

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LÍVIA CAROLINA DE SOUZA DANTAS

**PROPOSTA DE PROTOCOLO PARA A UTILIZAÇÃO DE ULTRASSOM
TERAPÊUTICO DE 3MHZ PULSADO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM RATOS WISTAR**

Maceió
2017

LÍVIA CAROLINA DE SOUZA DANTAS

**PROPOSTA DE PROTOCOLO PARA A UTILIZAÇÃO DE ULTRASSOM
TERAPÊUTICO DE 3MHZ PULSADO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues

Maceió

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

D192p Dantas, Livia Carolina de Souza.

Proposta de protocolo para a utilização de ultrassom terapêutico de 3MHZ pulsado no processo de cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos Wistar / Livia Carolina de Souza Dantas. – 2017.
67 f. ; il.

Orientador: Célio Fernando de Sousa Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 63-65.

1. Cicatrização de feridas. 2. Ferimentos e lesões. 3. Terapia por ultrassom. I. Título.

CDU: 616-003.9: 616-001-4



Folha de Aprovação

Livia Carolina de Souza Dantas

Proposta de protocolo para a utilização de ultrassom terapêutico de 3 MHz pulsado no processo de cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos Wistar

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 26 de julho de 2017.

Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues (Orientador)

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Freitas Monte Bispo - (UFAL)

Prof. Dr. Luiz Arthur Calheiros Leite - (UNCSAL)

Feliz àqueles que têm amigos e confia à Deus todas as coisas.

Dedico esse trabalho aos meus amigos que sempre torceram por mim; aos amigos científicos representados aqui pelo meu orientador professor Célio Rodrigues; aos meus pais, meus grandes incentivadores; ao meu esposo Diogo e ao meu filho João Pedro que sempre me fizeram acreditar que após o anoitecer o amanhã traria boas novas.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Doutor Célio Fernando, meus sinceros agradecimentos pelos anos dedicados ao saber e por permitir que eu possa desfrutar momentos de inestimável crescimento pessoal e profissional.

Aos alunos e amigos do grupo de pesquisa em Aterosclerose Humana pelas grandes contribuições a cada exposição deste trabalho, desde o surgimento da ideia até a produção textual final.

Aos meus primeiros professores no curso de Fisioterapia pelo incentivo na busca de uma nova ciência. A eles devo a minha formação intelectual e na Fisioterapia, profissão que tanto amo.

Aos funcionários técnicos dos Laboratórios do CPML e Biotério, aqui representados pelo técnico Marcelo.

Aos meus amigos do laboratório de Histologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, aqui representados pelo professor Dr. Vinícius Novaes e pela técnica do laboratório Ana Maria, que me receberam com enorme carinho e disposição para engrandecimento desse trabalho.

Aos meus amigos de trabalho que me ajudaram na reposição, anteposição e até substituição de aulas nos momentos em que me ausentei para cumprimento de carga horária das disciplinas.

Por fim, meu enorme agradecimento aos meus pais, Carmelita Marques e Ubiracy Dantas, que titulados por excelência em doutores da vida, me ensinaram a licitude e resiliência de caminhar por caminhos estreitos e difíceis.

Ao meu esposo e ao meu filho; palavra nenhuma caberia para agradecer tamanha cumplicidade.

E a Deus, sobre todas as coisas. Sem Ele nada disso seria permitido.

RESUMO

Introdução: No Brasil, as feridas constituem um sério problema de saúde pública, devido ao grande número de doentes com alterações na integridade da pele, embora sejam escassos os registros desses atendimentos. Na tentativa de minimizar o tempo de cicatrização tecidual, diversos estudos com animais vêm apresentando como fator coadjuvante a utilização do ultrassom terapêutico. Entretanto, não há padronização das doses para utilização dessa terapia em feridas cutâneas. **Objetivo:** Propor um protocolo para tratamento de feridas cutâneas experimentais por meio de ultrassom terapêutico pulsado de 3 MHz através das intensidades 1,0W/cm², 1,5W/cm², 2,0W/cm². **Material e método:** Trata-se de um estudo experimental e randomizado. Foram utilizados 60 ratos Wistar, machos, adultos. Os animais foram anestesiados e submetidos à cirurgia de exérese da pele através de um punch dermatológico n° 8. Os animais foram randomizados aleatoriamente em 4 grupos diferentes sendo eles: grupo controle; TA (1,0w/cm²); TB (1,5w/cm²) e TC (2,0w/cm²). Foi utilizado um UST de 3MHz, pulsado com 20% largura de pulso, 100Hz, por 2 minutos, diariamente. O grupo controle foi manipulado com o aparelho desligado. Cada grupo foi avaliado em 3 diferentes espaços de tempo: 3^o, 7^o e 15^o dia de pós-operatório. Foram feitas avaliações biométricas, morfométricas e estereológicas. Para a estatística foi utilizado o software PRISM 6.0 com o teste TWO-WAY ANOVA com pós-teste de BONFERRONI considerando p<0,05. **Resultados:** Na avaliação das variáveis para retração da área da ferida, porcentagem de retração, espessura de queratina e epitélio não houve diferença entre o grupo controle e os grupos irradiados com UST. Na análise estereológica, a densidade de volume e área de macrófagos diminuiu a medida que foi aumentada a intensidade testada. A intensidade de 2,0 W/cm² aumentou a proliferação de fibroblastos sugerindo uma cicatriz hipertrófica. Na análise qualitativa de colágeno e fibras elásticas, os grupos tratados com UST apresentam melhor distribuição das fibras no leito da derme. **Conclusão:** Neste modelo experimental, o protocolo de utilização do ultrassom terapêutico leva a uma organização das fibras colágenas, elásticas e adequada migração de fibroblastos quando tratadas com intensidade entre 1,0 e 1,5 W/cm² entretanto, não diminui o tempo de cicatrização de feridas cutâneas.

Palavras-Chave: Ultrassom Terapêutico. Feridas Cutâneas. Cicatrização.

ABSTRACT

Introduction: In Brazil, wounds are a serious public health problem, due to the large number of patients with changes in skin integrity, although the records of these treatments are scarce. In attempt to minimize tissue healing time, several animal studies have been presenting the use of therapeutic ultrasound as a coadjuvant factor. However, there is no standardization of doses for use of this therapy in cutaneous wounds. **Objective:** To propose protocol for treatment of experimental cutaneous wounds by means of 3 MHz pulsed therapeutic ultrasound through the intensities 1,0 W/cm², 1,5 W/cm², 2,0 W/cm². **Material and method:** This is an experimental and randomized study. Sixty male Wistar rats were used. The animals were anesthetized and submitted to skin excision surgery through a dermatological punch number 8. The animals were randomly randomized into 4 different groups being: control group; TA (1,0 W/cm²); TB (1,5 W/cm²) and TC (2,0 W/cm²). We used a 3 MHz UST, pulsed with 20% pulse with, 100Hz, for 2 minutes, daily. The control group was manipulated with the device switched off. Each group was evaluated in 3 different time frames: 3td, 7th and 15th postoperative days. Biometric, morphometric and stereological evaluations were performed. For the statistic, the PRISM 6.0 software was used with the TWO-WAY ANOVA test with BONFERRONI post-test considering p <0.05. **Results:** In the evaluation of the variables for retraction of the wound area, percentage of retraction, thickness of keratin and epithelium, there was no difference between the control group and the groups irradiated with TUS. In the stereological analysis, the volume density and area of macrophages decreased as the intensity tested was increased. The intensity of 2,0 W/cm² increased the proliferation of fibroblasts suggesting a hypertrophic scar. In the qualitative analysis of collagen and elastic fibers, the groups treated with UST show a better distribution of fibers in the dermis bed. **Conclusion:** In this experimental model, the protocol for the use of therapeutic ultrasound it leads to an organization of collagen fibers, elastic fibers and adequate migration of fibroblasts when treated with intensity between 1,0 and 1,5 W/cm² however does not reduce the healing time of cutaneous lesions.

Keywords: Therapeutic Ultrasound. Wound Cutaneous. Healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma para apresentação da síntese do processo de cicatrização de feridas cutânea	14
Figura 2- Efeito piezoelétrico que ocorre na parte interna do transdutor do UST	17
Figura 3- Profundidade de absorção das ondas Ultrassônicas com utilização de UST de 1 MHz e 3 MHz	18
Figura 4- Anestesia na região abdominal do animal	23
Figura 5- Procedimentos para realização da tricotomia manual no dorso do animal	24
Figura 6- Cirurgia para retirada do fragmento de pele realizada no dorso do animal na linha nugal entre as escápulas utilizando um punch dermatológico número 8.....	25
Figura 7- Aparelho de Ultrassom terapêutico Sonopulse III®	27
Figura 8- Posicionamento do paquímetro manual para mensuração dos diâmetros da ferida.....	31
Figura 9- Fotografia para captura do tamanho das feridas no 15º dia de tratamento	32
Figura 10- Avaliação da espessura do epitélio e queratina utilizando um sistema teste de 36 pontos e régua escolar 30 cm.....	33
Figura 11- Avaliação estereológicas de diferentes células da camada dérmica da pele....	34
Figura 12A- Análise qualitativa da área de retração da ferida 3º dia	36
Figura 12B- Análise qualitativa da área de retração da ferida 15º dia	37
Figura 13- Aspecto da deposição do colágeno tipo I e tipo III no 3º dia em animais dos grupos estudados – controle e tratados - (20X).....	38
Figura 14- Aspecto da deposição do colágeno tipo I e tipo III no sétimo dia em animais dos grupos estudados (Picrosirius Red – 20X)	39
Figura 14- Aspecto da deposição do colágeno tipo I e tipo III no décimo quinto dia em animais dos grupos estudados (Picrosirius Red – 20X).....	40
Figura 16- Aspecto da deposição de fibras elásticas no 3º dia em animais dos grupos estudados (Resorcina-Fucsina de Weigter – 40X).....	42
Figura 17- Aspecto da deposição de fibras elásticas no 3º e 7º dia no grupo de 1,0 W/cm ²	43

Figura 18- Apresentação das células de mastócitos presentes no processo inflamatório no 7º dia de tratamento. (Azul de Toluidina 40X)..... 44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1- Comparação das médias e desvio padrão (DP) das áreas de retração da ferida entre os grupos tratados com o Ultrassom Terapêutico <i>versus</i> grupo controle no 3º, 7º e 15º dia de tratamento.....	45
GRÁFICO 2- Comparação das médias e desvio padrão (DP) da porcentagem de retração da lesão entre os grupos tratados com o Ultrassom Terapêutico <i>versus</i> grupo controle no 3º, 7º e 14º dia de tratamento.....	46
GRÁFICO 3- Comparação das médias e desvio padrão (DP) da espessura do epitélio..	47
GRÁFICO 4- Comparação das médias e desvio padrão (DP) da espessura da queratina.....	48
GRÁFICO 5- Apresentação dos resultados comparativos de média e desvio padrão de Qa de macrófagos.	49
GRÁFICO 6- Apresentação dos resultados comparativos de média e desvio padrão de Vv de macrófagos.....	50
GRÁFICO 7- Apresentação dos resultados comparativos de média e desvio padrão de Qa de fibroblastos.....	51
GRÁFICO 8- Apresentação dos resultados comparativos de média e desvio padrão de Vv de fibroblastos.....	52
GRÁFICO 9- Apresentação dos resultados comparativos de média e desvio padrão de Vv de colágeno	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ARRIVE - Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (Pesquisa com animais: diretrizes para experimentos com animais)

AHE – Grupo de estudos em Aterosclerose Humana Experimental

cm²- centímetros quadrados

DP- Desvio padrão

ERA - Efetive Radiation Area (área de radiação efetiva)

g – gramas

h- Hora

Hz – Hertz

KHz – Kilohertz (unidade de medida de frequência)

Lv - Densidade de comprimento

mm² – Milímetro quadrado

mL/kg – Mililitro por quilo

MHz – Megahertz (unidade de medida de frequência)

mg/kg – Miligrama por quilo

mm²- milímetro quadrado

N.S. – não significante

PVC - Policloreto de vinila

Qa - Densidade de área

Sv - Densidade de superfície

US – Ultrassom

UST – Ultrassom Terapêutico

Vv - Densidade de volume medida em porcentagem

W/cm² – Watts por centímetro quadrado (unidade de medida de intensidade)

µm - Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 HIPÓTESE	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 O animal	21
5.2 Método de randomização e cálculo do tamanho da amostra	21
5.3 Procedimentos cirúrgicos	22
5.4 Avaliação da qualidade dos artigos	26
5.5 O aparelho.....	27
5.6 Tratamento com UST	28
5.7 Procedimentos histológicos	29
5.7.1 Tricrômio de Gomori	29
5.7.2 Azul de toluidina	29
5.7.3 Resorcina-Fucsina de Weigert.....	29
5.7.4 Picrosirius Red.....	30
5.7.5 Captura das Imagens.....	29
5.8 Captura das imagens e Análises	30
5.9 Análise Biométrica	30
5.10 Análise qualitativa	31
5.11 Análise Morfométrica da pele	32
5.12 Análise Estereológica da pele.....	33
5.13 Análise estatística	34
6 RESULTADOS	34
6.1 Análise qualitativa	36
6.1.1 Avaliação do fechamento da área da ferida.....	36
6.1.2 Avaliação da diferenciação do colágeno	38
6.1.3 Avaliação da deposição de fibras elásticas.....	42
6.1.4 Avaliação da distribuição de mastócitos no leito da ferida	44
6.2 Análise Biométrica	45
6.3 Análise Microscópica	47
6.4 Análise Estereológica	48
7 DISCUSSÃO	54
8 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as feridas constituem um sério problema de saúde pública, devido ao grande número de doentes com alterações na integridade da pele, embora sejam escassos os registros desses atendimentos. O elevado número de pessoas com úlceras contribui para onerar o gasto público, além de interferir na qualidade de vida da população (BRASIL, 2008).

Na tentativa de minimizar o tempo de cicatrização em feridas de diferentes tecidos, constantemente se buscam alternativas que colaborem com o processo de reparação tecidual. Assim, surgiu a utilização do ultrassom terapêutico (UST) que, dentre os modelos utilizados, este vem se mostrando um fator coadjuvante cada vez mais frequente na medicina reparativa (OLSSON et al., 2008).

Foi no final da década de 40 e início da década de 50 que se conseguiu com sucesso a primeira aplicação do ultrassom em medicina, sendo que, a partir daí, sua evolução ocorreu rapidamente (DIONÍSIO, 1999). O UST vem sendo utilizado como recurso terapêutico na cicatrização de diferentes tecidos (BAKER et al., 2001). Os artigos encontrados são unânimes em relatar os efeitos benéficos do Ultrassom terapêutico na cicatrização tecidual, contudo, os mecanismos fisiológicos que nela atuam ainda não estão bem esclarecidos (OLSSON et al., 2008).

