demais. Os resultados desta análise são apresentados nas tabelas, para cada período de avaliação e com os valores de *p* dos testes estatísticos.

Tabela 11 - Extensão da Ferida dos subgrupos.

Momento	Subgrupo	Média e Pixels/Milhões	Valor de <i>p</i> *
Ext ferida 3d	D/c	8 4,893 (±1,271)	0,585
	D/s	8 4,572 (±1,604)	
	ND/c	8 5,502 (±1,121)	
	ND/s	8 5,126 (±1,416)	
Ext ferida 7d	D/c	8 6,278 (±3,556)	<0,001
	D/s	8 4,158 (±2,165)	
	ND/c	8 3,919 (±1,498)	
	ND/s	8 3,012 (±1,420)	
Ext ferida 14d	D/c	8 4,859 (±2,664)	0,109
	D/s	8 6,912 (±2,038)	
	ND/c	8 5,523 (±1,746)	
	ND/s	8 4,531 (±1,341)	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$

A extensão da ferida não apresentou diferenças significativas entre os subgrupos no 3º e 14º dia. No 7º dia houve diferença significativa e os subgrupos foram comparados dois a dois, como mostra a Tabela 14.

Tabela 12 - Extensão da Ferida no 7º dia.

Subgrupos Comparados	Ext fer 7º dia Valor de p*
D/c x D/s	0,009
D/c x ND/c	<0,004
D/c x ND/s	<0,001
D/s x ND/c	0,754
D/s x ND/s	0,139
ND/c x ND/s	0,239

* Teste LSD, $p < 0,05$

Observa-se que no momento 7º dia, a média de extensão da ferida no subgrupo D/c foi significativamente maior em relação aos demais subgrupos. No Gráfico 3 apresenta-se a distribuição dos valores de extensão da ferida no 7º dia do experimento, para cada subgrupo, evidenciando-se que o subgrupo D/c apresentou uma extensão média maior em relação aos demais subgrupos.

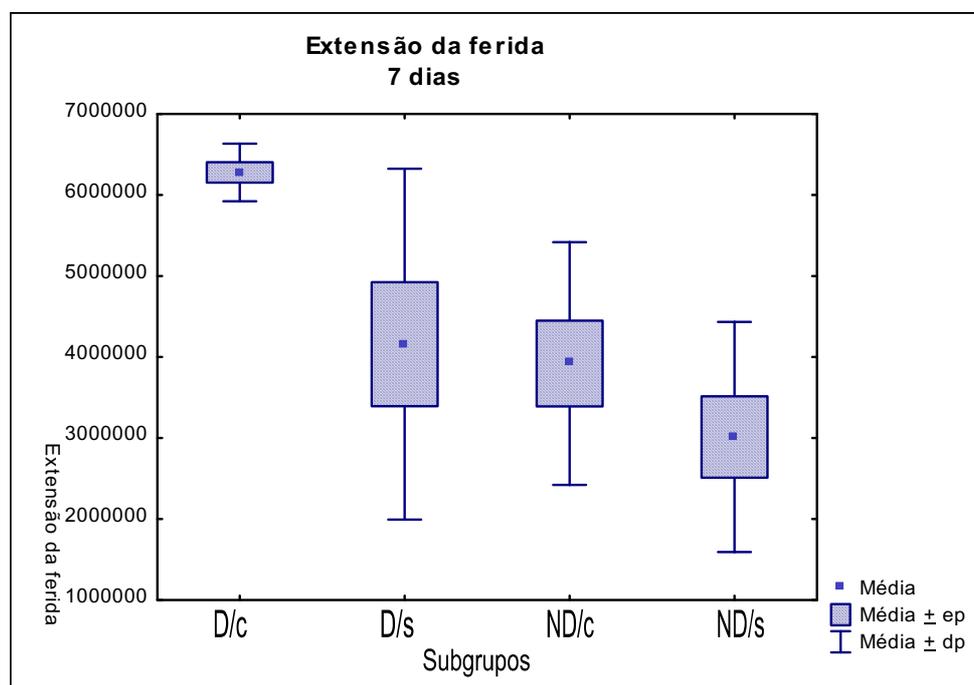


Figura 18: Gráfico 3 - Extensão da ferida no 7º dia.

4.11 Comparação entre os subgrupos em relação ao percentual de Colágeno I, Colágeno III e Substância de Fundo, nos momentos de avaliação 3º, 7º e 14º dia

Para cada momento de avaliação (3º, 7º e 14º dia), testou-se a hipótese nula de que as médias percentuais para cada tipo de colágeno e substância de fundo são iguais em todos os subgrupos, *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um dos subgrupos tem média diferente dos demais. Nas tabelas abaixo são apresentados os resultados obtidos e os valores de p do teste estatístico ANOVA, separados por momento de avaliação.

Tabela 13 - Comparação dos subgrupos em relação ao percentual de colágeno no 3º dia.

Variável	Subgrupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p*
Colágeno I	D/c	8	41,7	1,0	<0,001
	D/s	8	47,9	0,5	
	ND/c	8	45,8	0,5	
	ND/s	8	48,9	1,0	
Colágeno III	D/c	8	53,4	0,9	<0,001
	D/s	8	46,2	0,7	
	ND/c	8	50,0	0,9	
	ND/s	8	46,0	0,7	
Substância de Fundo	D/c	8	4,9	0,4	<0,011
	D/s	8	6,0	1,0	
	ND/c	8	4,2	0,6	
	ND/s	8	5,1	1,5	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$

Tabela 14 - Comparação dos subgrupos em relação ao percentual de colágeno no 7º dia.

Variável	Subgrupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p*
Colágeno I	D/c	8	36,1	2,2	<0,001
	D/s	8	48,4	0,8	
	ND/c	8	43,1	2,3	
	ND/s	8	49,2	1,4	
Colágeno III	D/c	8	59,9	2,2	<0,001
	D/s	8	46,5	1,5	
	ND/c	8	53,4	1,8	
	ND/s	8	47,1	1,3	
Substância de Fundo	D/c	8	4,1	1,1	<0,049
	D/s	8	5,2	1,9	
	ND/c	8	3,5	0,9	
	ND/s	8	3,7	0,9	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$

Tabela 15 - Comparação dos subgrupos em relação ao percentual de colágeno no 14º dia.

Variável	Subgrupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p*
Colágeno I	D/c	8	25,7	1,4	<0,001
	D/s	8	49,1	1,6	
	ND/c	8	47,6	1,1	
	ND/s	8	47,1	0,6	
Colágeno III	D/c	8	67,2	1,4	<0,001
	D/s	8	44,0	1,3	
	ND/c	8	46,9	1,5	
	ND/s	8	47,5	1,2	
Substância de Fundo	D/c	8	7,2	1,2	<0,004
	D/s	8	7,0	1,0	
	ND/c	8	5,5	1,1	
	ND/s	8	5,4	1,1	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$

Em todos os momentos avaliados ocorreu diferença significativa entre os subgrupos para os percentuais de Colágeno I, Colágeno III e Substância de Fundo. Assim sendo, procedeu-se a comparação dos subgrupos dois a dois, para cada momento e para cada uma das variáveis avaliadas (Colágeno I, Colágeno III e Substância de Fundo).

Tabela 16 - Comparação dos subgrupos dois a dois em relação ao percentual de colágeno.

Subgrupos comparados	Valor de p*								
	3º dia			7º dia			14º dia		
	Col I	Col III	Fundo	Col I	Col III	Fundo	Col I	Col III	Fundo
D/c x D/s	<0,001	<0,001	0,035	<0,001	<0,001	0,092	<0,001	<0,001	0,739
D/c x ND/c	<0,001	<0,001	0,169	<0,001	<0,001	0,334	<0,001	<0,001	0,005
D/c x ND/s	<0,001	<0,001	0,664	<0,001	<0,001	0,511	<0,001	<0,001	0,004
D/s x ND/c	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,011	0,022	<0,001	0,012
D/s x ND/s	0,017	0,660	0,086	0,369	0,440	0,023	0,003	<0,001	0,009
ND/c x ND/s	<0,001	<0,001	0,075	<0,001	<0,001	0,754	0,447	0,437	0,910

* Teste LSD, $p < 0,05$

Observa-se que o subgrupo D/c apresenta diferenças significativas em relação ao subgrupo D/s, em todos os momentos, para Colágeno I e Colágeno III, e, em relação à Substância de Fundo, a diferença ocorre apenas no 3º dia. Entre o subgrupo D/c e os subgrupos ND/c e ND/s também houve diferenças significativas em relação ao Colágeno I e Colágeno III em todos os momentos, mas em relação à Substância de Fundo, a diferença ocorre apenas no 14º dia. Ao se comparar os subgrupos D/s e ND/c, as diferenças ocorrem em todos os momentos e para as três variáveis avaliadas. Comparados os subgrupos D/s e ND/s, observamos que no 3º dia há diferença significativa apenas para Colágeno I, no 7º dia apenas para Substância de Fundo, e, no 14º dia, as três variáveis apresentam diferenças significativas. Entre os subgrupos ND/c e ND/s há diferenças significativas no 3º e 7º dia para Colágeno I e Colágeno III, mas no 14º não há diferenças entre os dois subgrupos para as três variáveis analisadas.

Verificou-se também se dentro de cada subgrupo havia variações significativas dos Colágenos I e III entre os momentos avaliados. Na tabela abaixo são apresentados os valores de p destas comparações para cada subgrupo.

Tabela - 17 Momentos de avaliação dentro de cada subgrupo em relação do colágeno I e III.

Dentro do subgrupo:	Valor de p* (3d x 7d x 14d)	
	Col I	Col III
D/c	<0,001	<0,001
D/s	0,123	<0,001
ND/c	<0,001	<0,001
NC/s	<0,007	<0,005

* ANOVA com medidas repetidas

Nos subgrupos em que houve diferença estatisticamente significativa, os momentos foram comparados dois a dois, como apresentado na tabela abaixo.

Tabela - 18 Comparação dois a dois do colágeno I e III.

Momentos comparados	D/c		D/s		ND/c		ND/s	
	Col I	Col III	Col I	Col III	Col I	Col III	Col I	Col III
3 d x 7 d	<0,001	<0,001	-	0,629	<0,005	<0,001	0,646	<0,011
3 d x 14 d	<0,001	<0,001	-	<0,002	<0,045	<0,001	<0,009	<0,002
7d x 14 d	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,004	0,438

A análise indicou que o subgrupo D/s foi o único que não apresentou variação significativa do Colágeno I e o Colágeno III apresenta redução significativa a partir do 7º dia. Os demais subgrupos apresentaram variações significativas nas duas variáveis, mas com comportamentos distintos, como pode ser observado nos Gráficos 4 e 5. No subgrupo D/c houve acentuada redução da presença do Colágeno I e aumento de Colágeno III. No subgrupo ND/c ocorreu uma redução do Colágeno I e aumento do Colágeno III até o 7º dia; sendo que no 14º dia este subgrupo apresentou Colágeno I em valores acima dos iniciais, e, Colágeno III, abaixo dos valores iniciais. O subgrupo ND/s apresentou redução do Colágeno I após o 7º dia e um aumento do Colágeno III até o 7º dia.