Segundo OLSSON (2007), os modelos experimentais de terapia por ultrassom em animais têm propiciado informações relevantes para o tratamento de vários tipos de lesões, dentre elas as lesões cutâneas. Todavia, apesar de serem muito utilizados, ainda existem controvérsias em relação aos seus potenciais biológicos de acordo com a modalidade e a dosimetria indicada para cada caso.

O UST é uma forma de energia mecânica não audível, de alta frequência, na faixa de 20 KHz. Historicamente, foi descoberto em 1880, pelo casal Pierre e Marie Curie que, ao aplicar uma corrente elétrica sobre um cristal de quartzo envolto por placas metálicas, evidenciaram o efeito piezoelétrico e constataram uma vibração de alta frequência (FREITAS, 2011).

O aparelho de UST possui um cristal de quartzo adequadamente cortado para sofrer mudanças durante a aplicação da energia elétrica e gerar ondas com diferentes frequências e intensidades. A transformação de um tipo de energia em outro, nesse caso, energia elétrica em sonora é chamada de efeito piezoelétrico (BAKER et al., 2001).

Assim, em 1927, Wood e Loomis, perceberam que essas ondas poderiam causar mudanças permanentes em tecidos biológicos; através da absorção das ondas ultrassônicas (FREITAS, 2011).

A pele é um órgão de revestimento do corpo e divide-se em três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme. Embora seja estudada dentro do sistema tegumentar, alguns autores não consideram a hipoderme como parte da pele (NITZ et al., 2006).

A epiderme é um tecido epitelial estratificado queratinizado, avascular, constituído por ceratinocítico e anexos como pelo e glândulas (SOUTO et al., 2006). Já a derme consiste em um tecido conjuntivo frouxo composto de proteínas fibrosas, especialmente o colágeno e a elastina dispersos em meio a uma substância basal amorfa (NESTLÉ et al., 1993).

A cicatrização de feridas é um evento complexo, que envolve a interação de diversos componentes celulares e bioquímicos e ocorre espontaneamente, sem intervenções externas, mas que, quando tratada através de artifícios, tende a ocorrer de forma mais rápida e com melhores resultados funcionais e estéticos (MENDONÇA, 2006).

Esse processo tem sido convenientemente dividido em três fases que se sobrepõem de forma contínua e temporal: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (figura 1). Essas fases não ocorrem em uma linearidade, podendo os eventos acontecer de tal forma que uma fase se sobressaia sobre as demais em ordem não cronológica (SINGER, 1999).

A fase inflamatória inicia-se logo após um ferimento, apresentando extravasamento sanguíneo, o qual preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação geram um tampão rico em fibrina, ajudando assim a hemostasia e a formação de uma matriz provisória para a migração celular. Todos esses eventos ocorrem quase concomitantemente ao estímulo tissular e são provenientes da desgranulação dos mastócitos (PARK et al., 2004; EMING et al., 2007; SIMPSON et al., 1972). Os mastócitos são responsáveis entre outras atividades, pela defesa imunológica, estando envolvido em reações. Entretanto sua ativação leva ao aumento do número, tamanho e granulosidade dessas células podendo levar a cronificação do processo de cicatrização tecidual (BARRETO, 2013).

Em seguida, diferentes mediadores químicos permitem a migração de neutrófilos e monócitos, os quais fazem fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, além de produzirem fatores de crescimento que preparam a ferida para a fase proliferativa, quando fibroblastos e células endoteliais também serão recrutados (BARRETO, 2013).

Os polimorfonucleares, macrófagos e os linfócitos migram e fixam-se na área da lesão de três a cinco dias após a injúria tecidual para fagocitar, especialmente, as bactérias, desbridar corpos estranhos e direcionar o desenvolvimento de tecido de granulação. O macrófago é a célula mais importante dessa fase podendo permanecer na lesão até o décimo dia após o início da inflamação (CAMPOS et al., 2007).

Na fase proliferativa ocorre o fechamento da lesão propriamente dito. Compreende: reepitelização, que se inicia horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; fibroplasia e angiogênese, que compõem o chamado tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (SINGER, 1999; SANTORO, 2005).

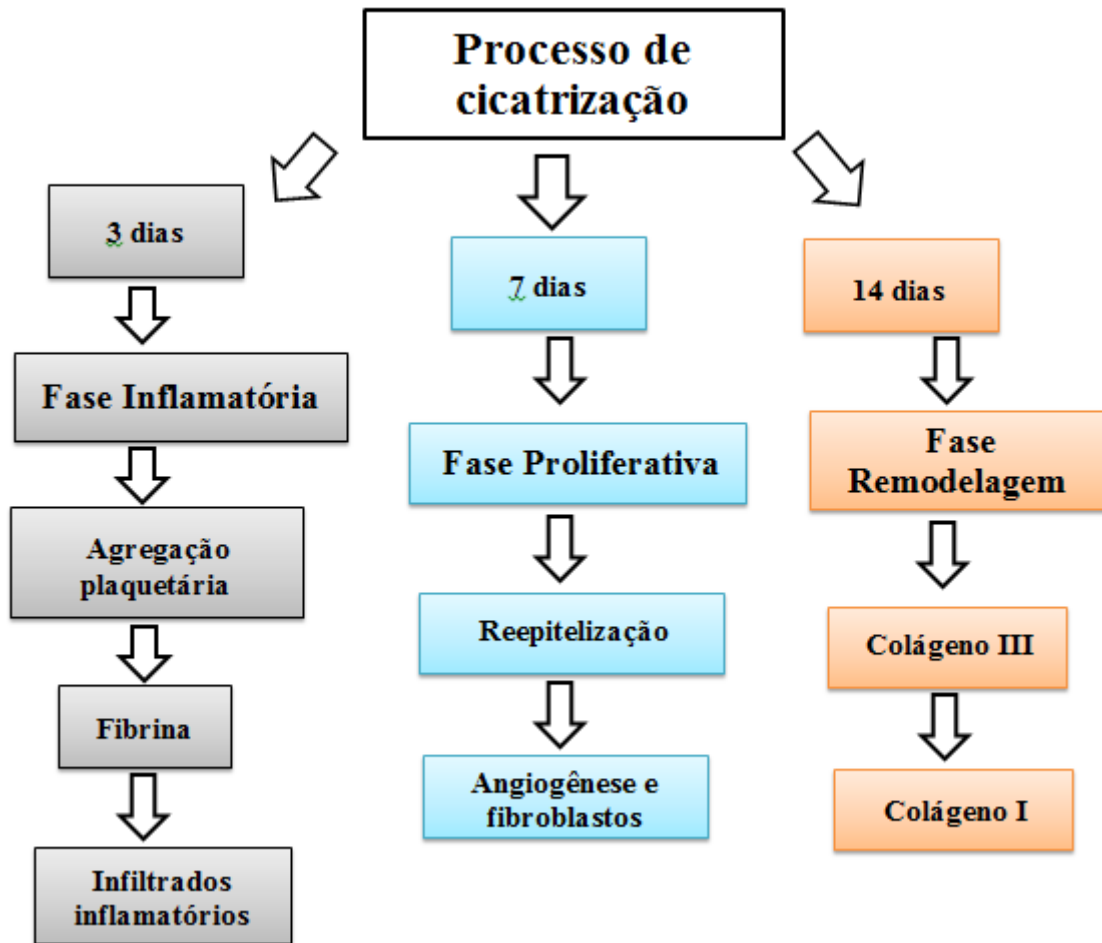
Na última fase, de remodelamento, ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. É marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno. Com o decorrer do processo de maturação e remodelagem, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida mediante processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos desconhecidos de morte celular (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

Dentre as células presentes nas fases de cicatrização, o colágeno é a proteína mais abundante do tecido conectivo em fase de cicatrização. O colágeno tipo I é o mais frequente; é sintetizado pelos fibroblastos e predomina mais em ossos e tendões. O tipo III é mais comumente encontrado em tecidos moles, como vasos sanguíneos, derme e fáscia. A derme sadia contém aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 20 % de colágeno tipo III, entretanto o tecido de granulação expressa 30 a 40 % de colágeno do tipo III, sendo considerado colágeno imaturo (CAMPOS et al., 2007).

Assim como o colágeno, as fibras elásticas são produzidas pelos fibroblastos, possuem em sua composição a elastina (material proteico insolúvel) e são mais resistentes que as fibras de colágeno. É responsável pela elasticidade e resiliência, capacidade de retornar a forma estrutural inicial, dos tecidos (RODRIGUES, 2000).

A figura a seguir representa uma síntese das etapas do processo de cicatrização de feridas cutâneas.

Figura 1- Fluxograma para apresentação da síntese do processo de cicatrização de feridas cutâneas



Fonte: AUTORA, 2017.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O UST é um recurso físico muito empregado como coadjuvante na promoção do reparo tecidual. Estudos sobre a ação de energia ultrassônica na regeneração de pele animal (FERREIRA, 2005; MENDONÇA, 2006) originaram novos procedimentos no tratamento, desde úlceras venosas, úlceras de pressão (CAMARGO, 2007; CAMPANELLI, 2005) à reparação óssea (LANDA, 2005; LEITE, 2005; HAACH, 2006).

A intensidade depositada em um tecido é dada em W/cm^2 . Convencionalmente são utilizados valores entre 0,1 a 3,0 W/cm^2 (GUIRRO e SANTOS, 1997; FERNANDES et al., 2003; TER HAAR, 1996), com ciclos de ondas que variam de 20 a 100% de irradiação de ondas quando aplicados no modo pulsado (GUIRRO e SANTOS, 1997). Esses autores afirmaram que valores fora dessa faixa de intensidade podem trazer efeitos deletérios nos tecidos tratados, ou ainda, não trazer efeito algum.

A quantidade de energia total depositada sobre um determinado tecido biológico é o produto da intensidade com o tempo de aplicação (GUIRRO e SANTOS, 1997; FERNANDES et al., 2003), que, convencionalmente, na terapia ultrassônica, varia entre uma faixa de 0,75 a 3 MHz (TER HAAR, 1996). Quanto maior a frequência mais superficial se torna sua aplicação, (Figura 3) desse modo frequências maiores são utilizadas para tratamentos mais superficiais, enquanto que baixas frequências são utilizadas para tratamentos mais profundos, SPEED (2001).

Segundo DE BEM (2010), ao ser transmitido aos tecidos biológicos às ondas ultrassônicas produzem alterações celulares por efeitos mecânicos. Essa transmissão ocorre por vibração das moléculas em um meio, que deve ter propriedades elásticas. Dessa forma, o movimento de um corpo vibrando é transmitido às moléculas adjacentes, as quais, antes de retornarem à posição de equilíbrio, transmitem esse mesmo movimento a outras moléculas que estão ao seu redor TER HARR, (1999).

O tempo de terapia para aplicação do ultrassom varia conforme o tamanho da área de lesão, da intensidade de saída, do efeito térmico desejado e das metas terapêuticas do tratamento, justificando assim, os vários cálculos do tempo de aplicação. O cálculo mais comumente usado para o tempo de aplicação é: $Tempo = \frac{Área}{ERA}$ (*Efctive Radiation Area*) - área de radiação ultrassônica que normalmente é igual ou um pouco menor a superfície de contato do transdutor (BLUME et al., 2005). Ainda assim, ROBERTSON e BAKER 2001,

afirmam que o tempo de duração por área não deve ultrapassar 15 minutos. Caso isso ocorra, a área deve ser dividida em quadrantes e realizar mais de uma aplicação. Áreas muito pequenas devem ter um tempo de aplicação variando entre 2 a 5 minutos.

Quanto aos efeitos do ultrassom, esses dependem de fatores físicos e biológicos, dentre eles, o tempo de exposição mencionado anteriormente, a estrutura espacial e temporal do campo ultrassônico (tamanho do transdutor) e o estado fisiológico a ser tratado (BLUME et al., 2005).

De uma forma geral, os efeitos biológicos do ultrassom terapêutico são: Vasodilatação da área tratada apresentando hiperemia e aumento do fluxo sanguíneo; Aumento da permeabilidade celular, facilitando o retorno venoso e linfático, o que, conseqüentemente, diminui edemas; Micro massagem causada pelo transdutor em contato com a pele; Efeito analgésico e antiespasmódico; Incremento do metabolismo celular local, com estimulação das funções celulares (GUIRRO et al., 1995; DYSON, 1987).

No modo contínuo, acredita-se que os tecidos aqueçam por absorção das ondas de ultrassom propagadas de forma linear e paralela ao eixo. Esse aquecimento tecidual parece aumentar a extensibilidade colagenosa dos tecidos, aumento de fluxo sanguíneo local, redução de dor, espasmo muscular e discreta produção de reação inflamatória (BAKER, ROBERTSON e DUCK, 2001; TER HAAR, 1987; DYSON, 1987).

No pulsado, os efeitos mecânicos parecem ser mais visíveis, destacando a cavitação estável (responsável em partes pelo reparo dos tecidos), o micro fluxo (que pode modificar a posição intra e extracelular de algumas partículas), conseqüentemente afeta a atividade celular e estimula o metabolismo e a multiplicação celular e, por fim, alterações na membrana celular, aumento dos níveis intracelulares de cálcio, aumento da angiogênese e estimulação da atividade fibroblástica (TER HAAR, 1987; DYSON, 1987).

OLSSON et al., (2008), apresentaram informações sobre o UST, relatando a existência de riscos de danos celulares decorrentes da inadequada aplicação e revelam a importância de seus mecanismos de ação nos tecidos, tanto no ponto de vista físico, como nos seus aspectos biológicos.

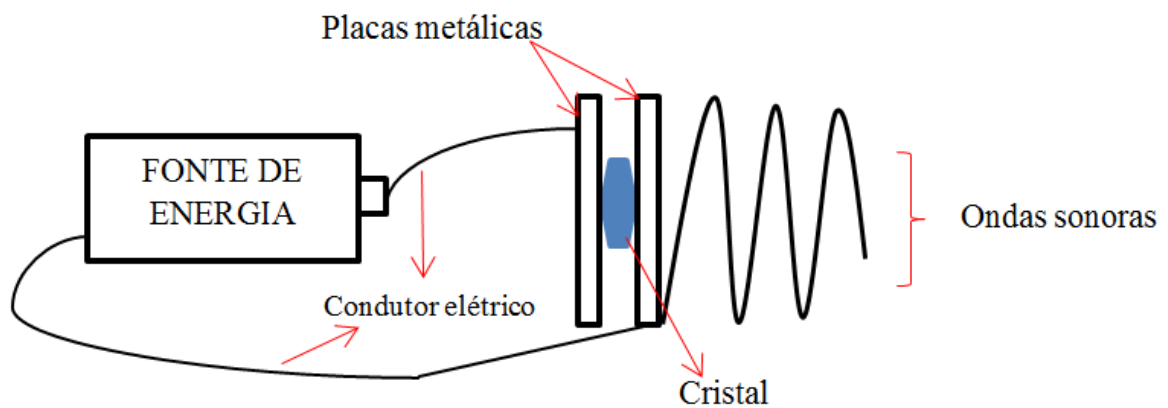
O ultrassom pode ser aplicado de forma direta (acoplado o transdutor à pele através de um gel a base de água) ou de forma indireta ou subaquática, onde tanto a área a ser tratada quanto o transdutor devem ser submergidos para dar-se início ao tratamento (PAULA, 1994).

De acordo com FERREIRA (2005); MENDONÇA (2006); o UST é um recurso físico muito empregado no processo de cicatrização de diferentes tecidos, como pele, tendão e

músculos, o que acontece através da ação de energia ultrassônica. Esse recurso é amplamente utilizado na prática clínica, entretanto não existe padronização dos parâmetros utilizados para tratamento de feridas cutâneas.

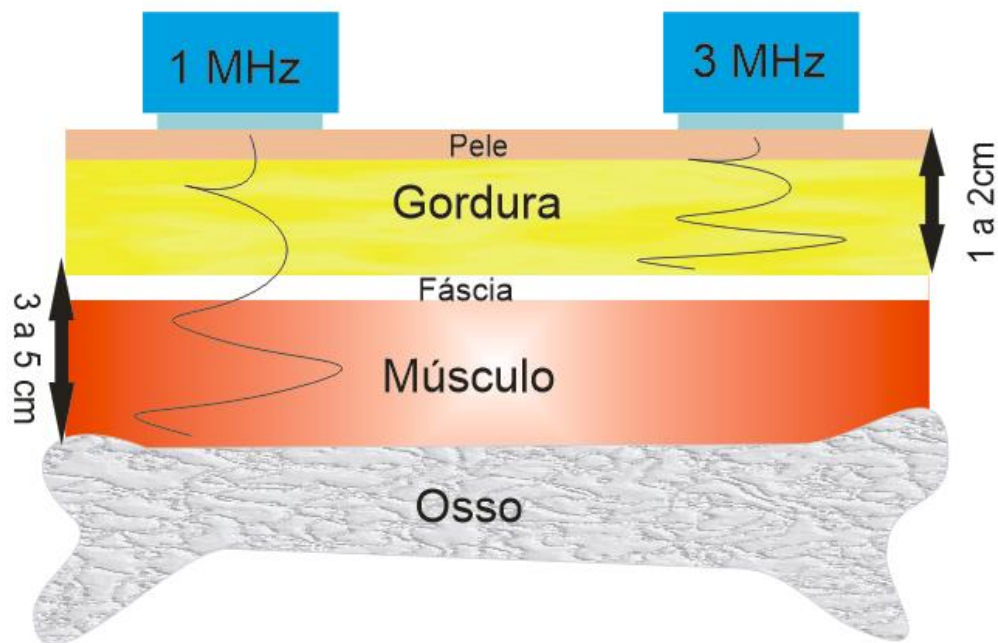
Apesar de pouca literatura a respeito do uso do ultrassom terapêutico em feridas cutâneas, os artigos encontrados são unânimes em relatar os efeitos benéficos do UST na cicatrização tecidual, contudo os mecanismos fisiológicos que nela atuam, ainda não estão bem esclarecidos (OLSSON et al., 2008).

Figura 2 – Efeito piezoelétrico que ocorre na parte interna do transdutor do UST.



FONTE: AUTORA, 2017.

Figura 3 – Profundidade de absorção das ondas Ultrassônicas com utilização de UST de 1 MHz e 3 MHz.



FONTE: AUTORA, 2017.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- ✓ Propor um protocolo para utilização do ultrassom terapêutico de 3 MHz pulsado no processo de cicatrização de feridas cutâneas experimentais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Avaliar a eficácia do UST no tratamento de feridas cutâneas experimentais.
- ✓ Comparar o fechamento das feridas com ou sem aplicação do ultrassom.
- ✓ Quantificar a presença de infiltrados inflamatórios, células proliferativas, fibroblastos e fibras colágenas.

4 HIPÓTESE

O ultrassom terapêutico é capaz de diminuir o tempo de cicatrização da ferida quando comparado a lesões sem nenhum tipo de tratamento, além de aumentar e incrementar a proliferação de fibroblastos e colágeno.

5 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, com o protocolo de N° 111-A (Anexo I), de 22 de dezembro de 2014.

5.1 O animal:

A espécie selecionada para a realização desse trabalho é o *Rattus norvegicus* –*Wistar*, popularmente conhecido por rato albino de laboratório. Essa escolha se deu por características importantes como rápida reprodução, fácil manejo, tempo relativamente curto para atingir a idade adulta, facilidade de manutenção dos animais em ambiente de biotérios de forma a permitir uma quantidade menor de gaiolas, mamadeiras, maravalhas e ração. Para a padronização dos animais foram utilizados animais com três meses de nascido, massa corpórea de 250 a 300g, machos, evitando-se assim as interferências das flutuações hormonais comuns no sexo feminino.

Os animais foram mantidos em gaiolas específicas individuais, em ambiente com temperatura em condições ideais ($22^{\circ}\pm$), com água e ração **Nuvilab CR-1®** *ad libidum* (composição nutricional básica da ração- Anexo II). O Ambiente possuía exaustão e climatização além de manutenção do ciclo claro/escuro invertido para que os animais não sofressem estresse pela alteração do seu ciclo circadiano fisiológico.

O peso corporal dos animais (g) foi verificado com uso de uma balança semi analítica BEL® antes do processo de anestesia.

5.2 Método de randomização e cálculo do tamanho da amostra

O (n) para o estudo foi calculado segundo o método de Cruz-Oriver, (1990) os quais afirmaram que na estereologia o interesse do estudo se dá pelo aumento ou diminuição de determinada quantidade de espécies ou de campos microscópicos. Dessa forma, o número de

animais necessário para que o nível de significância do p seja menor igual a 0,05 é n=5 como mostra a fórmula abaixo:

$$p = (1/2)^{\text{eventos}} \text{ logo, se } n=5 \text{ temos:}$$
$$p = (1/2)^5 \text{ ou seja: } p = 0,03 \text{ (} p < 0,05 \text{)}$$

Foram utilizados 60 animais no total, estando cada grupo preenchidos por 15 animais, justificando a eutanásia de 5 animais por diferentes intervalos de tempo, sem perda de nenhum animal durante os procedimentos ou o experimento. A cauda de cada animal foi marcada com caneta permanente a fim de identifica-los com a numeração de 1 a 15.

Os ratos foram randomizados por sorteio aleatório em quatro grupos de quinze animais cada, visto que em cada grupo as eutanásias para análises dos dados se deram em três momentos diferentes (3º dia, 7º dia e 15º dia). Desta forma obtivemos:

- Grupo 1- Controle (C): Realizada ferida cirúrgica e manipulação de cada animal com o aparelho de UST desligado (não houve emissão de ondas ultrassônicas).
- Grupo 2- Tratamento (TA): Realizada ferida cirúrgica e manipulação com aparelho de UST (3 MHz, 1,0 W/cm², pulsado com 20% largura de pulso, 100 Hz, 2 minutos).
- Grupo 3- Tratamento (TB): Realizada ferida cirúrgica e manipulação com aparelho de UST (3 MHz, 1,5 W/cm², pulsado com 20% largura de pulso, 100 Hz, 2 minutos).
- Grupo 4- Tratamento (TC): Realizada ferida cirúrgica e manipulação com aparelho de UST (3 MHz, 2,0 W/cm², pulsado com 20% largura de pulso, 100 Hz, 2 minutos).

5.3 Procedimentos cirúrgicos

Na anestesia para confecção das feridas, foi utilizado a associação entre os anestésicos, cloridrato de cetamina a 10% e cloridrato de xilazina a 2% diluídos em soro fisiológico à 0,9%. A dose anestésica é realizada segundo o peso do animal (0,1 mL/Kg). Em média foram aplicados 0,3ml de solução anestésica em cada animal.

A solução anestésica foi administrada no quadrante inferior esquerdo do abdome do animal, via intraperitoneal- com a agulha posicionada à aproximadamente 90 graus. O efeito anestésico se deu entre 3 a 5 minutos após a aplicação, sendo mais seguro realizar os procedimentos cerca de 10 minutos após a anestesia garantindo assim que o animal não sentiu

dor nem estresse. O período de recuperação pós-anestésica se deu por volta de 1 hora após a indução, o que demonstra a eficácia da técnica utilizada.

A cirurgia foi realizada pelo mesmo indivíduo em todos os animais.

Na figura a seguir se observa o momento da realização do procedimento anestésico (Figura 4).

Figura 4 - Anestesia na região abdominal do animal.

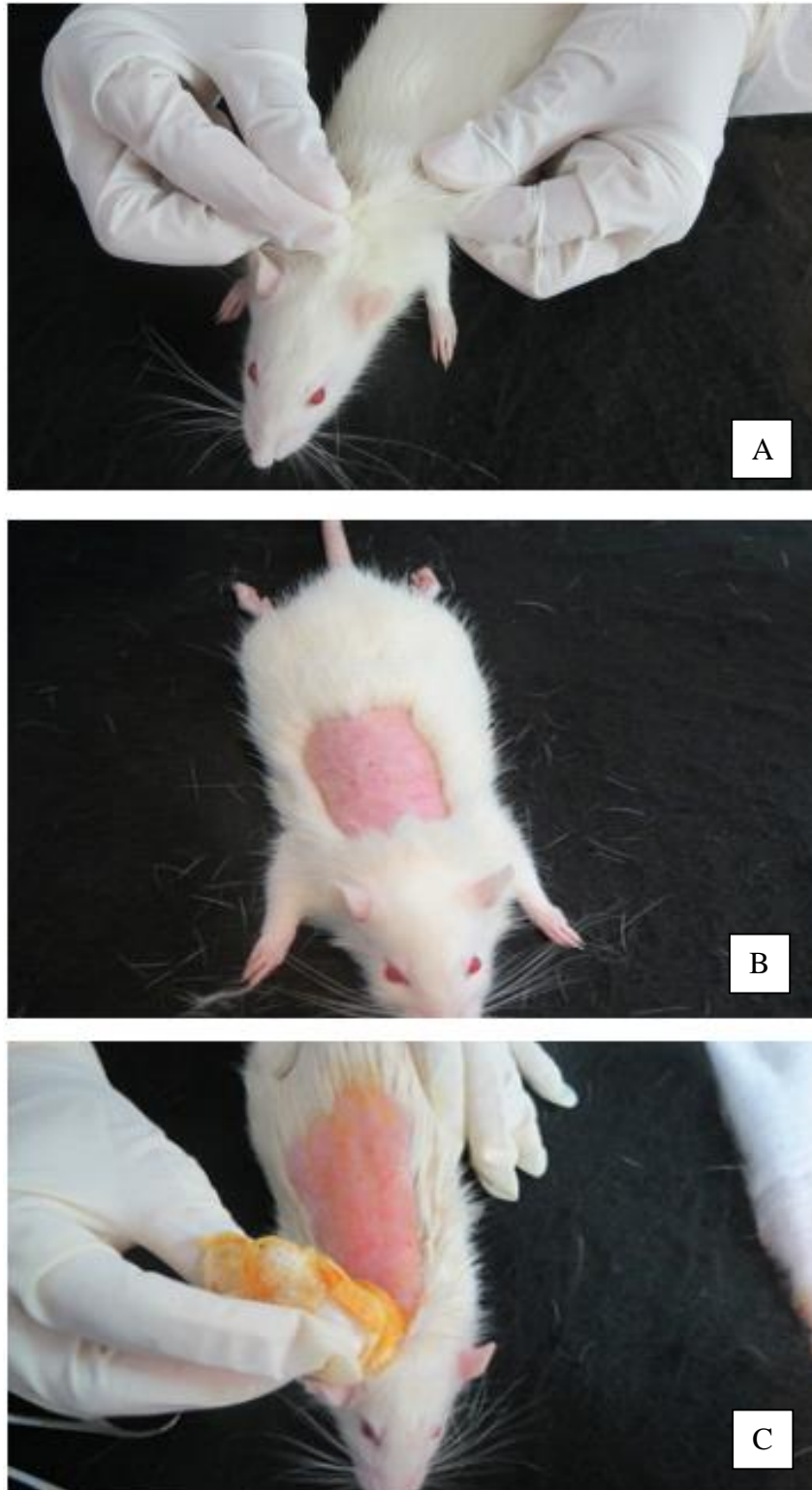


Fonte: AUTORA, 2017.

Seguido da anestesia e mensuração do peso do animal, foi realizada a tricotomia manual, sendo esta no sentido contrário ao pêlo (caudal-cranial). A área da tricotomia foi de aproximadamente 5cm^2 . Nesta área foi feito assepsia para posterior confecção da ferida.

A figura 5 ilustra os procedimentos de tricotomia do dorso, área reservada após tricotomia e assepsia para posterior procedimento cirúrgico, respectivamente. Estes foram realizados após anestesia, sem lesionar a pele do animal.

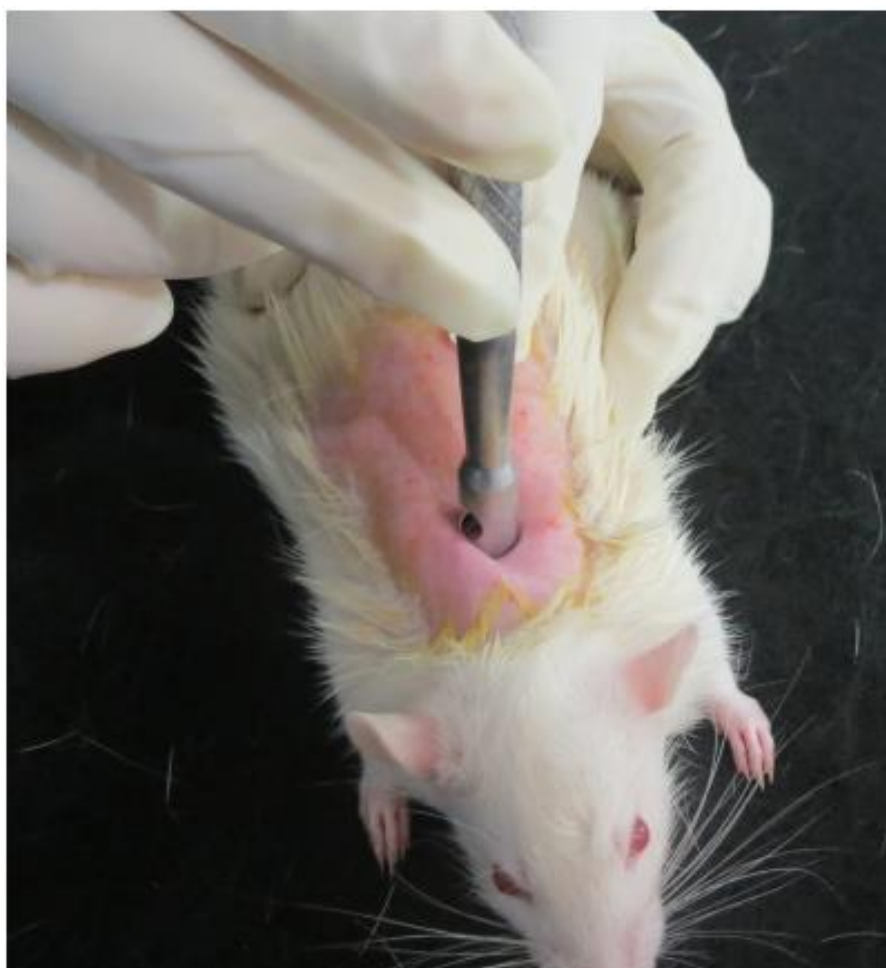
Figura 5 - No quadro (A) observa-se a realização da tricotomia manual no dorso do animal. Em seguida (B) a imagem demonstra a área no dorso do animal após a tricotomia com área média de 5 cm² para posterior procedimento cirúrgico. Por fim, (C) área de assepsia da área após tricotomia.