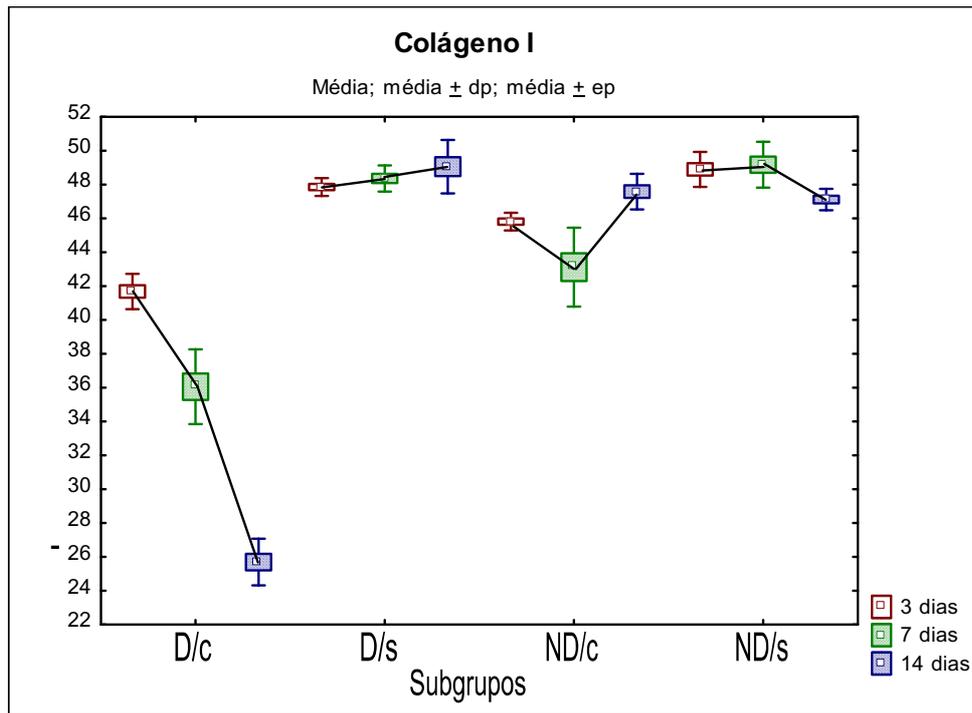


Figura 19: Gráfico 4 - Colágeno tipo I.

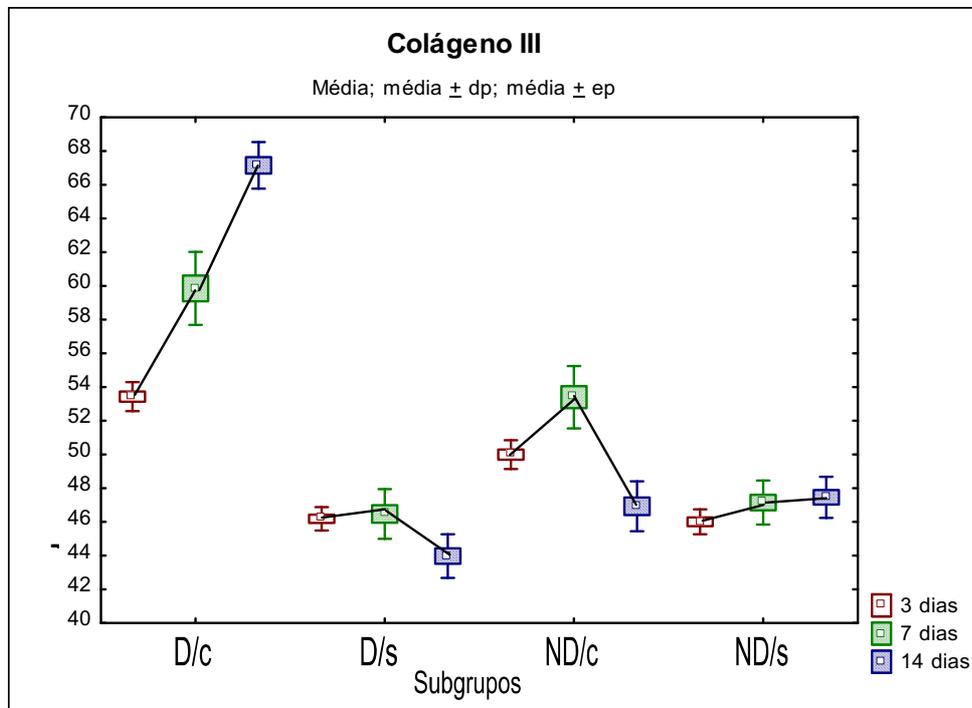


Figura 20: Gráfico 5 - Colágeno tipo III.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, devido aos seus efeitos mecânicos (WATSON, 2008), o UST no modo pulsado é mais utilizado que o ultrassom contínuo como recurso auxiliar no tratamento de reparos da pele.

A cicatrização no paciente diabético é comprometida devido a diversas falhas em uma complexa cadeia de eventos bioquímicos e moleculares. Nessa pesquisa experimental foi necessário induzir a diabetes nos animais do experimento para que se chegasse a uma condição semelhante ao processo diabético.

Pelos resultados obtidos, os animais que foram submetidos à indução da diabetes pela droga Streptozotocina apresentaram relevantes características patológicas que o paciente diabético apresenta. Conforme Rodríguez e Méndez (1994) a Streptozotocina compromete uma significativa quantidade de células do pâncreas causando condição diabética nos animais induzidos, que apresentaram hiperglicemia, desidratação e perda de peso.

A comparação dos grupos D e ND em relação à glicemia mostrou que houve uma diferença significativa da glicemia entre os grupos, em todos os tempos avaliados, comprovando o estado diabético dos animais induzidos com o uso da Streptozotocina.

Na tabela 1 (pág. 54) observamos que conforme os dias do experimento foram passando a hiperglicemia dos animais se manteve. No décimo dia de experimento o grupo D apresentou uma média de glicemia de 365,5 mg/dl, em comparação ao grupo ND com uma média glicêmica de 75,8 mg/dl. Os valores normais de referência para a glicemia dos ratos Wistar é de 75mg/dl (BIRCHARD e SHERDING, 2004). No grupo ND com 14° dias a glicemia não foi aferida, pois tendo apresentado níveis glicêmicos normais nas aferições anteriores, não haveria possibilidade de apresentarem resultado diferente.

Com isso, os dados confirmam que os animais ficaram hiperglicêmicos em relação ao grupo controle e o quadro de hiperglicemia se manteve durante todo o período de realização da pesquisa.

Na literatura, pesquisas experimentais mostram que a droga Streptozotocina causa hiperglicemia e algumas condições diabéticas (ALMEIDA, FERREIRA e BÓSCOLO, 2002; CARDENAS, 2005; HOLST e DEACON, 2007; KVETNOI *et al.*,

2006; SATO *et al.*, 2006; SENNOUNE *et al.*, 2000; THULESEN *et al.*, 1997) o que foi constatado pelo experimento.

Na comparação intra-grupo D (D/c x D/s), observou-se que os dois subgrupos não apresentaram diferença estatística significância, indicando a homogeneidade do estado diabético dentro do grupo D.

Já na comparação intra-grupo ND (ND/c x ND/s) em relação à glicemia, houve significância estatística com valor de $p < 0.005$ no dia da cirurgia, com o subgrupo ND/c apresentado uma glicemia média inferior à do subgrupo ND/s. Este fato pode estar relacionado a uma possível hipoglicemia nos animais no subgrupo ND/c pelo jejum pré-operatório a que foram submetidos. Nos demais momentos avaliados não houve diferença entre os dois subgrupos, indicando homogeneidade do padrão glicêmico dentro do grupo ND.

Na comparação dos pesos dos animais, a Tabela 4 (pág. 57) mostra que no dia da cirurgia o peso entre os subgrupos era semelhante, não havendo diferença com significância estatística e indicando a homogeneidade da amostra em relação ao peso inicial.

Na evolução do experimento, apesar do estado diabético agudo instalado nos animais do grupo D, os subgrupos apresentaram diferenças significativas, como mostra a Tabela 5 (pág. 58), em que o subgrupo D/c teve uma média de peso menor que todos os outros, em todos os dias após a cirurgia, exceto no 10º dia em relação ao subgrupo D/s Gráfico 6.

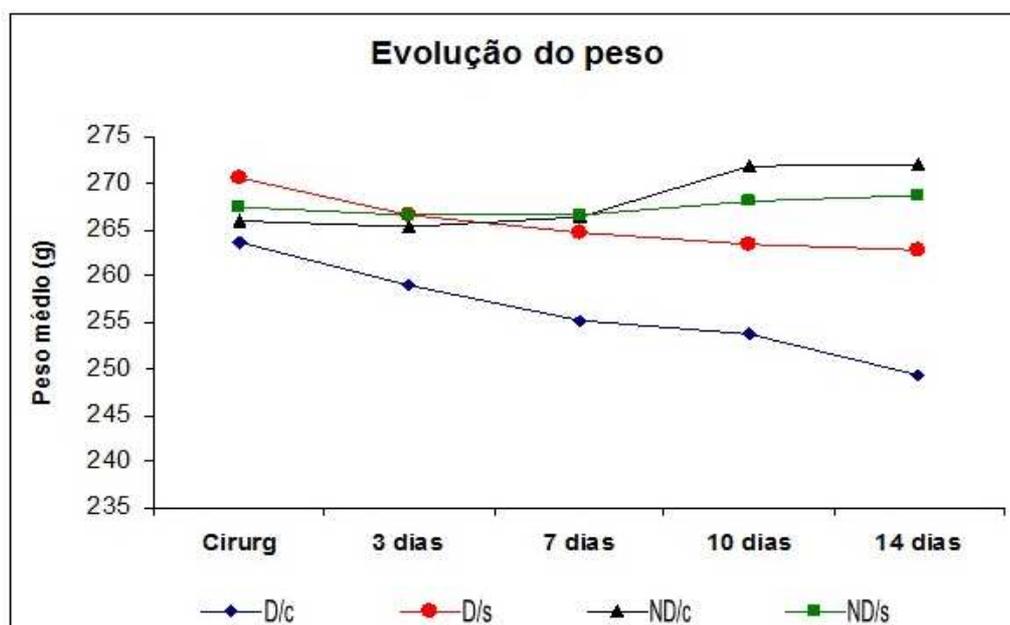


Figura 21: Gráfico 6 - Evolução do peso dos subgrupos em relação aos dias.

A diabetes é um fator causador da diminuição de peso dos animais, que no experimento não estavam sendo submetidos a tratamento para a doença. Como o subgrupo D/c teve uma perda de peso mais intensa, cogita-se a hipótese de que o UST no modo pulsado possa ter intensificado esta perda nestes animais, seja pelo aumento do metabolismo e/ou pelo aumento transitório da temperatura local, que pode ter contribuído para uma maior desidratação. No experimento os animais diabéticos não receberam tratamento para a hiperglicemia, o que nos leva a estabelecer um paralelo com pacientes diabéticos descompensados que apresentam perda de peso, poliúria, polidipsia, aterosclerose e microtromboses (BLAKYTNY e JUDE, 2006).