Fonte: AUTORA, 2017.

A exérese do fragmento foi realizada utilizando-se um “punch” dermatológico número 8 para obter uma padronização das feridas. Foi realizada apenas uma ferida por animal. Esta se deu na região do dorso, entre os ângulos inferiores das escápulas (1,0 cm do cruzamento da linha nugal com a linha mediana no dorso do animal) para que o animal não pudesse tocar a área para morder ou coçar. Essas tentativas são comuns nesse animal. A Figura 6 ilustra esse procedimento.

Figura 6 - Cirurgia para retirada do fragmento de pele realizada no dorso do animal na linha nugal entre as escápulas utilizando um punch dermatológico número 8.



Fonte: AUTORA, 2017.

5.4 Avaliação da Qualidade dos Artigos

Para a busca de artigos, foram utilizadas as bases eletrônicas: PubMed, Lilacs, Scielo, Bireme/MEDLINE. A estratégia de busca deu-se início com artigos referentes ao uso do ultrassom terapêutico na cicatrização tecidual e posteriormente, usando filtros, foram incluídos apenas artigos que abordassem o uso do UST na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos Wistar.

Para elaboração da dissertação outros artigos sobre ultrassom terapêutico foram utilizados desde que o modelo experimental utilizasse a mesma espécie animal.

Os critérios para avaliar a qualidade dos estudos seguiram as diretrizes do ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments). Link: http://www.elsevier.com/data/promis_misc/622936arrive_guidelines.pdf. Foi avaliada, a qualidade metodológica, a integralidade do período de seguimento dos estudos, método de randomização e, mascaramento dos examinadores para os resultados.

5.5 O Aparelho

Foi utilizado o aparelho ultrassom terapêutico Sonopulse III Sapphire Line 1MHz e 3MHz, da Ibramed®. Sendo este, ajustado com 3MHz de frequência, na forma de onda pulsado à 20%, largura de pulso de 100Hz e tempo de 2 minutos. Nesse protocolo estabelecemos três diferentes intensidades, sendo elas 1,0; 1,5 e 2,0 W/cm². A maioria dos autores pesquisados já mencionados na revisão de literatura informou que intensidades menores que 1,0 W/cm² não faria efeito permanente no tecido biológico e que acima de 2,0 W/cm² podem trazer efeitos deletérios.

Estabelecemos que, devido ao tamanho do animal e tipo de lesão estudada, seria inviável a aplicação do ultrassom de forma subaquática, optando-se assim por aplicar de forma direta através de um isolamento da lesão por plástico PVC e gel aquoso estéril sem fármacos, o que, segundo AGNES (2004), não interfere na transmissão das ondas ultrassônicas.

Na Figura a seguir observa-se o modelo de ultrassom terapêutico, modelo Sonopulse III® comercializado para o tratamento de lesões teciduais, dentre eles feridas cutâneas (Figura 7).

Figura 7 - Aparelho de Ultrassom terapêutico Sonopulse III®



Fonte: AUTORA, 2017.

5.6 Tratamento com UST

Para a aplicação do aparelho de ultrassom, os animais foram colocados em contêntores de PVC de forma que a área da ferida a ser tratada ficasse exposta para receber o tratamento. As feridas foram embebidas em água destilada (hipotônica) e cobertas com papel filme plástico PVC para que o gel condutor não tocasse diretamente na ferida, o que poderia contaminar a área a ser estudada. Após este procedimento foi aplicado o gel estéril condutor e por fim acoplado o cabeçote do aparelho de UST.

O tratamento foi iniciado exatamente 24h após a cirurgia para confecção das feridas, e se deu na mesma ordem de cirurgia e randomização para que o tempo de cicatrização fosse o mesmo para todos os animais. A ordem de tratamento seguiu a descrição abaixo:

- Grupo 1- Controle (C): aparelho de UST desligado (não houve emissão de ondas ultrassônicas).
- Grupo 2- Tratamento (TA): UST (3MHz, $1\text{W}/\text{cm}^2$, pulsado com 20% largura de pulso, 100Hz, 2 minutos).
- Grupo 3- Tratamento (TB): UST (3MHz, $1,5\text{W}/\text{cm}^2$, pulsado com 20% largura de pulso, 100Hz, 2 minutos).
- Grupo 4- Tratamento (TC): UST (3MHz, $2\text{W}/\text{cm}^2$, pulsado com 20% largura de pulso, 100Hz, 2 minutos).

O tratamento foi de forma diária, na frequência de uma vez ao dia, durante 2 minutos, respeitando o critério estabelecido para a eutanásia, que se deu no 3º, 7º e 15º dia de intervenção.

A cada intervalo de tempo estabelecido cinco animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para retirada de um fragmento de pele de $1,5\text{cm}^2$ da área da lesão para posterior análise histológica.

A eutanásia foi realizada com aprofundamento anestésico utilizando-se cetamina $75\text{mg}/\text{kg}$ adicionadas de $10\text{mg}/\text{kg}$ de xilazina, na dose de $0,1\text{ ml}/\text{kg}$ seguida de punção cardíaca. As carcaças dos animais foram congeladas e posteriormente liberadas para incineração realizada por empresa especializada, como parte do procedimento padrão do laboratório.

5.7 Processamentos histológicos

Os fragmentos de pele retirados (1,5cm²) imediatamente após a eutanásias foram fixados em formaldeído a 10% por 48 horas e identificados separadamente. Em seguida, o material foi incluído em blocos de parafina sendo estes preparados no laboratório de Arteriosclerose Humana e Experimental (AHE) da Universidade Federal de Alagoas.

Para desbastar o bloco de parafina com o tecido em questão, um fragmento a cada 10 cortes foi utilizado, sendo os demais desprezados. Dessa forma, foi possível garantir fragmentos dos mais diferentes níveis de profundidade da pele com cortes de 5 µm do bloco de parafina com o tecido.

O material foi processado para microscopia de luz e corado com Tricrômio de Gomori, Azul de toluidina, Picrosirius e Weigert.

5.7.1 Tricrômio de Gomori

O tricrômio de Gomori foi utilizado para avaliação da espessura de epitélio e queratina, bem como para estruturas presentes na derme como vasos sanguíneos, colágeno e fibroblastos.

5.7.2 Azul de toluidina

O azul de toluidina é um corante simples capaz de corar os núcleos dos mastócitos metacromaticamente. Dessa forma os mastócitos se apresentam de cor roxa ou violeta escuro. Foi utilizado para destacar a presença dos mastócitos nas fases do processo inflamatório da cicatrização tecidual.

5.7.3 Resorcina-Fucsina de Weigert

A coloração de Weigert é uma técnica histológica de rotina utilizada para corar fibras elásticas. Essas aparecem em tons de marrom. Foi utilizada para demonstrar a presença de fibras elásticas no tecido.

5.7.4 Picrosirius Red

A técnica do Picrosirius Red seguida de polarização pode mostrar as variações na espessura das fibras de colágeno sendo indicativo de fibras de colágeno dos tipos I e III. A diferença de cor observada após a polarização é o resultado da espessura das fibras assim como do arranjo do colágeno. Foi utilizada para diferenciar as fibras colágenas tipo I e III.

5.8 Captura das Imagens e Análises

Para a captura das imagens adotou-se o critério de aleatoriedade, para tanto o microscópio foi previamente desfocado, a fim de garantir essa forma de seleção. As imagens foram capturadas no microscópio de luz da **OLYMPUS DP2-BSV®**. Foram realizadas cinco fotografias equidistantes de cada camada da pele, tendo ao final, 10 imagens por animal. O microscópio foi ajustado uma objetiva 40x e 20x. Após a análise das estruturas, foram obtidos os resultados de média e desvio padrão para cada variável.

5.9 Análise Biométrica

A análise biométrica das feridas foi realizada com auxílio de um paquímetro mecânico manual Métrica®. As medidas foram realizadas logo após a cirurgia e diariamente após cada manipulação do animal segundo o grupo para verificar a evolução do fechamento da ferida.

O paquímetro foi posicionado no sentido cranial-caudal e látero-lateral à lesão, a fim de mensurar o diâmetro da ferida nestes sentidos descritos (Figura 8). Os dados foram anotados em planilha do programa Excel para posterior análise estatística.

Figura 8 – Posicionamento do paquímetro manual para mensuração dos diâmetros da ferida.



Fonte: AUTORA, 2017.

5.10 Análise Qualitativa

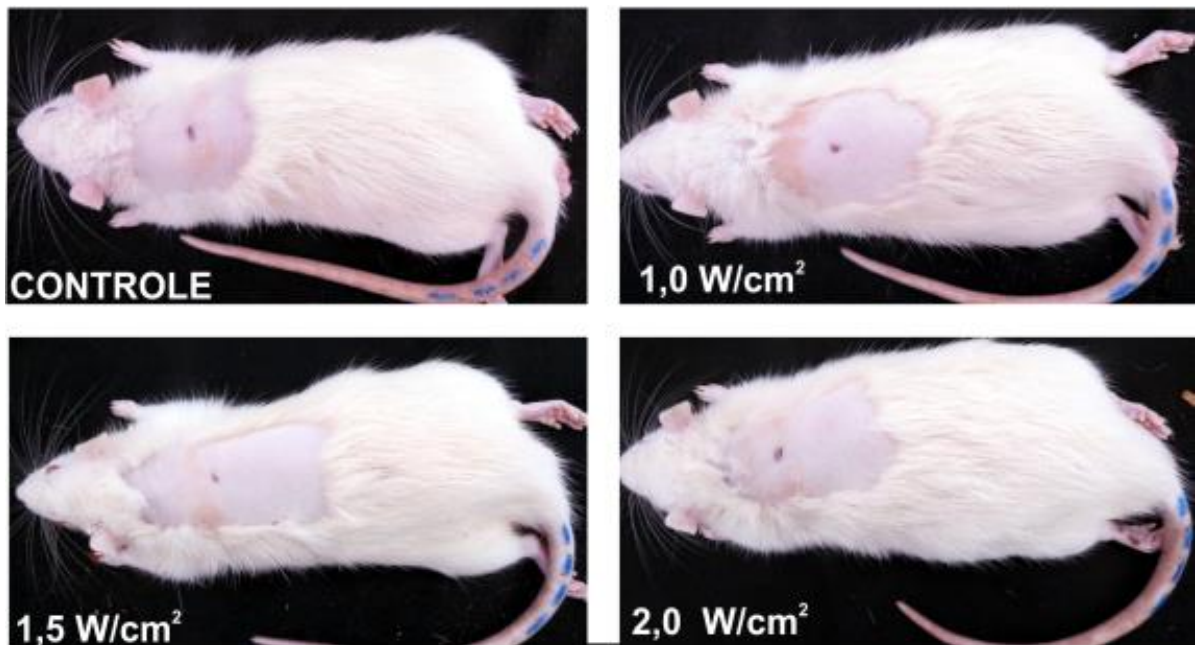
A análise qualitativa da área de retração da ferida foi realizada em três momentos distintos sendo eles, 3º dia, 7º dia e 15º dia. As imagens foram obtidas com uma máquina fotográfica de modelo **CANON® POWER SHOT SX40 HS**, sem utilização de zoom ou de flash que pudesse comprometer a qualidade das imagens.

Para a padronização da captação das imagens, a câmera fotográfica foi fixada em um suporte de alças e adaptada a uma barra paralela com régua ajustada à 30 cm de distância do dorso do animal.

A análise qualitativa da área de retração da ferida foi realizada a partir de imagens dos animais logo após a eutanásia nos diferentes grupos; controle e tratamentos. Além disso, foram analisadas imagens de lâminas coradas para análise da diferenciação do colágeno, bem como macrófagos e fibras elásticas. A análise foi realizada por dois diferentes avaliadores pertencentes ao departamento de Histologia e embriologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro os quais não sabiam a que grupo pertencia cada lâmina e imagens capturadas que estavam avaliando para tornar a avaliação mais confiável, íntegra e com melhor consistência metodológica.

Na figura a seguir, pode-se observar o tamanho das feridas após o 15º dia de tratamento nos diferentes grupos; controle e intervenção.

Figura 9 - Fotografia para captura do tamanho das feridas no 15º dia de tratamento

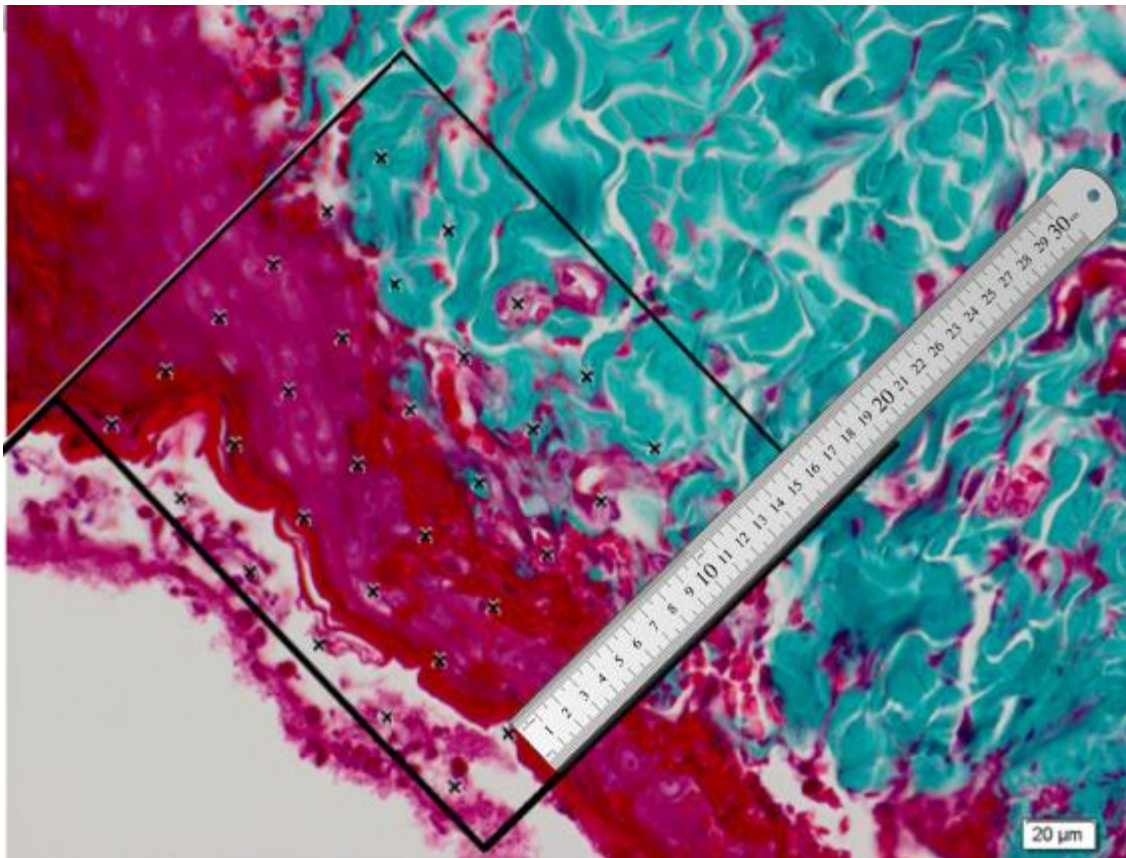


Fonte: AUTORA, 2017.

5.11 Análise morfométrica da pele

Foram exploradas duas dimensões em nível histológico, espessura do epitélio e queratina da pele do rato *Wistar*. As imagens foram obtidas com um microscópio de luz, de forma aleatória, para a realização da análise. Através da tela do computador as imagens histológicas foram analisadas. Com auxílio de uma régua e um sistema teste de 36 pontos para delimitar a área (Figura 10). Foram coletados três valores para epitélio e queratina, separadamente, e em seguida feita média e desvio padrão dos mesmos a partir do programa da Microsoft Office 2007 ®.

Figura 10 - Avaliação da espessura do epitélio e queratina utilizando um sistema teste de 36 pontos e régua escolar 30cm.



Fonte: AUTORA, 2017.

Tricrômio de Gomori (40X).

5.12 Análise estereológica da pele

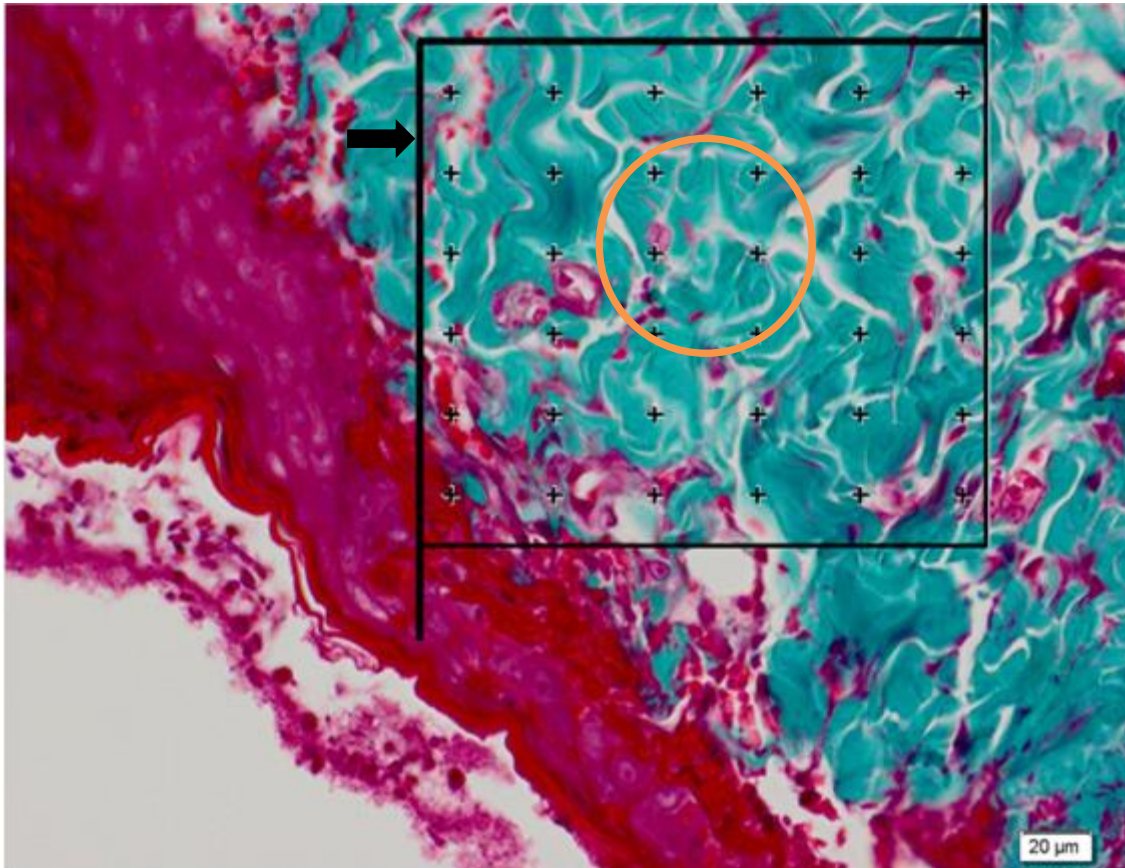
A estereologia é uma técnica utilizada para avaliar imagens histológicas de diferentes tecidos em formato tridimensional. As fórmulas estereológicas são aplicadas de acordo com os sistemas testes, (PP) pontos tocados no sistema teste (36 pontos). Os (PF) estruturas dentro da área teste (At) e não tocantes nas linhas proibidas, para obtenção da média de cada varável.

Fórmulas: $V_v = P_p / p_t$, $Q_a = P_{erfis} / At (1/mm^2)$.

- O (V_v) é a densidade de volume medida em percentagem, que oferece um valor relativo referente o quanto uma estrutura ocupa o espaço de uma determinada área.
- O (Q_a) é a densidade de área por unidade de medida $1/mm^2$, que determina o quantitativo de estruturas avaliadas na At (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

A seguir, a figura apresenta a avaliação estereológica realizada, bem como os sistemas testes de 36 pontos e linhas proibidas utilizados nas análises.

Figura 11 - Avaliação estereológica de diferentes células da camada dérmica da pele. A seta de cor preta demonstra o sistema teste de linhas proibidas. Já o círculo de cor laranja, mostra alguns pontos do sistema teste de 36 pontos.



Fonte: AUTORA, 2017.

Tricrômio de Gomori (40X).

5.13 Análise estatística

Para obtenção da média aritmética e desvio padrão em cada grupo, foi utilizado o programa da Microsoft Office Excel 2010 ®. Os resultados obtidos foram transcritos para o programa GraphPad Prism versão 6.0 e processados estatisticamente utilizando o teste Two-Way ANOVA, com pós teste de Bonferroni.

Quando houve interação entre o fator tempo e fator intervenção (UST) não houve análise dos dados, pois seria impossível inferir qual dos dois fatores foi significante.

O nível de rejeição para hipótese de nulidade foi sempre igual ou menor que 0,05 (5%). Quando a estatística calculada não apresentou significância na relação entre UST e grupo controle, ou ainda, entre UST e suas diferentes intensidades, utilizamos a sigla N.S.

O desvio padrão foi introduzido sobre a dissecação de curvas de frequência assimétricas.

6 RESULTADOS

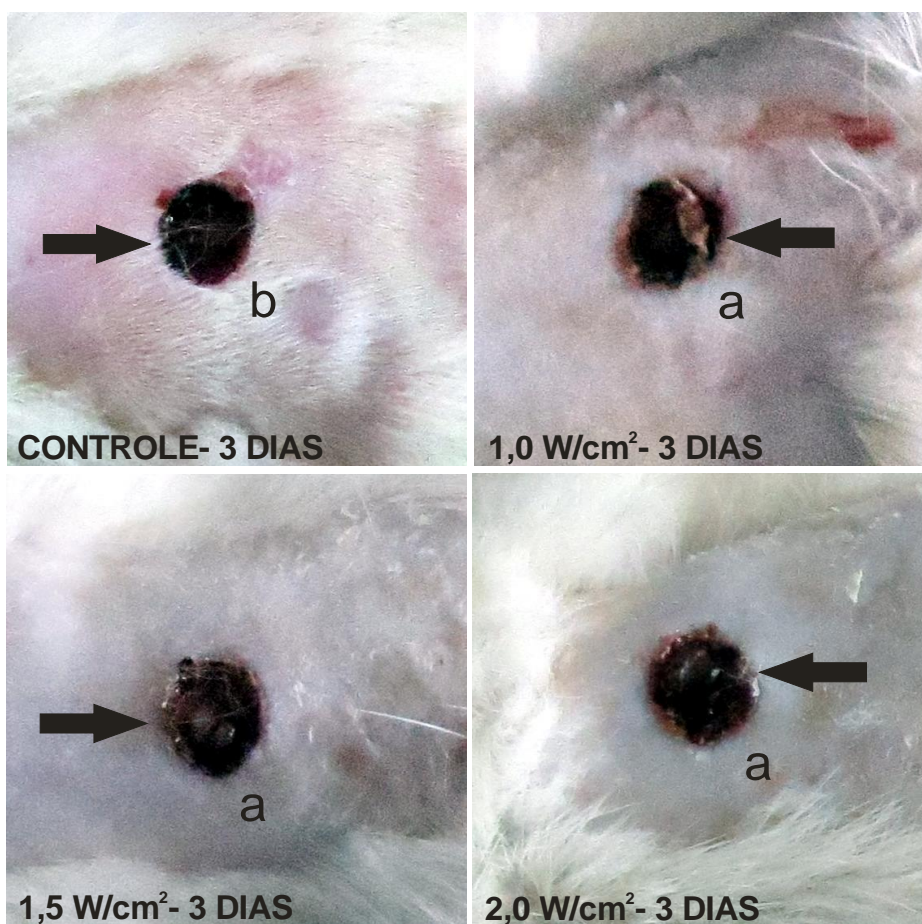
Serão apresentados primeiramente os dados qualitativos desta dissertação e em seguida os resultados quantitativos em forma de gráfico para facilitar as análises.

6.1 Análise qualitativa

6.1.1 Avaliação do fechamento da área da ferida

As figuras 12 (A e B) apresentam a área da ferida no terceiro e no décimo quinto dia no grupo controle e grupos tratados. Nessas imagens é possível observar a qualidade macroscópica da área da lesão durante o processo de cicatrização.

Figura 12A - Análise qualitativa da área de retração da ferida. Aspecto macroscópico das feridas no 3º dia de experimento conforme grupo. As setas destacam a deposição de tecido granuloso no centro da ferida.



Fonte: AUTORA, 2017 .

Figura 12B - Análise qualitativa da área de retração da ferida. Aspecto macroscópico das feridas no 15º dia de experimento conforme grupo.



Fonte: AUTORA, 2017.

Na figura 12A é possível observar que não há diferença quanto ao diâmetro das feridas quando comparadas o grupo controle com os grupos tratados. No terceiro dia pode ser visto uma deposição maior de tecido de granulação nos três grupos irradiados com ultrassom terapêutico (a) quando comparados ao grupo não tratado. Já no grupo controle há uma delimitação da área da ferida sem aumento da deposição de tecido de granulação nas bordas (b).

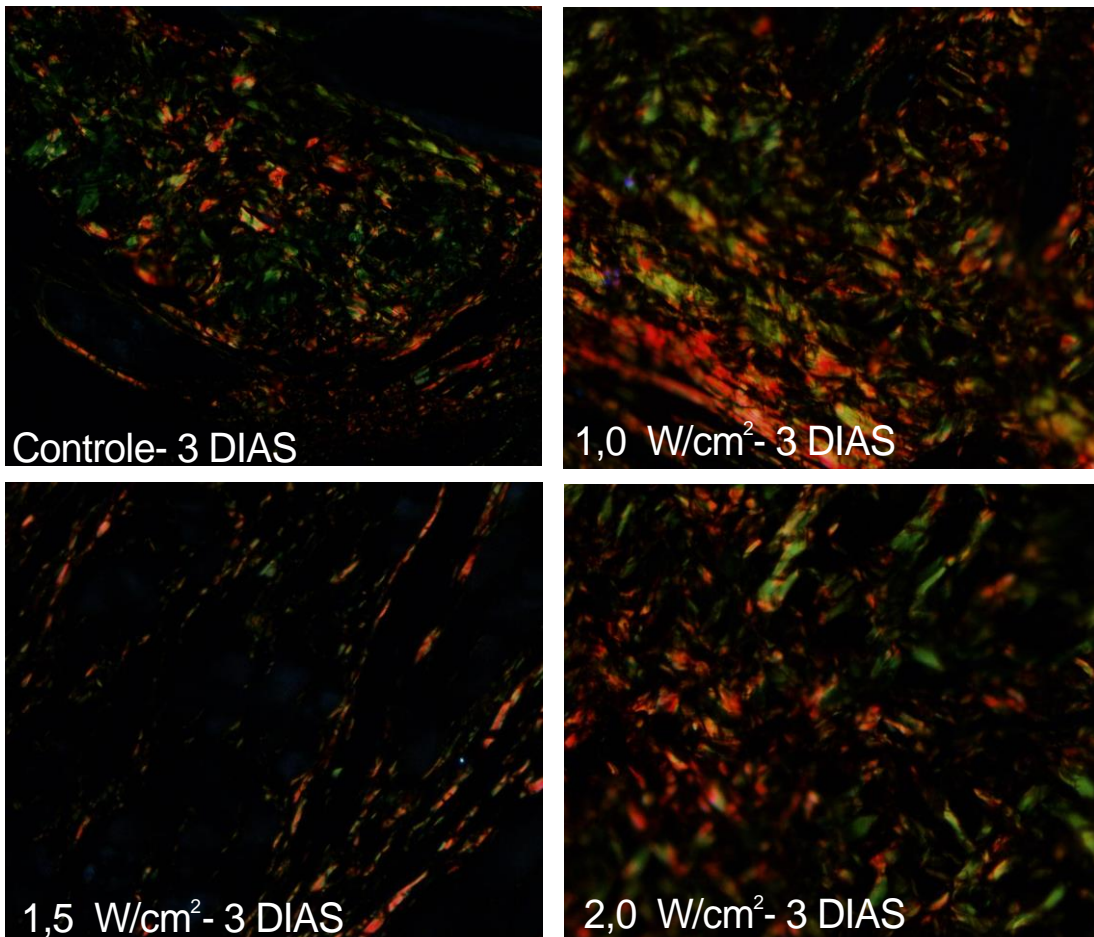
No 15º dia, figura 12B, é possível observar que houve fechamento da área inicial da ferida em todos os grupos. O grupo tratado com 1,5 W/cm² apresenta maior área de cicatrização ficando quase imperceptível nessa área.

Apesar de apenas uma figura ter sido utilizada como exemplo para cada intervalo de tempo o aspecto macroscópico de fechamento das feridas foi similar aos demais animais do grupo.

6.1.2 Avaliação da diferenciação do colágeno

A figura a seguir apresenta a descrição da deposição de colágeno no 3º, 7º, e 15º dias de tratamento. A birrefringência a partir da coloração com Picrosirius permite visualizar as áreas com maior deposição de colágeno. Em cor vermelho observa-se colágeno tipo I. Em verde, colágeno tipo III. Alguns filamentos amarelados indicam a fase de transição do colágeno tipo III. A cor preta aparece como fundo da imagem pela polarização das fibras de colágeno.