A literatura informa que o UST nos modos pulsado e contínuo pode promover um aquecimento dos tecidos biológicos causando um aumento do fluxo sanguíneo local (KITCHEN e BAZIN, 1998; SORIANO, PÉREZ e BAQUÉS, 2003), além de contribuir para a liberação de histamina, substâncias vasodilatadoras, aumento da atividade capilar e a reabsorção de metabólitos (SORIANO, PÉREZ e BAQUÉS, 2003; WATSON, 2003).

Os ratos ND não tiveram alterações significativas de peso no período avaliado. Se não tivessem sido submetidos a um procedimento com agressão cirúrgica, esperaria-se que ocorresse um aumento gradual de peso, o que seria a evolução natural dos animais. A discreta perda de peso e o retardo no aumento ponderal observados no Gráfico 1 (pág. 58), ser atribuídos à agressão cirúrgica e à recuperação da homeostasia, respectivamente.

Para verificar o efeito vasodilatador do UST no modo pulsado, esta pesquisa experimental utilizou um fluxômetro a laser em dois pontos de avaliação para cada animal. A comparação da fluxometria entre os subgrupos mostrou que todos os subgrupos apresentavam valores semelhantes num mesmo local e momento, não apresentando diferença estatística significativa.

Na comparação intra-subgrupos da fluxometria entre os locais pele e ferida, para cada momento de avaliação (Tabela 8, pág. 62), mostra-se os valores do fluxo sanguíneo pré-cirurgia não apresentaram diferença significativa, exceto no subgrupo D/s que apresentou um valor de $p < 0.030$, variação esta que pode ser atribuída a uma condição particular isolada deste subgrupo neste momento, que não tornou a se repetir.

Após a cirurgia, o subgrupo de ratos D/c apresentou um valor de $p < 0.012$, referente a uma maior circulação na pele em comparação à ferida, que pode ser consequência de uma vasodilatação na pele que ocorreu de forma isolada, não se repetindo nas demais avaliações.

Nos subgrupos D/s e ND/c, no 3º dia, previamente à aplicação do UST, houve uma diferença entre o fluxo da pele e da ferida, apresentando a pele um fluxo menor. Pode-se cogitar a hipótese de que, estando à ferida no início do processo inflamatório, ocorra um aumento fisiológico da circulação ao redor da ferida. Com a lesão tecidual, há liberação local de histamina, serotonina e bradicinina que causam uma vasodilatação e um aumento de fluxo sanguíneo no local e, consequentemente, sinais inflamatórios como calor e rubor (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BAUM e ARPEY, 2005; HARDING, MORRIS e PATEL, 2002; TAMIZA, VICENTE e MORIYA, 2008).

O subgrupo D/c após aplicação do UST no 3º dia apresentou diferença entre a pele e a ferida, com um valor de $p < 0.021$, devido a uma redução do fluxo na pele, local onde o UST não foi aplicado. Durante todo o experimento houve um controle adequado do ambiente, estando todos os ratos expostos às mesmas condições de temperatura e umidade relativa, por isto podemos considerar que estas variações foram excepcionais e não relacionadas ao uso do UST.

No 7º, 10º e 14º dia, nem antes e nem depois da aplicação do UST houve diferenças significativas entre a pele e a ferida em nenhum dos subgrupos.

Na comparação intra-subgrupos da fluxometria em um mesmo local, para as condições pré e pós UST, demonstrou-se que o UST não promoveu um aumento do fluxo sanguíneo local.

A comparação entre subgrupos em relação à diferença entre fluxometria pré e pós UST (Tabela 9, pág. 64) mostrou que o valor do fluxo sanguíneo antes e depois do ultrassom foi semelhante entre os subgrupos, exceto no 14º dia, onde o subgrupo ND/c apresentou uma redução do fluxo após a aplicação do UST, contrariando as postulações que afirmam que o UST promove aumento do fluxo sanguíneo local (KITCHEN e BAZIN, 1998; SORIANO, PÉREZ e BAQUÉS, 2003). Também não foi detectado efeito cumulativo do UST sobre o fluxo sanguíneo na região da ferida dos animais que receberam o tratamento.

No Gráfico 2 (pág. 65) constata-se que houve uma diminuição do fluxo sanguíneo principalmente no subgrupo ND/c e que nos demais subgrupos D/s, ND/c,

e ND/s houve um aumento do fluxo sanguíneo, mas não de forma significativa. Deste modo, não se detectou por meio da fluxometria a laser que o UST tenha alterado o fluxo sanguíneo tanto na ferida em relação a um local controle, não exposto ao UST, no mesmo animal, como entre os subgrupos que receberam ou não o tratamento ultrassônico. Talvez a alteração térmica do UST seja pequena e lábil, não sendo suficiente para produzir alteração do fluxo sanguíneo local.

A extensão da ferida foi mensurada para avaliar a influência do UST no modo pulsado na reposição tecidual e na contração de feridas diabéticas e não diabéticas.

Os dados da pesquisa revelaram que na comparação entre subgrupos em relação à extensão da ferida, houve semelhança no 3º e 14º dia. Somente no 7º dia a ferida no subgrupo D/c foi significativamente mais extensa em relação aos demais. Esta constatação não condiz com a fisiologia das fases da cicatrização e desaparece no período de avaliação seguinte. A contração da ferida ocorre gradualmente com o intuito de diminuir a área a ser recoberta pelo epitélio em proliferação. A ferida sofre um processo de contração, por meio de um movimento centrípeto de toda a espessura da pele circundante, reduzindo a quantidade e o tamanho da ferida. (GAWKRODGER, 2002; HARDING, MORRIS e PATEL, 2002; TAMIZA, VICENTE e MORIYA, 2008).

Pode-se atribuir esta alteração no 7º dia a um erro metodológico. No momento da confecção das lâminas o corte histológico ficou esticado, perdendo as relações anatômicas originais da peça que incluía a região da ferida, o que pode ter aumentado seu comprimento. Este erro metodológico poderia ser evitado ao se preservar a integridade anatômica da peça durante o emblocamento, corte e montagem das lâminas, ou utilizando técnicas de congelamento.

Durante o experimento foi avaliada a deposição de colágenos tipo I e III nas feridas. A comparação intra-subgrupos em relação aos percentuais de colágeno (Tabela 13, pág. 68 e Tabela 14 e 15, pág. 69) mostrou que em todos os momentos ocorreram diferenças significativas entre os subgrupos em relação à deposição de colágeno.

Na comparação dos subgrupos dois a dois em relação ao percentual de colágeno, o subgrupo D/c apresentou diferenças significativas em relação ao subgrupo D/s, em todos os momentos, para Colágeno I e Colágeno III, e, em relação à Substância de Fundo, a diferença ocorreu apenas no 3º dia.

Entre o subgrupo D/c e os subgrupos ND/c e ND/s também houve diferenças significativas em relação ao Colágeno I e Colágeno III em todos os momentos, mas em relação à Substância de Fundo, a diferença ocorreu apenas no 14º dia Gráfico 7.

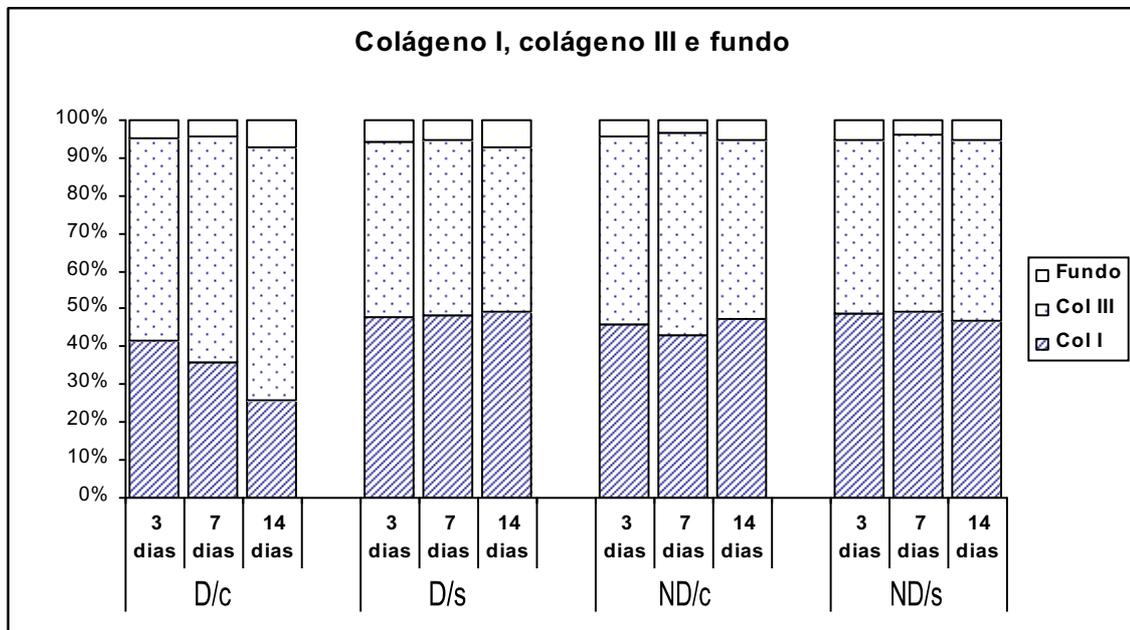


Figura 22: Gráfico 7 - Comparação do colágeno I, III e substância de fundo em relação aos dias do experimento.

Nos Gráficos 4 e 5 (pág. 72) é possível verificar que, do 3º ao 7º dia, os subgrupos que receberam UST diminuíram a predominância de Colágeno I e aumentaram a predominância de Colágeno III. Nos animais do subgrupo ND/c estes índices retornam a valores similares aos do processo natural observado no subgrupo ND/s. Já nos animais do subgrupo D/c o aumento de colágeno tipo III foi crescente em relação ao demais subgrupos.

Esse expressivo aumento de colágeno tipo III no subgrupo D/c, evidenciou que o UST influenciou a ferida diabética conforme as pesquisas já realizadas com UST na regeneração tecidual. Essas pesquisas demonstraram que o UST auxilia o processo de cicatrização de feridas, aumenta a síntese de proteínas, fibroplasia, síntese de colágeno e aumento de colágeno tipo III (AMÂNCIO, 2003; FERREIRA, 2005; KITCHEN e BAZIN, 1998; OLSSON *et al.*, 2008; SPEED, 2001; STARKEY, 2001; WATSON, 2008).

Há necessidade de salientar que o crescente aumento de colágeno tipo III na ferida diabética pode estar relacionado a um processo de cronificação da ferida, pois a hiperglicemia quando não controlada afeta adversamente a cicatrização levando a necrose tecidual (MEARA, *et al.* 2000; WEINGARTEN, *et al.* 2005).