Figura 13 - Aspecto da deposição do colágeno tipo I e tipo III no 3º dia em animais dos grupos estudados. Em cor vermelho observa-se colágeno tipo I. Em verde, colágeno tipo III. Alguns filamentos amarelados indicam a fase de transição do colágeno tipo III. A cor preta aparece como funda da imagem pela polarização das fibras de colágeno.



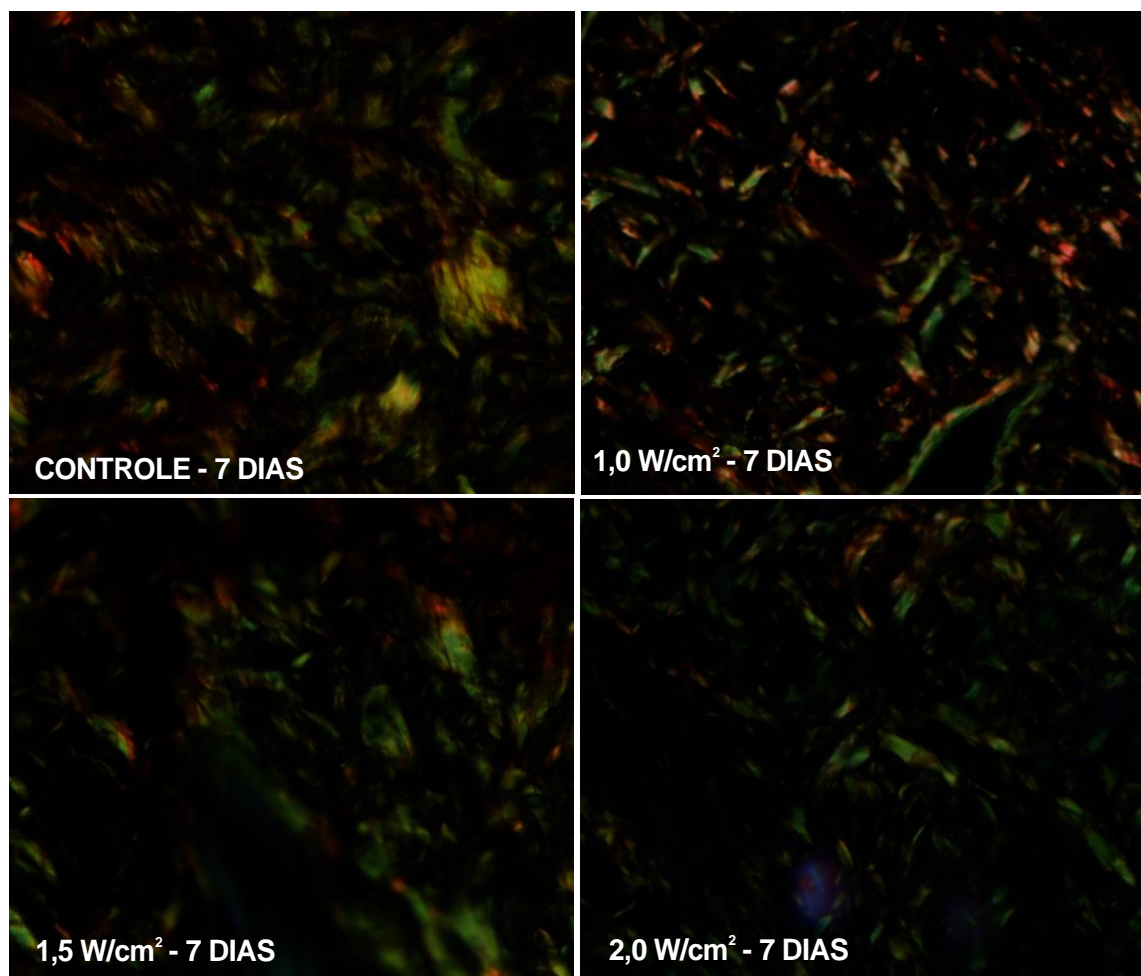
Fonte: AUTORA, 2017.

Picrosirius Red (20X).

É possível verificar a deposição de colágeno tipo I e tipo III nos grupos estudados. Há uma prevalência de colágeno tipo III (verde - amarelado) no grupo 1,0 W/cm² e no grupo controle, respectivamente. Já o colágeno tipo I (vermelho) tem prevalência no grupo 1,0 W/cm² e 2,0 W/cm² nesta ordem. No grupo tratado com 1,5 W/cm² as fibras de colágeno apresentam-se mais finas e mais distantes uma das outras levando a uma menor resistência tênil do tecido tratado.

Observa-se que o grupo 1,0 W/cm² apresentou deposição de ambos os tipos de colágeno, I e III. Ainda assim, o colágeno tipo III apresenta-se em maior deposição o que permite, nessa fase, sugerir que esse tratamento estimula a produção de colágeno para retração do tecido cicatricial precocemente.

Figura 14 - Aspecto da deposição do colágeno tipo I e tipo III no sétimo dia em animais segundo os grupos. Em cor vermelho observa-se colágeno tipo I. Em verde, colágeno tipo III. Alguns filamentos amarelados indicam a fase de transição do colágeno tipo III. A cor preta aparece como funda da imagem pela polarização das fibras de colágeno.

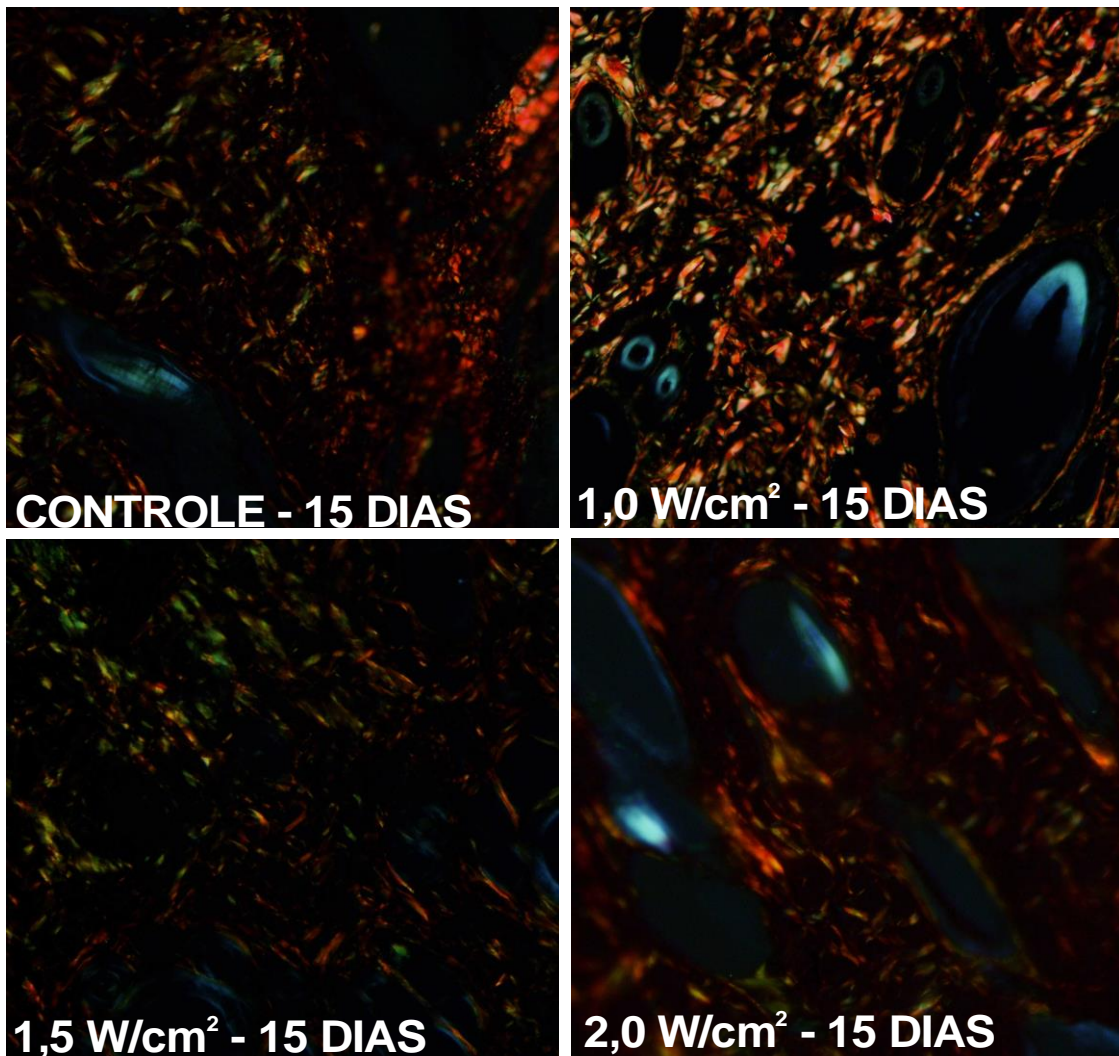


Fonte: AUTORA, 2017.

Picrosirius Red (20X).

No sétimo dia os grupos 1,5 e 2,0 W/cm² não apresentam diferença quanto à distribuição das fibras colágenas tipo III, entretanto o grupo controle bem como o grupo 1,0 W/cm² apresentam uma alteração na característica do colágeno, levando a acreditar que o processo de substituição do colágeno tipo III para colágeno tipo I está em execução acompanhando as fases de proliferação e remodelamento fisiológico. Ainda assim, o grupo 1,5 W/cm² apresentou, no 7º dia fibras colágenas mais espessas quando comparado aos demais grupos. O ultrassom com intensidades maiores atrasou a substituição do colágeno podendo não interferir no tempo de fechamento, entretanto na qualidade do tecido cicatrizado.

Figura 15 - Aspecto da deposição do colágeno tipo I e tipo III no décimo quinto dia em animais segundo os grupos. Em cor vermelho observa-se colágeno tipo I. Em verde, colágeno tipo III. Alguns filamentos amarelados indicam a fase de transição do colágeno tipo III. A cor preta aparece como funda da imagem pela polarização das fibras de colágeno.



Fonte: AUTORA, 2017.

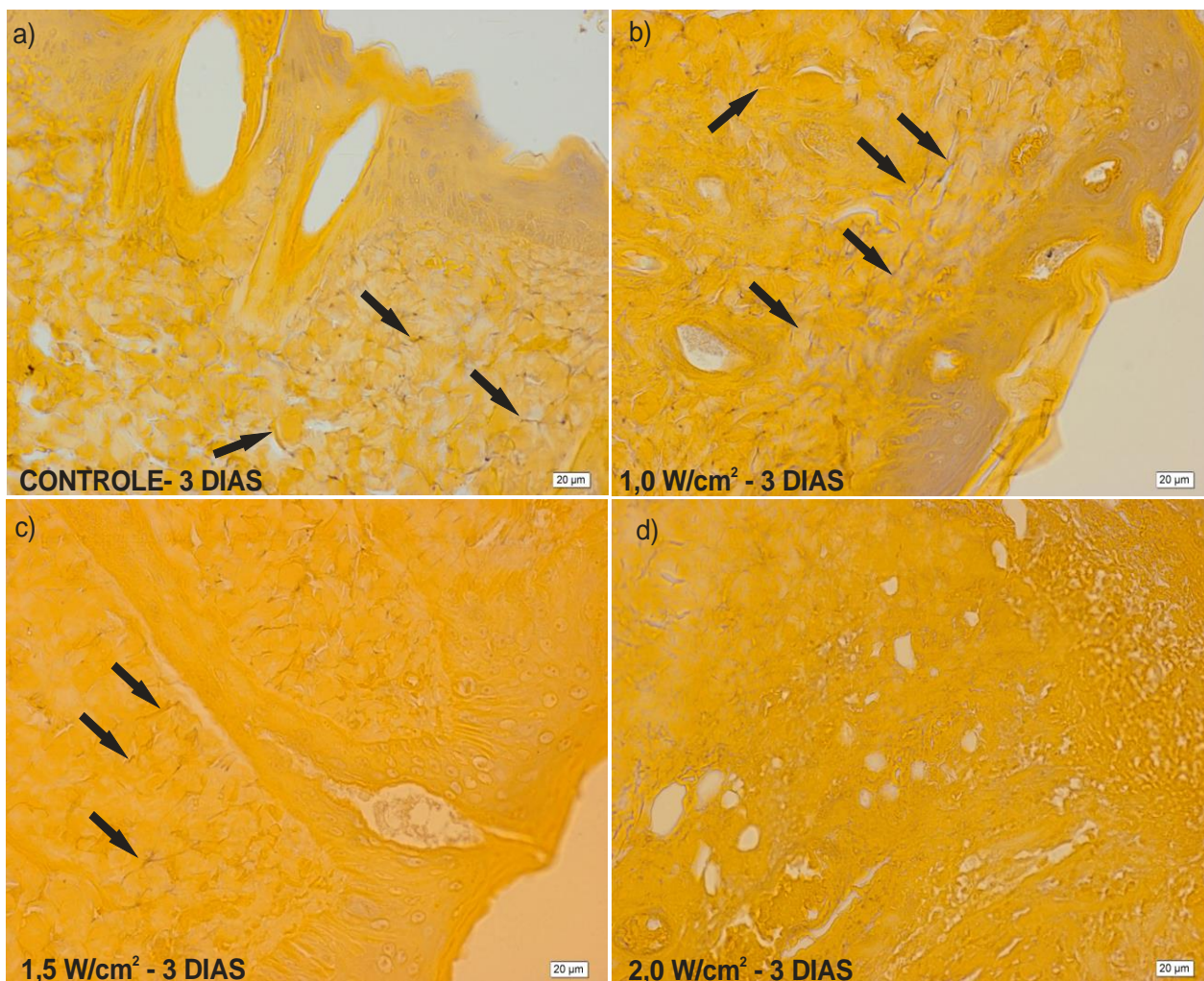
Picrosirius Red (20X).

No 15º dia foi observada a deposição de colágeno tipo I (vermelho) predominantemente no grupo 1,0 w/cm² quando comparado aos demais grupos, inclusive ao grupo controle mantendo a produção de fibras de colágeno iniciada no final do período inflamatório. Essas fibras estão mais adelgadas nos grupos que receberam maiores intensidades (1,5 w/cm² e 2,0 w/cm²). Apesar de presentes no tecido tratado com intensidade de 1,5 w/cm² e 2,0 w/cm², as fibras mais finas podem não permitir uma adequada resistência tênsil ao tecido.

Há permanência do colágeno tipo III (verde) no grupo 1,5 w/cm² típico do colágeno presente no tecido de granulação, entretanto, nessa fase é necessário uma mudança na característica do colágeno para que o remodelamento deixe o tecido mais semelhante ao tecido sã. O grupo controle ainda apresenta transição de colágeno tipo III e certa desorganização dessas fibras se comparado ao grupo 1,0 W/cm². O grupo tratado com 1,0 W/cm² apresenta maior velocidade na transição do colágeno tipo III para tipo I.

6.1.3 Avaliação da deposição de fibras elásticas

Figura 16 - Aspecto da deposição de fibras elásticas no 3º dia em animais dos grupos estudados. As fibras elásticas aparecem em tons marrons em meio às fibras de colágeno coradas em amarelo. As setas dispostas nas imagens a, b e c destacam as fibras elásticas, coradas em tons de marrom.



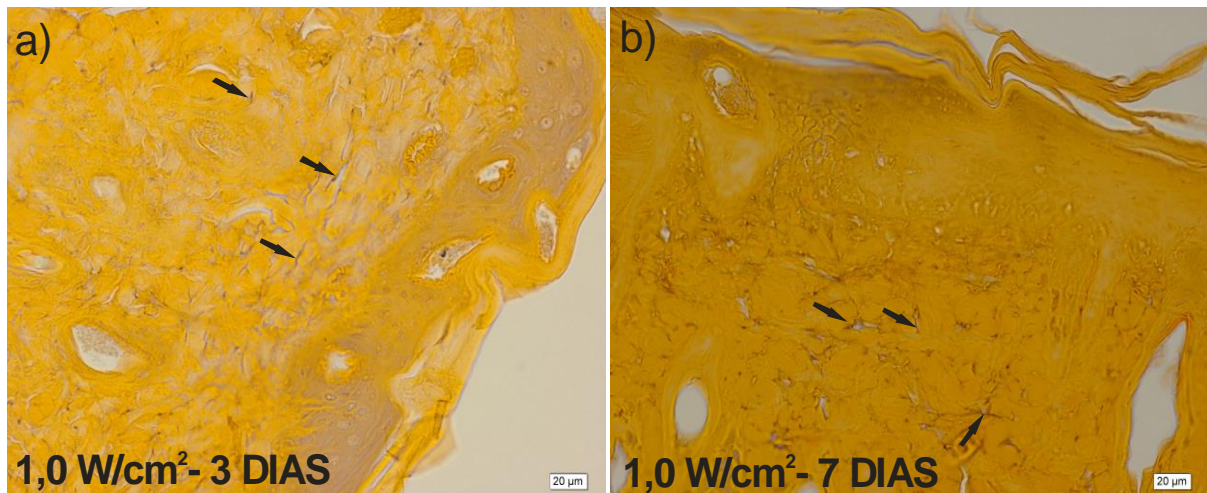
Fonte: AUTORA, 2017.

Resorcina-Fucsina de Weigter (40X).

Observa-se uma maior deposição de fibras elásticas no grupo tratado com $1,0\text{W}/\text{cm}^2$ (b). A presença dessas fibras permite que o tecido cicatrizado mantenha uma boa resistência tênsil após a fase de remodelamento. No grupo controle (a) essas fibras também estão presentes, entretanto aparecem menores, mais finas e afastadas das fibras de colágeno, coradas em amarelo. As fibras elásticas, juntamente com as fibras de colágeno formam a maior parte da derme dando a característica de elasticidade da pele, sendo as fibras elásticas as principais responsáveis pela capacidade de distensibilidade do tecido. Nos grupos tratados com maiores intensidades, assim como aconteceu com o colágeno, as fibras elásticas ficaram

mais dispersas na área tratada (c) ao ponto que no grupo $2,0 \text{ W/cm}^2$ não foi possível observar as fibras elásticas (d), observa-se ainda algumas lacunas no tecido, indicando um processo cicatricial menos consistente, com destruição celular.

Figura 17 - Aspecto da deposição de fibras elásticas no 3º e 7º dia no grupo $1,0 \text{ W/cm}^2$. As fibras elásticas aparecem em tons marrons em meio às fibras de colágeno coradas em amarelo. As setas dispostas nas imagens a, b destacam as fibras elásticas, coradas em tons de marrom.



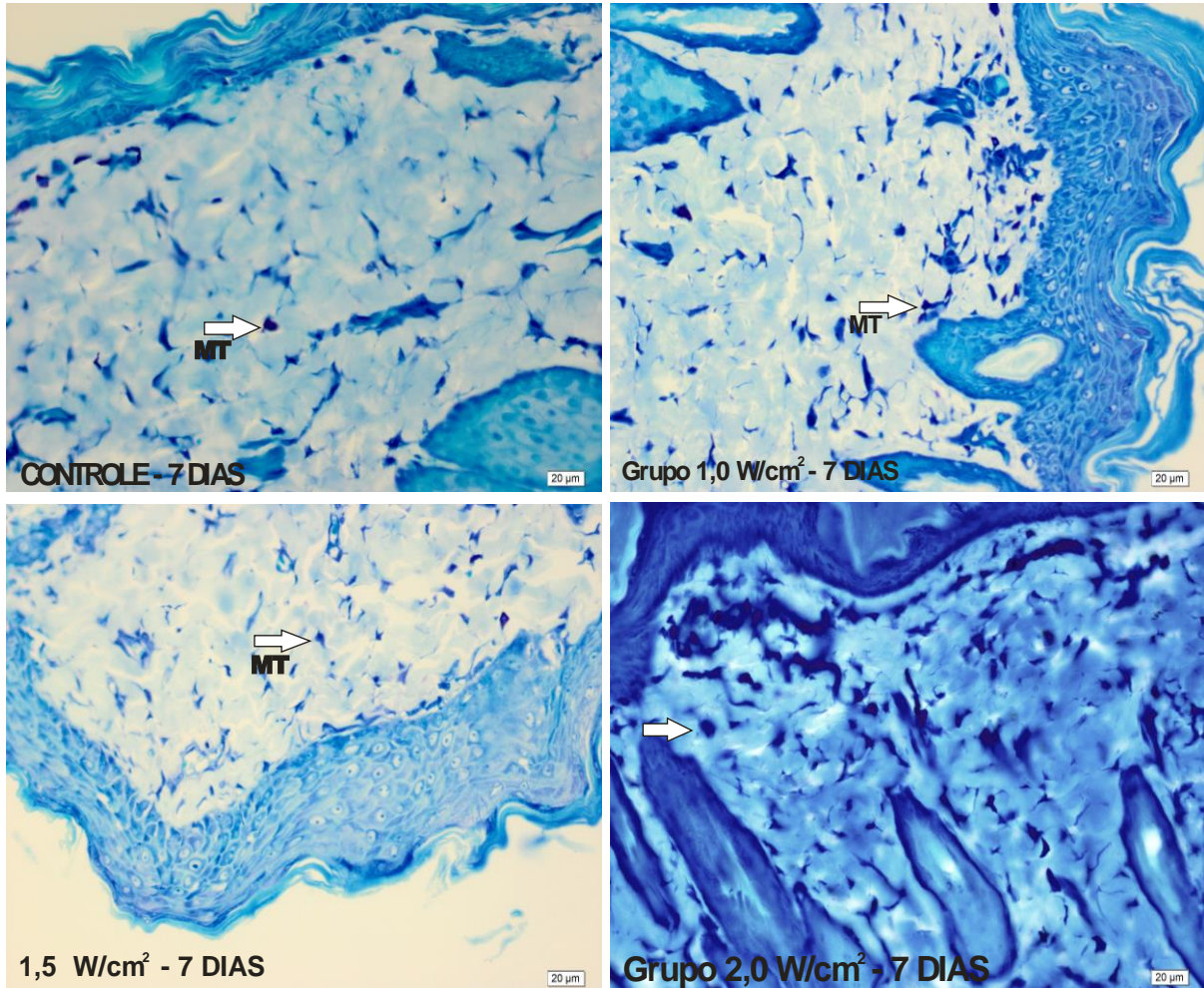
Fonte: AUTORA, 2017.

Resorcina-Fucsina de Weigter (40X).

Comparando-se os intervalos de tempo 3º e 7º dias do grupo $1,0 \text{ W/cm}^2$ foi possível observar que a deposição de fibras elásticas no terceiro dia (a) é discretamente inferior ao 7º dia (b) demonstrando que na progressão do processo de cicatrização as fibras elásticas desse grupo continuaram se proliferando, levando a uma melhor cicatrização quanto à elasticidade do tecido.

6.1.4 Avaliação da distribuição de mastócitos no leito da ferida

Figura 18 - Apresentação das células de mastócitos presentes no processo inflamatório no 7º dia de tratamento. A cor azul claro indica as camadas do tecido. A cor arroxeada, em forma arredondada indica as células de mastócitos, também destacados por setas.



Fonte: AUTORA, 2017.

Azul de Toluidina (40X).

Os mastócitos apresentam-se próximos da área de reepitelização (região mais periférica da ferida). No grupo 1,5 W/cm² é possível observar menor quantidade de mastócitos na área da ferida quando comparado aos demais grupos.

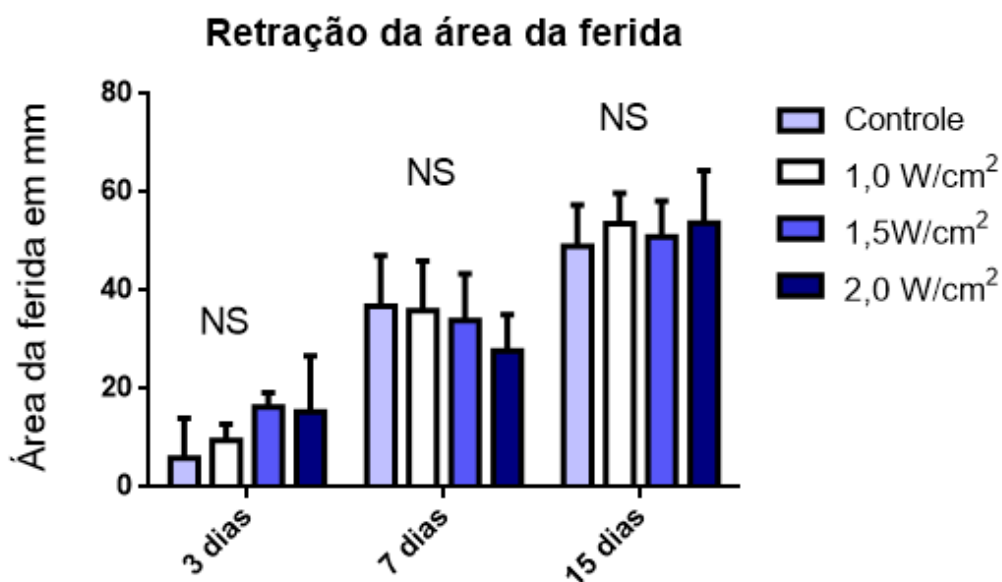
É sabido que os mastócitos são responsáveis pelo controle imune além de liberação de histaminas. Além disso, em cascata, ativam fatores de crescimento importante na fase inflamatória, ou seja, quanto maior o controle na formação e desgranulação de mastócitos, mais rápido o desenvolvimento do processo de cicatrização e melhor a qualidade do tecido cicatrizado, sendo a intensidade de 1,5 W/cm² o que apresentou melhor resultado. Já nos

grupos tratados com UST de $2,0 \text{ W/cm}^2$ e o grupo que não sofreu intervenção, apresentaram maior quantidade de mastócitos podendo levar a cronificação do processo inflamatório, impedindo que a cicatrização ocorra em tempo fisiológico normal ou ainda que apesar de fechar no tempo esperado, haja menor qualidade no tecido cicatrizado.

6.2 Análise Biométrica (macroscópica)

Análise realizada a partir da medida do diâmetro da ferida utilizando um paquímetro mecânico manual. A seguir, podem-se observar os dados da comparação das médias e desvio padrão das áreas de retração da ferida.

Gráfico 1 - Comparação das médias e desvio padrão (DP) das áreas de retração da ferida entre os grupos tratados com o Ultrassom Terapêutico *versus* grupo controle no 3°, 7° e 15° dia de tratamento.



NS= não significante

Interação $p = 0,21$

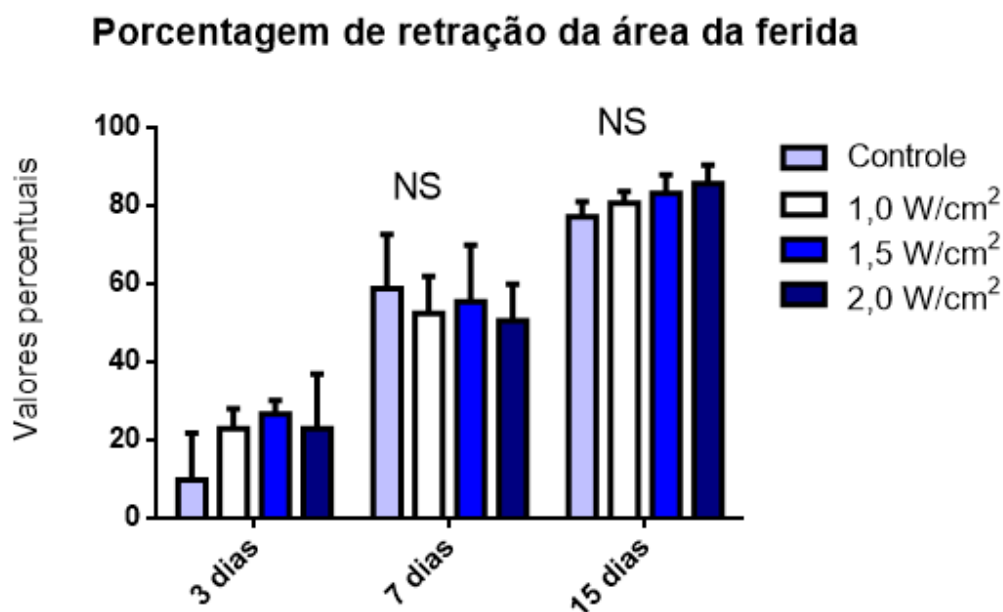
Tempo $p = 0,001$

UST $p = 0,76$

O fator tempo foi significativo quando comparado ao uso do UST apresentando $p < 0,001$. Na comparação entre as variáveis dos diferentes grupos não houve diferença significativa.

A porcentagem de retração da área da ferida avalia em quantos por cento a área retraiu quando comparada a área inicial. O gráfico abaixo apresenta os dados estatísticos desta variável.

Gráfico 2 - Comparação das médias e desvio padrão (DP) da porcentagem de retração da lesão entre os grupos tratados com o Ultrassom Terapêutico *versus* grupo controle no 3°, 7° e 14° dia de tratamento.