Como sugestão de trabalhos futuros, seria de interesse investigar o uso da terapia ultrassônica até o 21º dia no grupo de animais diabéticos, pois existe uma grande dificuldade de manter estes animais vivos, já que não receberam tratamento para a hiperglicemia. Ressalta-se a importância de se controlar a hiperglicemia nos animais, pois pacientes diabéticos que controlam a hiperglicemia apresentam resultados satisfatórios na cicatrização, o que levaria a estabelecer uma aproximação dos diabéticos com hiperglicemia controlada com os não diabéticos, e, nesta condição verificar qual seria o efeito do UST.

A dosagem da hemoglobina glicada tem papel fundamental na monitorização do controle glicêmico em pacientes diabéticos fornecendo informações sobre o índice retrospectivo da glicose plasmática. A dosagem da glicose no sangue não constitui parâmetro eficiente para avaliação do controle da glicemia durante um intervalo de tempo prolongado. A grande vantagem A1C está no fato de não sofrer grandes flutuações, como na dosagem da glicose plasmática, bem como estar diretamente relacionada ao risco de complicações em pacientes com DM tipos 1 e 2 (BEM e KUNDE, 2006). Em trabalhos futuros deve-se considerar o uso da hemoglobina glicada como parâmetro de avaliação do estado diabético dos animais.

Outra linha de investigação que se faz necessária, é a de comparar os efeitos dos modos contínuo e pulsado do UST em animais diabéticos para que a indicação de uso destes recursos seja segura e cientificamente fundamentada.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir que:

- efeito do ultrassom terapêutico modo pulsado, com frequência 3MHz e intensidade de $0,5W/cm^2$, sobre a extensão de feridas em ratos diabéticos e não diabéticos, foi inconclusivo devido à falha metodológica;
- o ultrassom terapêutico modo pulsado, com frequência 3MHz e intensidade de $0,5W/cm^2$, influenciou o processo de cicatrização de feridas em ratos diabéticos e não diabéticos, promovendo uma predominância crescente do Colágeno III nos animais diabéticos, e alterando as proporções de Colágeno I e III nos animais não diabéticos, até o 7º dia de experimentação.
- o ultrassom terapêutico modo pulsado, com frequência 3MHz e intensidade de $0,5W/cm^2$, utilizado experimentalmente em ratos Wistar, não alterou o fluxo sanguíneo nas feridas de animais diabéticos e não diabéticos, nem imediatamente após a aplicação, nem com efeito cumulativo até o 14º dia de avaliação, utilizando-se a fluxometria a laser como método de aferição;

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. M.; FERREIRA, R. I.; BÓSCOLO, F.N. **Influence of irradiation on collagen content during wound healing in diabetic rats.** Pesquisa em Odontologia Brasileira, 16(4): p.293-298, 2002.

AMÂNCIO, A. G. **Efeitos do ultrassom terapêutico na integração de enxertos da pele total em coelhos.** 2003. 53f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR IEC 60601-2-5: Equipamento Eletromédico. Prescrições particulares para a segurança de equipamentos de ultrassom para terapia.** São Paulo, 2000.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol.41, n.1, jan/mar, 2005.

BARROS, Jr, E. A. **Os efeitos do Ultrassom na cicatrização de tendões flexores de coelhos após tenorrafia.** 2001, 96f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. Department of dermatology, University of Iowa Hospitals. **American Society for Dermatology Surgery.** 2005.

BEM, A. F.; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas da Diabetes Mellitus. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 42 n° 3, p.185-191. Junho 2006.

BIRCHARD, J, S.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais.** São Paulo: Roca, 2004.

BLAKYTNY, R.; JUDE, E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. **Diabetes UK.** Diabetic Medicine. v.23, p.594-608, 2006.

BORGES, F. **Modalidades Terapêuticas nas disfunções estéticas.** São Paulo: Phorte, 2006.

BRADLEY, M.; CULLUM, N.; SHELDON, T. **The debridement of chronic wounds: a systematic review.** Health Technol Assess, 17p; 1999.

BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and Molecular basis of wound healing in diabetes. **Journal of Clinical Investigation.** May, Vol. 117 Issue 5, p.1219-1222, 2007.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.** p.117, v.12, 2006.

BYL, N. M., MCKENZIE, A., WONG, T., WEST, J., HUNT, T. K. Incisional wound healing: A controlled study of low and high dose ultrasound. **J. Orthop. Sports Phys. Ther.**, Alexandria, v. 18, n. 5, p. 619-628, 1993.

CALIANNO, C.; JAKUBEK, P. Wound bed preparation: the key to success for chronic wounds. **Nursing**, v36. N3. 2006.

CARDENAS, V. M. A. **Identificação dos ativos e o efeito das frações hidroalcoólica e acetato de etila de folhas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) sobre parâmetros bioquímicos em ratos wistar normais e com diabetes induzido por estreptozotocina.** 2005. 140f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo.

CAVALLINI, M. Autologous fibroblasts to treat deep and complicated leg ulcers in diabetic patients. **Wound repair and regeneration**, v.17, p.35-38, 2006.

CIVITELLO, M., CAMERON, M. H.; LEWIS, C.; GURSEL, K. Y.; ULUS, Y.; BILGIC, A.; DINCER, G.; KARST, G. Ultrasound efficacy, **Physical Therapy**, Oct. v84 i10 p.982, 2004.

CLARK, R. A. F. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. **Department of Dermatology and Medicine**, University of Colorado, Denver, 1990.

COLOMBO, et al. Efeitos da variação de intensidade acústica na consolidação ultrassônica de fraturas experimentais. **Revista de Ciência e Tecnologia**, 73-81, 1991.

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **Laboratory of cell biology, National Institute, National Institutes**, of health, Maruland, USA, 2007.

CRISCI, A. R. **Estudo Experimental dos efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre a regeneração do nervo ciático de ratos após neurotomia, mediante avaliações morfológicas e morfométricas**. 2001. 68f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2001.

CUNHA, A.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, n. 12, p.1691-1696, 2001.

DALECKI, D. Mechanical Bioeffects of Ultrasound. **Annu. Rev. Biomed. Eng**, New York, v. 48. April, 2004.

DEYNE, P. G.; KIRSCH-VOLDERS, M. Effects of Therapeutic Ultrasound on the Nucleus of Human Fibroblasts. **Physical Therapy**. Volume 75, Number 7 July 1995.

DIONISIO, V. C. **O efeito do ultrassom terapêutico na vascularização pós lesão muscular experimental em coelhos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

DUARTE, L. R.; XAVIER, C. A. M. Estimulação ultrassônica do calo ósseo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 18, p. 73-80, 1983.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, F. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of investigative Dermatology**, p.127, 514-525. doi: 10.103, 2007.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet Review**, Dermatology, p.9, 2005.

FERREIRA, A.; MENDONÇA, A. Ultrassom terapêutico nas lesões cutâneas. Uma revisão. **Revista Fafibe OnLine**, n.3, ago. 2007.

FERREIRA, M. C.; JÚNIOR, P. T.; CARVALHO, V. F.; KAMAMOTO, F. Complex wounds. **Clinics** v.61, p.571, 2007.

FERREIRA, S. F. **Efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos, mediante avaliação por planimetria.** 2005. 74f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FILHO, A. M. D.; AGUIAR, J. L. A.; ROCHA, L. R. M.; AZEVÊDO, I. M.; RAMALHO, E.; MEDEIROS, A. C. Efeitos do fator de crescimento de fibroblastos básicos e do seu anti-fator na cicatrização e maturação do colágeno de feridas infectadas de pele. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol. 22 (supl1), 2007.

FRAZIER, K.; WILLIAMS, S.; KOTHAPALLI, D.; KLAPPER, H.; GROTENDORST, G. R. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. **Department of cell biology and anatomy**, Miami, 1996.

FREEDBERG, I. M.; et al. **Fitzpatrick Tratado de Dermatologia.** 5 ed. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2005. p.88-259.

FREITAS, L. B. S. **Avaliação dos efeitos do ultrassom na cicatrização muscular através de parâmetros de estresse oxidativo em modelo animal de lesão muscular.** 2007. 86f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.

FYFE, M.C.; BULLOCK, M.I. Therapeutic ultrasound: some historical background and development in knowledge of its effects on healing. **Journal of Physiotherapy**, 1985.

GAWKRODGER, J. D. **Dermatologia.** 2º Edição. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of leukocyte Biology.** v.69, April, 2001.

GOGIA, P. **Feridas, Tratamento e Cicatrização,** Rio de Janeiro:Revinter, 2003.

GOOVA, M. T.; LI, J. KISLINGER, T.; BUCCIARELLI, L. G.; CALISTE, X.; STERN, D. M. Blockade of receptor for advanced glycation end products restores effective wound healing in diabetic mice. **American Journal of Pathology**, vol.159, n.2, August 2001.

GOUVÊA, C. M. C. P.; VIEIRAL, P.M.N.; AMARA, A. C. Efeito do ultrassom na recuperação do músculo tibial anterior de rato lesado. **Un. Alfenas, Alfenas**, 4: p.165-173, 1998.

GREENHALGH, D. G. Wound heading and diabetes mellitus. **Clinics in plastic surgery**, v.30, 2003.

GRECA, F. H.; SIMÕES, M. L. P. B.; ARAÚJO, C. F. R.; COLLAÇO, L. M.; MANSUR, A. E. C.; KANTOR, D. C.; MORGENSTERN, G. A. Efeito do ultrassom terapêutico nas anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Set, v.14, n.3, São Paulo, 1999.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

HAAR, G. Therapeutic ultrasound - Review. **European Journal of Ultrasound**. v. 9, p. 3-9, 1999.

HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. Heading Chronic Wound. **British Medical Journal**, Jan 19. 2002.

HARVEY, C. Wound Healing. **Orthopaedic Nursing**. Volume 24, Number 2. p.143-149, March/April 2005.

HART, J. **The effect of therapeutic ultrasound on dermal repair with emphasis on fibroblast activity**. Tese (Doutorado) - University of London, 1993.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.**, v.88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HESS, C. T. Managing a diabetic ulcer. **Nursing**; Jul, 2003.

HIRAOKA, C. M. **Estudo das alterações dos tecidos periodontais durante a movimentação ortodôntica em ratos diabéticos**. 2007. 117f. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Paulista.

HOLST, J. J.; DEACON, C. New horizons in Diabetes therapy. **Immun., Endoc. & Metab.** Agents in Med. Chem, 2007.

IRION, G. **Feridas, Novas Abordagens, Manejo Clínico e Atlas em Cores** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2005.

JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas** São Paulo: Atheneu, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia e Biologia Celular** 11 Edição, Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, RJ, 2007.

KALANI, M.; APELQVIST, J.; BLOMBACK, M.; BRISMAR, K.; ELIASSON, B.; ERIKSSON, J.W. Effect of dalteparin on healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease. **Diabetes Care**, v.9, 2003.

KAMAMOTO, F. Contração de Feridas: **Revisão Bibliográfica e estudo da contração gerada por fibroblastos normais e de quelóides**. 2007. 117f. (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo.

KEDE, M. P.; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. São Paulo: Atheneu, 2004.

KIRCHNER, L. M.; MEERBAUM, S. O.; GRUBER, B. S.; KNOLL, A. K.; BULGRIN, F.; TAYLOR, R. A. J.; SCHMIDT, S. P. Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model. **Wound Repair and regeneration**. 2003.

KOMESU, M. C.; TANGA, M. B.; BUTTROS, K. R.; NAKAO, C. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. **Elsevier Pathophysiology**, 2004.

KRISHNAN, S. T. M.; QUATTRINI, C.; JEZIORSKA, M.; MALIK, R. A.; RAYMAN, G. Neurovascular factors in wound healing in foot skin of type 2 diabetic subjects. **Diabetes Care**, Dez, 2007.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10 ed. São Paulo: Manole, 1998.

KVETNOI, I. M.; RYZHAK, A. P.; KOSTYUCHEK, I. N.; TAFEEV, A. Effect of tetrapeptide pancragene on function morphology of the pancreas in rats with experimental diabetes mellitus. **Bulletin of experimental Biology and Medicine**, vol. 143, n.3, March, 2006.

LAPLANTE, A. F.; GERMAIN, L., AUGER, F. A., MOULIN, V. Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. **Laboratoire d'organogénèse expérimentale**, Québec, 2001.

LEUNG, M. C. P.; NG, G. Y. F.; YIP, K. K. Therapeutic ultrasound enhances medial collateral ligament repair in rats. **Ultrasound in Med & Biol**. Vol.32, n.3, p.449-452. 2006.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, 2007.

LOPES, N. S. **Eficácia antinociceptiva e antiedematogênica do ultrassom terapêutico (modo pulsado) na resposta inflamatória aguda, em ratos**. 2006. 102f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

LOWE, A. S., WALKER, M.D., COWAN, R., BAXTER, G.D. Therapeutic ultrasound and wound closure: lack of healing effect on x-ray irradiated wounds in murine skin. *Arch. Phys.Med. Rehabil.*, Chicago, v. 82, n, 11, p. 1507-11, 2001.

LOW. J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: Princípios e Práticas**. 1º Edição, São Paulo: Manole, 2001.

MACDIARMID, T.; BURNS, P. N.; LEWITH, G. T. Ultrasound and the treatment of pressure sores. **Physiotherapy**, v. 71, p. 66-77, 1985.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. **Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares** Parte I – Anais Brasileiros de Dermatologia. Rio de Janeiro, 2003.

MEARA, S. O.; CULLUM, N.; MAJID, M.; SHELDON, T. Systematic reviews of wound care management: antimicrobial agents for chronic wounds; diabetic foot ulceration. **Health Technology Assessment** p. 46-55, vol.4, n.21, 2000.

MEDEIROS, A. C.; FILHO, A. M. D.; NETO, T. A.; LIMA, F. P.; AZEVÊDO, I. M.; ALVES, S. G. O fator de crescimento de fibroblasto básico melhora a cicatrização de anastomoses duodenais em ratos. **Acta cirúrgica Brasileira**, v.18, supl.1, 2003.

MENDONÇA, A. C.; FERREIRA, A. S.; BARBIERI, C. H.; THOMAZINE, J. A.; MAZZER, N. Efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta ortop. bras**, v.14, n.3 São Paulo, 2006.

MENEZES, D. F. **Aplicação do Ultrassom Terapêutico em lesão Muscular experimental aguda**. Dissertação de (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Ribeirão Preto 1997.

MILLER, M. C.; NANCHAHAL, J. Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring. **Adis data information BV. Biodrugs**, 2005.

NOLASCO, M. A. **Estímulo da cicatrização de pele de ratos diabéticos por ultrassom**. 1993. 63f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

OLSSON, D. C.; MARTINS, V. M. V.; PIPPI, N. L.; MAZZANTI, A.; TOGNOLI, G. K. Ultrassom terapêutico na cicatrização tecidual. **Revista Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.1199-1207, Jul, 2008.

ORPHEU, S. C. Estudo **Histomorfométrico comparativo do colágeno e elastina na pele abdominal humana após perda ponderal maciça**. 2008. 90f. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo.

PEPPA, M.; BREM, H.; EHRLICH, P.; ZHANG, J. G.; CAI, W.; LI, Z.; VLASSARA, H. Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. **Diabetes**, vol.52, Nov. 2003.

PESCHEN, M.; et al. Low-frequency ultrasound treatment of chronic venous leg ulcers in an outpatient therapy. **Acta Dermato-Venereologia**, v.77, n.4, p.311-314, 1997.

PIAGGESI, A.; VIACAVA, P.; RIZZO, L.; NACCARATO, G.; BACCETTI, F.; ROMANELLI, M.; ZAMPA, V.; PRATO, S. D. Semiquantitative analysis of the histopathological features of the neuropathic foot ulcer. **Diabetes Care**, Nov. 2003.

PRENTICE, W; QUILLEN, W; UNDERWOOD, F. **Modalidades terapêuticas para fisioterapeutas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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

ROBERTSON, V. J., BAKER, K. G. A. A review of therapeutic ultrasound: Effectiveness Studies. **Phys. Ther.** Number 7, 81, p. 1351-1358, 2001.

RODRÍGUEZ, H. G. R.; MÉNDEZ, J. D. Diabetes Mellitus Experimental. **Ciências Veterinária**. Universidad Nacional Autónoma de México, v.6, 1994.

ROMANO, C. V. G. **Os efeitos do ultrassom terapêutico aplicado na fase precoce de cicatrização do tendão flexor. Estudo biomecânico em tendões de coelho**. 2001. 86f. (Dissertação de Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

SAARISTO, A.; TAMMELA, T.; FARKKILA, A.; KÄRKKÄINEN, M.; SUOMINEN, E.; YLA-HERTTUALA, S.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor - C accelerates diabetic wound healing. **The American Journal of Pathology**, vol. 169, n.3, September, 2006.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2ª. Edição. São Paulo: Editora Artes Médicas, 2001.

SATO, K. L.; MIGLIACCIO, V.; CARMO, J. M.; OLIVETTI, M. C. D. B.; FERREIRA, R. S.; FAZAN, V. P. S. Diabete como Modelo de neurotômia autonômica. **X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular**. 39 (1): p.28-38, Jan-Mar. 2006.

SCHUNCK, M.; NEUMANN, C.; PROKSCH, E. Artificial barrier repair in wounds by semi-occlusive foils reduced wound contraction and enhanced cell migration and reepithelization in mouse skin. **The Society for investigation Dermatology**, 2005.

SENNOUNE, S.; GERBI, A.; DURAN, M. J.; GRILLASCA, J. P.; COMPE, E., PIERRE, S.; PLANELLS, R.; BOURDEAUX, M.; VAGUE, P.; PIERONI, G.; MAIXENT, J. M. Effect of streptozotocin-induced diabetes on rat liver Na⁺/K⁺ - ATPase. **Euro Journal. Biochem FEBS**. v.267, p.2071-2078, 2000.

SIMÕES, M. L. P. B.; TERRANOVA, O.; IOSHII, S. O.; BORSATO, K. S.; WEINGÄRTNER, J.; NOGUEIRA, G.; LONGHI, P. **Efeitos do envelhecimento na cicatrização da parede abdominal, em ratos.** *Acta cirúrgica Brasileira*, vol.20, 2005.

SIVAN-LOUKIANOVA, E.; AWAD, O. A.; STEPANOVIC, V.; BICKENBACH, J.; SCHATTEMAN, G. C. CD34+ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *Journal of vascular research*, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, Hemoglobina Glicada. n.6, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>>. Acesso em: 29 de Julho de 2010.

SORIANO, M; PÉREZ, S; BAQUÉS, M. **Teoria e prática para a utilização de correntes em estética.** Sant Quirze Del Vallès: SOR International, 2003.

STARKEY, C. **Recursos Terapêuticos em Fisioterapia.** 3º Edição, São Paulo: Manole, 2001.

SPEED, C. A. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology*, New York, v.40, n 12, p 1331-1336, 2001.

SUMITA, N. M.; ANDRIOLO, A. Importância da hemoglobina glicada no controle da Diabetes Mellitus e na avaliação de risco das complicações crônicas. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* v. 44 n° 3, p.169-174. Junho 2008.

TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. Angiogenesis in wound healing. *The Society for Investigative Dermatology*, New York, 2000.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, Takachi . **Biologia da ferida e cicatrização.** *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 41, p. 255-260, 2008.

TER HAAR, G. Basic physics of ultrasound. *Physiotherapy*, London, 1987.

TER HAAR, G. **Therapeutic ultrasound.** *European Journal of ultrasound*, p.3-9, 1999.

TER HAAR, G. COUSSIONS, C. High intensity focused ultrasound: Physical principles and device, *Informa Health Care* London, vol. 23, n. 3, p. 89-104, 2007.

TIPLER, P. **Física para Cientistas e Engenheiros – Gravitação, ondas e termodinâmica**. 3. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1991.

TURNER, S.; POWELL, E.; EGHING, I. The effect of ultrasound on the healing of repaired cockered tendon. **Journal of hand surgery**, v. 14, n. 4, 1989.

THULESEN, J.; ORSKOV, C.; HOLST, J. J.; POULSEN, S.S. **Short term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats**. *Endocrinology*, vol.138, n.1, 1997.

VISNARDI, A. R. **Efeito do ultrassom de baixa intensidade no colágeno de pele sadia de ratos**. 2007. Dissertação (Dissertação de Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

WATSON, T. Electrotherapy and tissue repair. **Sportex-Medicine**, v. 29, p. 7-13, 2006.

WATSON, T. **Estimulação elétrica para a cicatrização de feridas: uma revisão do conhecimento atual**. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. *Eletroterapia: prática baseada em evidências*. 11. Ed. São Paulo: Manole, 2003.

WATSON, T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. **Ultrasonics**, v. 48, p. 321-329, 2008.

WAUGH, H. V.; SHERRATT, J. A.; Modeling the effects of treating diabetic wounds whit engineered skin substitutes. **Wound repair and regeneration**, v.15, p.556-565, 2007.

WEINGARTEN, M. S.; PAPAZOGLU, E.; ZUBKOV, L.; ZHU, L.; VORONA, G.; WALCHACK, A. Measurement of optical properties to quantify healing of chronic diabetic wounds. **The wounds healing Society**, 2005.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. F. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. **The journal of cell biology**, 1990.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.** 83:835-870, 2003.

YOUNG, S. R., DYSON, M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. **Ultrasonics**, London, v. 28, p. 175-180, 1990.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética no uso de animais.**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro do projeto no CEUA: 399

Data do parecer: 10/12/2008

Título do Projeto:

Efeito do ultra-som terapêutico na cicatrização de feridas induzidas em ratos diabéticos

Pesquisador responsável:

Jacques de Lima Ferreira

Equipe da pesquisa:

João Antônio Palma Setti
Josué Bruginski de Paula

Instituição:

PUCPR

Categoria do Experimento – C

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Rattus norvegicus albinus,</i> <i>Rodentia mammalia</i>	Macho	3 meses, 250g	125

O colegiado do CEUA em reunião no dia 04/12/2008, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO.**

- Rever dosagem das drogas

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

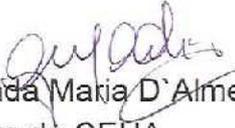
Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JL', is written below the text.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Curitiba, 10 de dezembro de 2008.

Atenciosamente


Profa. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora do CEUA
PUC PR



APÊNDICE A - Tabelas de resultados completas.

4.1 Comparação dos grupos D e ND em relação à glicemia

Tabela 1 - Comparação grupo D x grupo ND em relação à glicemia.

Glicemia	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Cirurg	D	48	331.3	328.0	276	409	28.4	
	ND	48	72.8	73.5	59	88	7.3	<0.001
3 dias	D	48	329.4	321.0	276	431	31.0	
	ND	48	75.5	75.0	61	89	7.8	<0.001
7 dias	D	32	343.1	350.5	276	460	33.1	
	ND	32	74.9	74.5	60	88	8.0	<0.001
10 dias	D	16	365.5	365.5	312	412	31.4	
	ND	16	75.8	74.0	60	88	6.6	<0.001
14 dias	D	16	384.1	379.0	302	465	40.6	
	ND	-	-	-	-	-	-	-

*Teste *t de Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

4.2 Comparação intragrupos Diabéticos (D/c e D/s) em relação à glicemia

Tabela 2 - Diabéticos com e sem ultrassom em relação à glicemia.

Variável	subgrupo D:	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Cirurg	D/c	24	337.4	332.5	302.0	409.0	28.0	
	D/s	24	325.1	319.5	276.0	382.0	28.0	0.134
3 dias	D/c	24	337.3	325.0	301.0	431.0	34.1	
	D/s	24	321.5	318.0	276.0	396.0	25.8	0.079
7 dias	D/c	16	341.8	332.5	290.0	460.0	39.0	
	D/s	16	344.4	351.5	276.0	376.0	27.2	0.831
10 dias	D/c	8	359.6	367.5	312.0	396.0	31.6	
	D/s	8	371.4	362.5	328.0	412.0	32.2	0.473
14 dias	D/c	8	387.6	393.0	302.0	465.0	50.1	
	D/s	8	380.6	365.5	348.0	423.0	31.5	0.743

* Teste *t de Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

4.3 Comparação intragrupo Não Diabético (ND/c e ND/s) em relação à glicemia.

Tabela 3 - Subgrupo Não Diabético com e sem ultrassom em relação à glicemia.

Variável	subgrupo ND:	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Cirurg	ND/c	24	69.9	69.0	59.0	80.0	6.3	
	ND/s	24	75.7	75.0	62.0	88.0	7.2	<0.005
3 dias	ND/c	24	76.3	75.0	67.0	89.0	7.3	
	ND/s	24	74.7	75.0	61.0	88.0	8.4	0.489
7 dias	ND/c	16	74.7	74.0	63.0	88.0	8.2	
	ND/s	16	75.2	76.5	60.0	87.0	7.9	0.862
10 dias	ND/c	8	74.9	74.0	60.0	85.0	7.5	
	ND/s	8	76.6	74.5	71.0	88.0	6.0	0.614
14 dias	ND/c	-	-	-	-	-	-	
	ND/s	-	-	-	-	-	-	-

* Teste *t* de Student para amostras independentes, $p < 0,05$. ND/c:

4.4 Comparação dos pesos dos animais

Tabela 4 - Comparação dos subgrupos em relação à variável peso.

Variável	subgrupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Peso cx	D/c	24	264	264	252	284	8	
	D/s	24	271	265	252	298	15	
	ND/c	24	266	262	251	289	9	
	ND/s	24	267	267	254	292	10	0.164
Peso 3d	D/c	24	259	258	243	276	9	
	D/s	24	267	263	246	290	14	
	ND/c	24	265	263	256	287	8	
	ND/s	24	267	265	252	290	10	<0.038
Peso 7d	D/c	16	255	255	242	275	10	
	D/s	16	265	259	247	291	14	
	ND/c	16	266	264	258	280	7	
	ND/s	16	267	265	252	285	8	<0.006
Peso 10d	D/c	8	254	252	240	267	8	
	D/s	8	264	257	242	291	18	
	ND/c	8	272	272	257	284	9	
	ND/s	8	268	269	257	280	7	<0.023
Peso 14d	D/c	8	249	250	241	260	6	
	D/s	8	263	256	245	283	17	
	ND/c	8	272	274	259	284	9	
	ND/s	8	269	270	260	275	6	<0.001

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$.

4.5 Comparação intra-subgrupos do peso dos animais nos momentos de avaliação

Tabela 5 - Comparação entre momentos de avaliação do subgrupo D/c.

Momentos comparados	Valor de p
Cirurgia x 3d	0,611
Cirurgia x 7d	0,027
Cirurgia x 10d	<0,001
Cirurgia x 14d	<0,001
3d x 7d	0,078
3d x 10d	<0,001
3d x 14d	<0,001
7d x 10d	0,023
7d x 14d	<0,001
10d x 14d	0,056

* Teste LSD, $p < 0,05$

Tabela 6 - Comparação entre momentos de avaliação do subgrupo D/s.

Grupos comparados	Valor de p
Cirurgia x 3d	0,004
Cirurgia x 7d	<0,001
Cirurgia x 10d	<0,001
Cirurgia x 14d	<0,001
3d x 7d	0,025
3d x 10d	<0,001
3d x 14d	<0,001
7d x 10d	0,054
7d x 14d	0,017
10d x 14d	0,604

* Teste LSD, $p < 0,05$

4.6 Comparação da fluxometria entre os subgrupos

Avaliação: Cirurgia

Tabela 7 - Fluxometria da pele e da ferida pré e pós cirurgia.

Variável	subgrupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Ferida PRÉ cx	D/c	24	3.66	2.68	0.85	11.30	2.77	0.778
	D/s	24	3.08	2.25	0.79	7.60	2.13	
	ND/c	24	3.10	2.47	1.03	6.20	1.53	
	ND/s	24	3.18	2.57	0.93	9.10	2.15	
Ferida PÓS cx	D/c	24	2.67	1.95	0.87	5.80	1.57	0.739
	D/s	24	3.39	2.11	0.67	14.90	3.26	
	ND/c	24	3.04	2.62	1.08	8.40	1.74	
	ND/s	24	3.35	2.43	0.82	15.10	3.10	
Pele PRÉ cx	D/c	24	3.33	2.49	0.76	8.30	2.28	0.503
	D/s	24	2.52	1.97	0.44	5.60	1.59	
	ND/c	24	2.90	2.21	0.75	6.60	1.56	
	ND/s	24	3.01	2.41	1.02	7.20	1.89	
Pele PÓS cx	D/c	24	3.72	3.30	0.92	9.20	2.50	0.174
	D/s	24	2.84	2.68	0.83	8.70	1.70	
	ND/c	24	2.89	2.51	1.24	7.30	1.44	
	ND/s	24	2.66	2.60	1.12	4.83	1.10	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$.

Avaliação: 3 dias

Tabela 8 - Fluxometria da pele e da ferida no terceiro dia.

Variável	subgrupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Ferida PRÉ 3d	D/c	24	3.86	3.89	1.16	7.90	2.12	0.336
	D/s	24	3.23	3.31	0.83	6.30	1.55	
	ND/c	24	3.52	2.98	1.49	8.50	1.69	
	ND/s	24	2.98	2.32	0.91	5.80	1.46	
Ferida PÓS 3d	D/c	24	3.85	4.03	1.29	7.90	1.98	0.149
	D/s	24	3.42	2.44	1.12	7.40	2.09	
	ND/c	24	3.48	3.24	1.09	8.00	1.75	
	ND/s	24	2.68	2.23	0.73	5.02	1.21	
Pele PRÉ 3d	D/c	24	3.35	3.11	0.96	9.00	1.78	0.165
	D/s	24	2.60	2.11	0.94	6.30	1.50	
	ND/c	24	2.59	2.66	0.88	4.48	1.03	
	ND/s	24	2.54	2.46	0.52	6.20	1.29	
Pele PÓS 3d	D/c	24	3.14	2.90	1.03	6.20	1.59	0.635
	D/s	24	2.71	2.47	1.25	6.70	1.32	
	ND/c	24	2.89	2.64	0.97	6.90	1.35	
	ND/s	24	2.66	2.46	0.39	5.80	1.34	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$.**Avaliação: 7 dias**

Tabela 9 - Fluxometria da pele e da ferida no sétimo dia.

Variável	subgrupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Ferida PRÉ 7d	D/c	16	3.23	3.13	0.88	6.60	1.95	0.338
	D/s	16	2.38	2.14	1.12	6.00	1.21	
	ND/c	16	3.02	2.57	1.01	6.90	1.53	
	ND/s	16	2.52	2.21	1.00	5.40	1.23	
Ferida PÓS 7d	D/c	16	3.05	2.22	0.97	7.30	1.94	0.521
	D/s	16	2.22	1.68	0.83	5.80	1.51	
	ND/c	16	2.59	2.33	0.97	5.70	1.26	
	ND/s	16	2.78	2.33	1.19	6.50	1.62	
Pele PRÉ 7d	D/c	16	2.82	2.17	0.91	9.90	2.14	0.721
	D/s	16	2.25	2.03	1.08	5.40	1.18	
	ND/c	16	2.61	2.29	1.15	5.00	1.12	
	ND/s	16	2.56	2.43	1.57	4.43	0.88	
Pele PÓS 7d	D/c	16	3.02	2.92	1.44	6.50	1.47	0.109
	D/s	16	2.00	1.60	1.00	5.20	1.14	
	ND/c	16	2.45	2.52	0.95	4.09	0.89	
	ND/s	16	2.53	2.73	0.61	4.13	1.04	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$.

Avaliação: 10 dias

Tabela 10 - Fluxometria da pele e da ferida no décimo dia.

Variável	subgrupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Ferida PRÉ 10d	D/c	8	3.19	3.04	0.95	6.30	1.93	0.656
	D/s	8	2.42	1.83	1.15	5.11	1.40	
	ND/c	8	2.91	2.61	1.28	4.75	1.17	
	ND/s	8	2.50	2.09	1.23	6.10	1.53	
Ferida PÓS 10d	D/c	8	2.55	2.77	1.20	4.01	1.05	0.711
	D/s	8	2.36	1.80	0.90	6.40	1.88	
	ND/c	8	2.46	2.33	0.94	4.00	0.99	
	ND/s	8	2.17	1.88	0.63	4.50	1.31	
Pele PRÉ 10d	D/c	8	2.46	2.52	1.23	3.74	0.76	0.393
	D/s	8	2.36	1.83	0.99	5.30	1.52	
	ND/c	8	2.99	3.13	0.97	4.34	1.09	
	ND/s	8	2.12	2.01	1.18	3.20	0.78	
Pele PÓS 10d	D/c	8	2.79	2.40	1.80	4.73	1.14	0.921
	D/s	8	2.65	2.53	1.59	4.00	1.03	
	ND/c	8	3.50	1.99	1.74	13.10	3.90	
	ND/s	8	2.50	2.10	1.43	4.19	0.97	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$.**Avaliação: 14 dias**

Tabela 11 - Fluxometria da pele e da ferida no décimo quarto dia.

Variável	subgrupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Ferida PRÉ 14d	D/c	8	2.82	2.03	0.94	6.10	1.98	0.097
	D/s	8	1.55	1.45	0.96	2.41	0.50	
	ND/c	8	3.65	3.09	1.40	8.20	2.36	
	ND/s	8	1.65	1.66	0.89	3.15	0.72	
Ferida PÓS 14d	D/c	8	3.25	1.66	0.85	8.50	2.89	0.579
	D/s	8	1.61	1.32	0.99	2.96	0.72	
	ND/c	8	2.48	2.26	1.19	4.09	1.31	
	ND/s	8	2.06	1.81	0.76	4.30	1.09	
Pele PRÉ 14d	D/c	8	3.25	2.17	1.19	7.80	2.52	0.406
	D/s	8	2.08	1.98	0.93	3.27	0.86	
	ND/c	8	3.48	2.65	0.98	8.10	2.49	
	ND/s	8	1.76	1.52	0.91	3.18	0.81	
Pele PÓS 14d	D/c	8	3.69	3.61	0.83	8.10	2.46	0.278
	D/s	8	1.91	1.77	0.94	3.87	0.98	
	ND/c	8	2.60	2.32	1.43	5.00	1.21	
	ND/s	8	1.86	1.68	1.08	2.90	0.59	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$

4.7 Comparação intra-subgrupos da Fluxometria entre os locais de aferição (pele e ferida), para cada momento de avaliação, pré e pós aplicação do UST

Avaliação: pré-cirurgia

Tabela 12 - Fluxometria entre pele e ferida pré cirurgia.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p*
D/c	Ferida		3.66	2.77			
	Pele	24	3.33	2.28	0.33	1.91	0.413
D/s	Ferida		3.08	2.13			
	Pele	24	2.52	1.59	0.57	1.20	<0.030
ND/c	Ferida		3.10	1.53			
	Pele	24	2.90	1.56	0.21	1.56	0.522
ND/s	Ferida		3.18	2.15			
	Pele	24	3.01	1.89	0.18	1.50	0.569

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$.

Avaliação: pós-cirurgia

Tabela 13 - Fluxometria entre pele e ferida pós cirurgia.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p*
D/c	Ferida		2.67	1.57			
	Pele	24	3.72	2.50	-1.05	1.87	<0.012
D/s	Ferida		3.39	3.26			
	Pele	24	2.84	1.70	0.55	3.35	0.432
ND/c	Ferida		3.04	1.74			
	Pele	24	2.89	1.44	0.15	1.46	0.613
ND/s	Ferida		3.35	3.10			
	Pele	24	2.66	1.10	0.69	2.67	0.219

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$.

Avaliação: pré 3 dias

Tabela 14 - Fluxometria entre pele e ferida antes da aplicação UST no terceiro dia.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p*
D/c	Ferida		3.86	2.12			
	Pele	24	3.35	1.78	0.51	1.91	0.206
D/s	Ferida		3.23	1.55			
	Pele	24	2.60	1.50	0.62	1.05	<0.008
ND/c	Ferida		3.52	1.69			
	Pele	24	2.59	1.03	0.92	1.86	<0.023
ND/s	Ferida		2.98	1.46			
	Pele	24	2.54	1.29	0.44	1.45	0.151

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$.

Avaliação: pós 3 dias

Tabela 15 - Fluxometria entre pele e ferida após a aplicação do UST no terceiro dia.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p*
D/c	Ferida		3.85	1.98			
	Pele	24	3.14	1.59	0.71	1.40	<0.021
D/s	Ferida		3.42	2.09			
	Pele	24	2.71	1.32	0.71	1.75	0.060
ND/c	Ferida		3.48	1.75			
	Pele	24	2.89	1.35	0.59	2.02	0.167
ND/s	Ferida		2.68	1.21			
	Pele	24	2.66	1.34	0.01	1.88	0.974

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$.

Avaliação: pré 7 dias

Tabela 16 - Fluxometria entre pele e ferida antes da aplicação do UST no sétimo dia.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p
D/c	Ferida		3.23	1.95			
	Pele	16	2.82	2.14	0.41	1.84	0.390
D/s	Ferida		2.38	1.21			
	Pele	16	2.25	1.18	0.13	0.71	0.467
ND/c	Ferida		3.02	1.53			
	Pele	16	2.61	1.12	0.42	1.18	0.178
ND/s	Ferida		2.52	1.23			
	Pele	16	2.56	0.88	-0.05	1.07	0.863

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$.

Avaliação: pós 7 dias

Tabela 17 - Fluxometria entre pele e ferida após a aplicação do UST no sétimo dia.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p
D/c	Ferida		3.05	1.94			
	Pele	16	3.02	1.47	0.03	2.21	0.957
D/s	Ferida		2.22	1.51			
	Pele	16	2.00	1.14	0.22	1.42	0.543
ND/c	Ferida		2.59	1.26			
	Pele	16	2.45	0.89	0.13	1.15	0.651
ND/s	Ferida		2.78	1.62			
	Pele	16	2.53	1.04	0.25	2.05	0.638

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$

Avaliação: pré 10 dias

Tabela 18 - Fluxometria entre pele e ferida antes da aplicação do UST no décimo dia.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p
D/c	Ferida		3.19	1.93			
	Pele	8	2.46	0.76	0.73	2.17	0.372
D/s	Ferida		2.42	1.40			
	Pele	8	2.36	1.52	0.07	2.09	0.930
ND/c	Ferida		2.91	1.17			
	Pele	8	2.99	1.09	-0.08	1.10	0.836
ND/s	Ferida		2.50	1.53			
	Pele	8	2.12	0.78	0.38	1.28	0.427

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$

Avaliação: pós 10 dias

Tabela 19 - Fluxometria entre pele e ferida após a aplicação do UST no décimo dia.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p
D/c	Ferida		2.55	1.05			
	Pele	8	2.79	1.14	-0.23	1.62	0.698
D/s	Ferida		2.36	1.88			
	Pele	8	2.65	1.03	-0.29	2.20	0.724
ND/c	Ferida		2.46	0.99			
	Pele	8	3.50	3.90	-1.04	4.20	0.506
ND/s	Ferida		2.17	1.31			
	Pele	8	2.50	0.97	-0.33	0.71	0.229

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$

Avaliação: pré 14 dias

Tabela 20 - Fluxometria entre pele e ferida antes da aplicação do UST no décimo quarto dia.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p
D/c	Ferida		2.82	1.98			
	Pele	8	3.25	2.52	-0.43	0.94	0.241
D/s	Ferida		1.55	0.50			
	Pele	8	2.08	0.86	-0.54	1.20	0.245
ND/c	Ferida		3.65	2.36			
	Pele	8	3.48	2.49	0.17	2.24	0.841
ND/s	Ferida		1.65	0.72			
	Pele	8	1.76	0.81	-0.11	0.64	0.656

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$.

Avaliação: pós 14 dias

Tabela 21 - Fluxometria entre pele e ferida após a aplicação do UST no décimo quarto.

subgrupo	Local	n	Média	Desvio padrão	Diferença média	Desvio padrão da dif	Valor de p
D/c	F PÓS 14d		3.25	2.89			
	PL PÓS 14d	8	3.69	2.46	-0.44	2.11	0.575
D/s	F PÓS 14d		1.61	0.72			
	PL PÓS 14d	8	1.91	0.98	-0.30	1.19	0.501
ND/c	F PÓS 14d		2.48	1.31			
	PL PÓS 14d	8	2.60	1.21	-0.12	0.89	0.710
ND/s	F PÓS 14d		2.06	1.09			
	PL PÓS 14d	8	1.86	0.59	0.20	0.95	0.565

* Teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$

4.8 Comparação intra-subgrupos da Fluxometria entre os momentos de avaliação para um mesmo local de aferição (pele ou ferida) e condição pré ou pós procedimento (cirurgia ou UST)

Ferida - Avaliações pré

Tabela 22 - Fluxometria da ferida antes da aplicação do UST.

subgrupo	Avaliação	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
D/c	Cirurg	8	3,6	2,6	1,4	7,5	2,5	
	3 dias	8	3,6	3,1	1,3	6,7	2,0	
	7 dias	8	3,2	3,2	0,9	5,5	1,7	
	10 dias	8	3,2	3,0	1,0	6,3	1,9	
	14 dias	8	2,8	2,0	0,9	6,1	2,0	0,817
D/s	Cirurg	8	3,0	2,0	1,1	7,6	2,5	
	3 dias	8	2,9	2,7	0,8	5,3	1,5	
	7 dias	8	2,2	2,4	1,1	3,2	0,8	
	10 dias	8	2,4	1,8	1,2	5,1	1,4	
	14 dias	8	1,5	1,4	1,0	2,4	0,5	0,136
ND/c	Cirurg	8	2,8	2,2	1,0	5,3	1,6	
	3 dias	8	3,0	2,7	1,5	5,1	1,2	
	7 dias	8	3,0	2,6	1,2	5,3	1,3	
	10 dias	8	2,9	2,6	1,3	4,8	1,2	
	14 dias	8	3,6	3,1	1,4	8,2	2,4	0,662
ND/s	Cirurg	8	2,4	2,4	0,9	4,7	1,5	
	3 dias	8	2,5	2,0	1,4	4,8	1,2	
	7 dias	8	2,4	1,9	1,0	5,4	1,4	
	10 dias	8	2,5	2,1	1,2	6,1	1,5	
	14 dias	8	1,7	1,7	0,9	3,2	0,7	0,212

* ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$

Ferida - Avaliações pós

Tabela 23 - Fluxometria da ferida após a aplicação do UST.

subgrupo	Avaliação	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
D/c	Cirurg	2,5	2,2	1,2	4,3	1,3	2,5	0,340
	3 dias	3,9	4,3	1,4	6,2	2,0	3,9	
	7 dias	3,5	2,6	1,4	7,3	2,3	3,5	
	10 dias	2,6	2,8	1,2	4,0	1,1	2,6	
	14 dias	3,2	1,7	0,9	8,5	2,9	3,2	
D/s	Cirurg	2,6	2,3	0,7	5,1	1,6	2,6	0,059
	3 dias	2,8	2,2	1,1	6,5	2,0	2,8	
	7 dias	2,0	1,3	0,9	4,5	1,3	2,0	
	10 dias	2,4	1,8	0,9	6,4	1,9	2,4	
	14 dias	1,6	1,3	1,0	3,0	0,7	1,6	
ND/c	Cirurg	8	2,6	2,4	1,3	4,4	1,3	0,080
	3 dias	8	3,7	3,4	1,1	8,0	2,2	
	7 dias	8	2,7	2,7	1,0	5,0	1,2	
	10 dias	8	2,5	2,3	0,9	4,0	1,0	
	14 dias	8	2,5	2,3	1,2	4,1	1,3	
ND/s	Cirurg	8	1,9	1,2	0,8	4,6	1,4	0,615
	3 dias	8	2,3	1,9	1,0	4,9	1,2	
	7 dias	8	2,7	2,0	1,2	6,5	1,9	
	10 dias	8	2,2	1,9	0,6	4,5	1,3	
	14 dias	8	2,1	1,8	0,8	4,3	1,1	

* ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$

Pele – Avaliações pré

Tabela 24 - Fluxometria da pele antes da aplicação do UST.

subgrupo	Avaliação	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
D/c	Cirurg	8	3,7	3,0	1,1	8,3	2,6	0,804
	3 dias	8	3,2	3,4	1,7	4,6	1,1	
	7 dias	8	3,4	2,4	0,9	9,9	2,9	
	10 dias	8	2,5	2,5	1,2	3,7	0,8	
	14 dias	8	3,2	2,2	1,2	7,8	2,5	
D/s	Cirurg	8	1,9	1,4	1,0	4,9	1,4	0,431
	3 dias	8	2,9	2,6	1,5	6,3	1,7	
	7 dias	8	1,9	1,8	1,1	3,2	0,7	
	10 dias	8	2,4	1,8	1,0	5,3	1,5	
	14 dias	8	2,1	2,0	0,9	3,3	0,9	
ND/c	Cirurg	8	2,8	2,1	1,2	6,6	1,9	0,559
	3 dias	8	2,3	2,7	0,9	4,2	1,1	
	7 dias	8	2,3	2,2	1,4	3,4	0,8	
	10 dias	8	3,0	3,1	1,0	4,3	1,1	
	14 dias	8	3,5	2,6	1,0	8,1	2,5	
ND/s	Cirurg	8	2,6	2,0	1,0	6,3	1,9	0,452
	3 dias	8	2,6	2,5	1,2	4,0	1,0	
	7 dias	8	2,3	2,3	1,6	3,2	0,6	
	10 dias	8	2,1	2,0	1,2	3,2	0,8	
	14 dias	8	1,8	1,5	0,9	3,2	0,8	

* ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$

Pele - Avaliações pós

Tabela - 25 Fluxometria na pele depois da aplicação do UST.

subgrupo	Avaliação	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
D/c	Cirurg	8	3,5	4,0	1,4	5,6	1,6	0,609
	3 dias	8	3,6	2,7	1,7	6,2	2,0	
	7 dias	8	2,6	2,7	1,5	3,9	0,9	
	10 dias	8	2,8	2,4	1,8	4,7	1,1	
	14 dias	8	3,7	3,6	0,8	8,1	2,5	
D/s	Cirurg	8	3,3	2,7	0,8	8,7	2,4	0,201
	3 dias	8	2,7	2,4	1,3	6,7	1,7	
	7 dias	8	1,8	1,5	1,0	3,0	0,7	
	10 dias	8	2,7	2,5	1,6	4,0	1,0	
	14 dias	8	1,9	1,8	0,9	3,9	1,0	
ND/c	Cirurg	8	3,2	2,6	1,2	7,3	2,0	0,811
	3 dias	8	2,4	2,6	1,0	3,8	1,0	
	7 dias	8	2,4	2,5	1,0	4,1	0,9	
	10 dias	8	3,5	2,0	1,7	13,1	3,9	
	14 dias	8	2,6	2,3	1,4	5,0	1,2	
ND/s	Cirurg	8	2,0	1,5	1,1	4,3	1,1	0,231
	3 dias	8	2,9	2,5	1,6	5,8	1,4	
	7 dias	8	2,1	1,7	0,6	4,1	1,1	
	10 dias	8	2,5	2,1	1,4	4,2	1,0	
	14 dias	8	1,9	1,7	1,1	2,9	0,6	

* ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$

4.9 Comparação entre subgrupos em relação à diferença entre a fluxometria pré e pós UST para um mesmo local de aferição e mesmo momento de avaliação

Tabela 26 - Fluxômetro

Local-avaliação	subgrupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Ferida – cx	D/c	24	-1,0	-0,6	-6,1	0,8	1,6	0,070
	D/s	24	0,3	-0,2	-2,5	8,5	2,2	
	ND/c	24	-0,1	-0,3	-1,3	3,1	1,2	
	ND/s	24	0,2	-0,1	-4,2	7,7	2,2	
Pele – cx	D/c	24	0,4	0,3	-3,9	4,9	2,0	0,451
	D/s	24	0,3	0,1	-2,3	7,7	2,1	
	ND/c	24	0,0	0,1	-2,7	1,9	1,0	
	ND/s	24	-0,3	0,1	-4,5	2,1	1,6	
Ferida – 3 dias	D/c	24	0,0	0,0	-3,6	3,1	1,4	0,545
	D/s	24	0,2	0,2	-2,0	2,7	1,1	
	ND/c	24	0,0	-0,4	-3,0	3,4	1,5	
	ND/s	24	-0,3	-0,3	-1,3	0,9	0,6	
Pele – 3 dias	D/c	24	-0,2	0,1	-5,8	2,5	1,7	0,644
	D/s	24	0,1	0,1	-2,0	2,0	1,0	
	ND/c	24	0,3	0,2	-2,5	2,9	1,4	
	ND/s	24	0,1	0,1	-2,0	3,4	1,2	
Ferida – 7 dias	D/c	16	-0,2	0,0	-4,7	3,8	1,8	0,544
	D/s	16	-0,2	-0,2	-2,1	1,8	1,0	
	ND/c	16	-0,4	-0,3	-1,7	1,0	0,7	
	ND/s	16	0,3	-0,1	-3,1	4,5	1,7	

Pele – 7 dias	D/c	16	0,2	0,3	-6,9	3,0	2,3	
	D/s	16	-0,3	-0,1	-2,4	1,4	1,0	
	ND/c	16	-0,2	-0,1	-2,5	1,0	0,9	
	ND/s	16	0,0	0,1	-1,6	1,9	0,9	0,819
Ferida – 10 dias	D/c	8	-0,6	-0,2	-2,7	0,7	1,4	
	D/s	8	-0,1	-0,3	-1,3	2,6	1,2	
	ND/c	8	-0,4	-0,8	-1,7	1,0	1,0	
	ND/s	8	-0,3	-0,4	-2,4	1,7	1,2	0,814
Pele – 10 dias	D/c	8	0,3	0,1	-0,8	1,8	1,0	
	D/s	8	0,3	0,2	-1,4	2,5	1,2	
	ND/c	8	0,5	-0,8	-2,6	10,1	4,1	
	ND/s	8	0,4	0,4	-0,9	1,6	0,7	0,998
Ferida – 14 dias	D/c	8	0,4	0,0	-0,5	2,4	1,0	
	D/s	8	0,1	-0,1	-1,0	1,9	1,0	
	ND/c	8	-1,2	-0,9	-4,1	-0,2	1,3	
	ND/s	8	0,4	0,2	-1,2	2,7	1,2	0,024
Pele – 14 dias	D/c	8	0,4	0,9	-2,9	2,1	1,6	
	D/s	8	-0,2	-0,1	-1,1	0,6	0,5	
	ND/c	8	-0,9	-0,4	-4,8	1,1	1,8	
	ND/s	8	0,1	0,0	-0,6	0,9	0,5	0,207

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$

4.10 Comparação da extensão da ferida entre os subgrupos, nos momentos de avaliação 3, 7, 14 dia.

Tabela 27 - Comparação dos subgrupos em relação à extensão da ferida

Variable	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Ext ferida 3d	D/c	8	4893652	4525270	3528111	6691892	1271349	0,585
	D/s	8	4572829	3792452	2971064	6840733	1604813	
	ND/c	8	5502212	5674948	3827941	6847826	1121161	
	ND/s	8	5126030	5337190	2882363	6757300	1416209	
Ext ferida 7d	D/c	8	6278401	6349060	5593965	6748476	355676	<0,001
	D/s	8	4158541	3879639	1270686	6606002	2165466	
	ND/c	8	3919730	3761470	1323816	6529290	1498327	
	ND/s	8	3012747	3844539	1253596	4282230	1420274	
Ext ferida 14d	D/c	8	4859323	3912426	835189	8694697	2664081	0,109
	D/s	8	6912114	7110098	3136031	9326433	2038571	
	ND/c	8	5523879	5431041	3919187	9142768	1746762	
	ND/s	8	4531746	4561982	2670969	6526672	1341353	

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$

4.11 Comparação entre os subgrupos em relação ao percentual de Colágeno I, Colágeno III e Substância de Fundo, os momentos de avaliação 3º, 7º e 14º dia

Tabela 28 - Comparação dos subgrupos em relação à extensão da ferida

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Col I 3d	D/c	8	41,7	41,9	40,2	42,7	1,0	
	D/s	8	47,9	47,8	47,0	48,8	0,5	
	ND/c	8	45,8	45,9	44,9	46,7	0,5	
	ND/s	8	48,9	49,0	47,5	50,2	1,0	<0,001
Col III 3d	D/c	8	53,4	53,4	52,3	54,6	0,9	
	D/s	8	46,2	46,1	45,3	47,3	0,7	
	ND/c	8	50,0	49,8	48,7	51,4	0,9	
	ND/s	8	46,0	46,2	45,0	46,9	0,7	<0,001
Fundo 3d	D/c	8	4,9	5,1	4,1	5,4	0,4	
	D/s	8	6,0	6,0	4,5	7,2	1,0	
	ND/c	8	4,2	4,1	3,4	5,3	0,6	
	ND/s	8	5,1	4,7	3,0	7,6	1,5	0,011
Col I 7d	D/c	8	36,1	37,0	32,6	38,6	2,2	
	D/s	8	48,4	48,5	46,9	49,5	0,8	
	ND/c	8	43,1	43,7	39,4	46,0	2,3	
	ND/s	8	49,2	49,1	47,6	51,2	1,4	<0,001
Col III 7d	D/c	8	59,9	59,6	56,8	62,9	2,2	
	D/s	8	46,5	46,4	44,2	48,6	1,5	
	ND/c	8	53,4	53,1	50,7	56,2	1,8	
	ND/s	8	47,1	47,6	45,1	48,4	1,3	<0,001
Fundo 7d	D/c	8	4,1	3,6	2,9	6,0	1,1	
	D/s	8	5,2	4,8	3,2	8,9	1,9	
	ND/c	8	3,5	3,8	2,1	4,4	0,9	
	ND/s	8	3,7	3,6	2,1	5,0	0,9	0,049
Col I 14d	D/c	8	25,7	25,9	23,2	27,3	1,4	
	D/s	8	49,1	49,4	46,6	51,4	1,6	
	ND/c	8	47,6	48,1	45,6	48,9	1,1	
	ND/s	8	47,1	47,1	46,2	47,9	0,6	<0,001
Col III 14d	D/c	8	67,2	67,0	65,6	70,0	1,4	
	D/s	8	44,0	44,2	41,1	45,3	1,3	
	ND/c	8	46,9	47,3	45,0	48,6	1,5	
	ND/s	8	47,5	47,2	45,9	49,8	1,2	<0,001
Fundo 14d	D/c	8	7,2	7,3	4,6	8,4	1,2	
	D/s	8	7,0	6,9	5,6	8,6	1,0	
	ND/c	8	5,5	5,4	4,2	6,9	1,1	
	ND/s	8	5,4	5,3	3,8	6,8	1,1	0,004

* ANOVA com um fator, $p < 0,05$