NS= não significativa

Interação $p = 0,13$

Tempo $p = 0,001$

UST $p = 0,27$

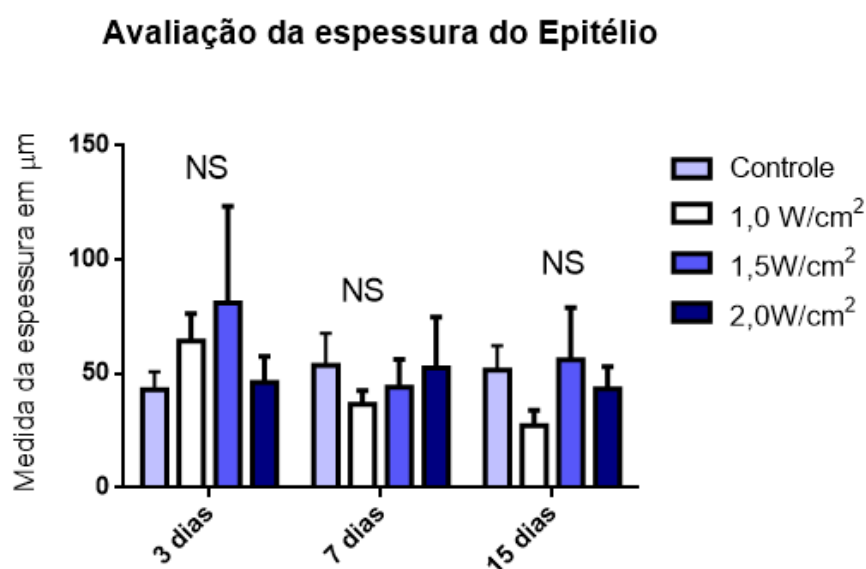
O fator tempo foi significativo ($p = 0,001$) quando comparado ao uso do UST que apresentou um $p = 0,2778$. Nas análises individuais dos intervalos de tempo a ação do tempo foi ainda maior sobre o grupo irradiado com $1,5 \text{ W/cm}^2$, no terceiro dia, apresentando uma média na porcentagem de retração de 26,59, ou seja, 36,4% maior que o grupo controle pela ação do tempo e não da intervenção. De alguma forma o UST com intensidade de $1,5 \text{ W/cm}^2$

interferiu negativamente no tratamento da ferida visto que o tempo, ou seja, não fazer intervenção foi superior ao uso do recurso terapêutico.

6.3 Análise Microscópica

Foram avaliadas microscopicamente a espessura do epitélio e da queratina e apresentadas nesta dissertação nos gráficos abaixo.

Gráfico 3 - Comparação das médias e desvio padrão (DP) da espessura do epitélio.



NS= não significante

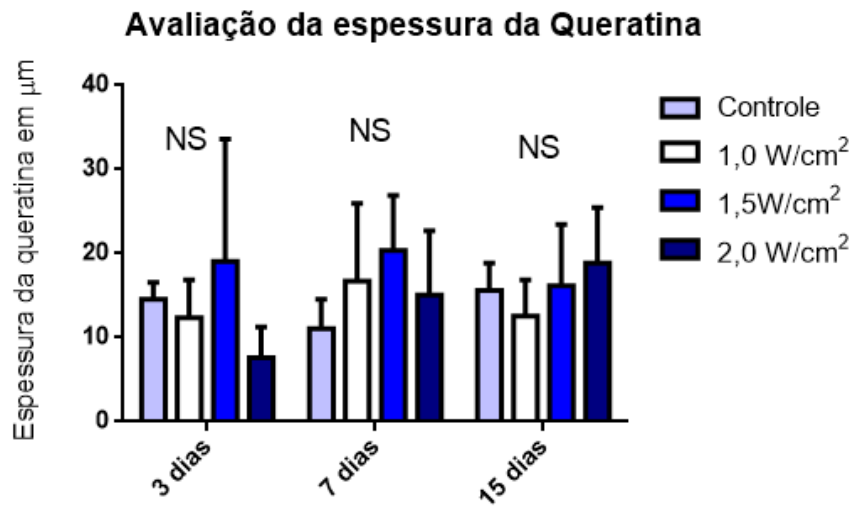
Interação $p = 0,016$

Tempo $p = 0,034$

UST $p = 0,057$

Houve interação entre os fatores tempo e intervenção. Entretanto o fator tempo apresentou-se significativo quando comparado ao fator intervenção com $p = 0,016$ e $p = 0,057$ respectivamente. Ou seja, não houve diferença significativa quanto ao uso das diferentes intensidades de UST sobre a espessura do epitélio.

Gráfico 4 - Comparação das médias e desvio padrão (DP) da espessura da queratina



NS= não significante

Interação p = 0,21

Tempo p = 0,45

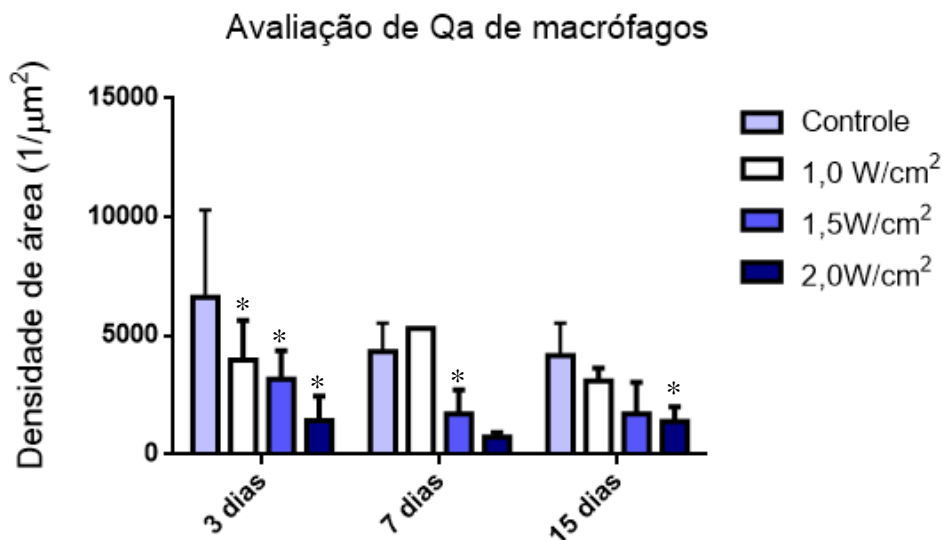
UST p= 0,17

Na avaliação da espessura da queratina não houve diferença significativa entre os grupos que sofreram intervenção com ultrassom terapêutico e o grupo controle.

6.4 Análise Estereológica

Serão apresentados os resultados das análises estereológicas a partir dos dados de V_v e Q_a de fibroblastos, colágenos e macrófagos, utilizando os sistemas teste de 36 pontos, onde é contabilizado as estruturas que tocam os pontos dentro da área teste e linhas proibidas, onde são excluídas da contagem as estruturas que tocam essas linhas.

Gráfico 5 - Apresentação dos resultados comparativos de média e desvio padrão de Qa de macrófagos.



NS= não significante

Interação p = 0,09

Tempo p = 0,037

UST p= 0,001

* Significante em relação ao controle

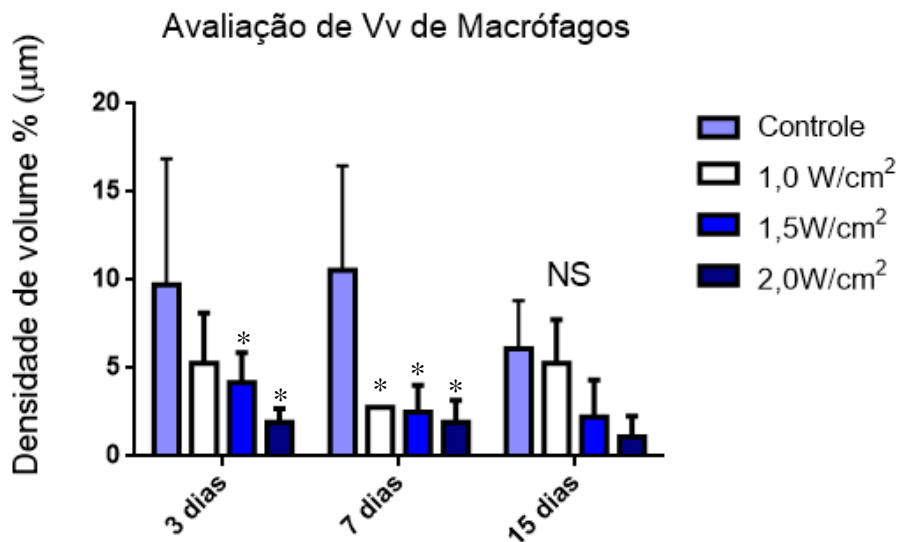
Observa-se no terceiro dia, que o grupo controle apresentou maior densidade de área de macrófagos quando comparado aos grupos tratados com maior intensidade (1,5 e 2,0 W/cm²) especialmente quando comparado ao grupo 2,0 W/cm² obtendo média de 6632 (1/mm²), ou seja, 78,46% a mais de densidade de área que o grupo irradiado com UST nessa intensidade. Não houve diferença significante quando comparado ao grupo 1,0W/cm². Dessa forma, pode-se afirmar que o UST, independente de intensidades diminuiu a proliferação de macrófagos, controlando o processo inflamatório em sua fase inicial.

No 7º dia, fase de proliferação de fibroblastos e colágeno estimulado entre outras células pelos macrófagos, o grupo controle apresentou maior média (4326,5 (1/μm²)) para densidade de área de macrófagos que o grupo 1,5 W/cm² (1714,3 (1/μm²)). O grupo 1,0 W/cm² apresentou maior média (5306 (1/μm²)) para densidade de área de macrófagos que o grupo 1,5 W/cm² (1714,3 (1/μm²)) e 2,0 W/cm² (734,69 (1/μm²)). Pode-se observar que quanto maior a intensidade aplicada ao tecido menor a quantidade de macrófagos presentes na área em cicatrização sugerindo que o UST em intensidades mais elevadas, pode retardar o

estímulo dado pelos macrófagos aos fatores de crescimento responsáveis pela produção de fibroblastos e colágeno, atrasando assim a retração da ferida.

No 15º dia, o grupo controle apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo 2,0 W/cm² com média de 4163 (1/mm²), ou seja, 66,68% de maior densidade de área. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa nas comparações múltiplas.

Gráfico 6 - Apresentação dos resultados comparativos de média e desvio padrão de Vv de macrófagos.



NS= não significante

Interação p = 0,09

Tempo p = 0,037

UST p= 0,001

* Significante em relação ao controle

A densidade de volume, ocupação relativa de uma estrutura na área teste, de macrófagos foi significativa nos grupos que sofreram intervenção apresentando p<0,0001.

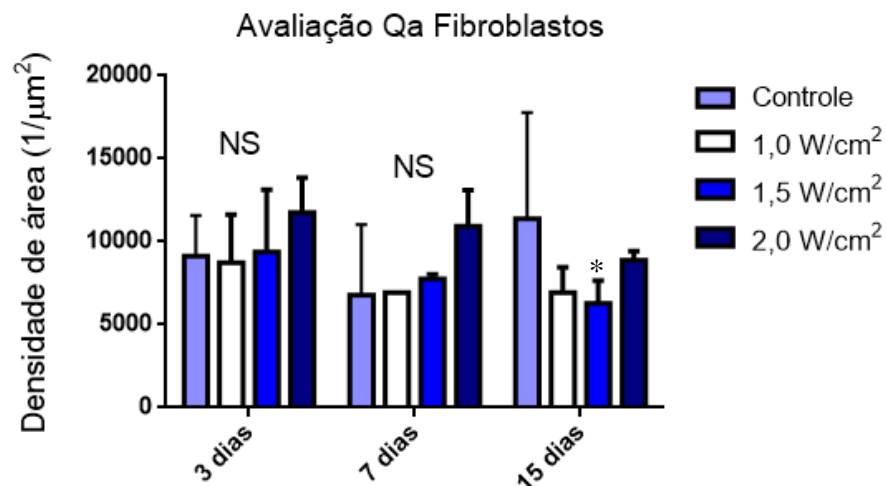
No 3º dia de tratamento pode ser observado que os grupos irradiados com 1,5 W/cm² e 2,0 W/cm² apresentam menor densidade de volume (4,16 % (µc)) e (1,94% (µc)) respectivamente quando comparadas ao grupo controle (9,72% (µc)). Sendo assim, quanto maior a intensidade, menor a densidade de volume que a estrutura ocupa em uma determinada

área, interferindo diretamente na cascata inflamatória. No início do processo de cicatrização esse efeito é importante para que não desenvolva sinais indesejáveis relacionados à inflamação.

Já no sétimo dia todos os grupos tratados apresentam-se com menor densidade de volume de macrófagos quando comparadas ao controle demonstrando que o UST tem efeito positivo no controle do processo inflamatório, entretanto pode interferir negativamente na proliferação de fibroblastos e colágeno quando usados em doses mais altas, pois houve queda no volume de macrófagos quanto maior foi a intensidade usada, mesmo não sendo demonstrado diferença significativa entre os grupos intervenção.

No 15º dia não houve diferença significativa entre os valores de intensidades aplicadas quando comparadas ao grupo controle.

Gráfico 7 - Resultados comparativos de média e desvio padrão de Qa de fibroblastos.



NS= não significante

Interação p= 0,185

Tempo p = 0,166

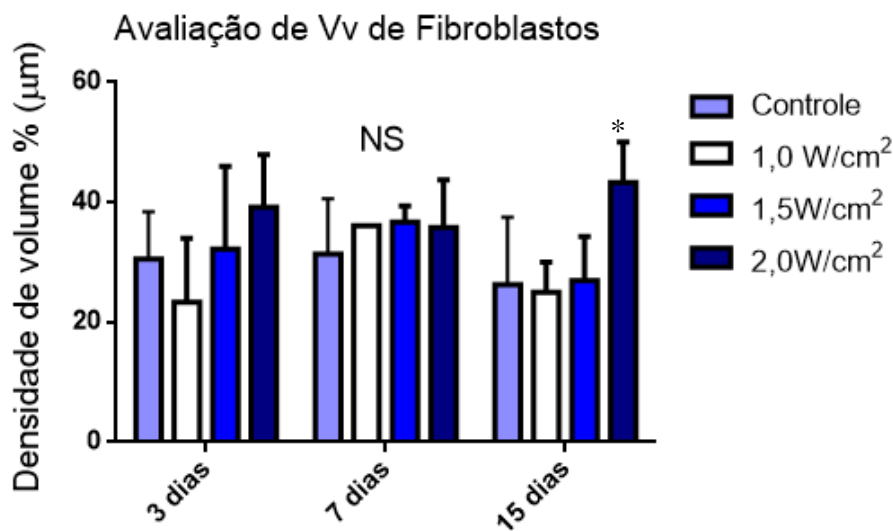
UST p = 0,026

* Significante em relação ao controle

A densidade de área ocupada pelos fibroblastos foi significativa nos grupos que sofreram intervenção apresentando p = 0,026.

Na avaliação dos intervalos de tempo do tratamento, no 3º e no 7º dia não há diferença na densidade de área do fibroblasto quando comparados os grupos estudados. No décimo quinto dia de intervenção o grupo tratado com 1,5 W/cm² apresentou menor densidade de área de fibroblasto (6285,7(1/μm²)) quando comparada ao grupo controle (11374(1/μm²)), ou seja, o grupo controle obteve 55,2% mais densidade de área de fibroblastos que o grupo 1,5 W/cm². Entre os demais grupos não houve diferença significativa.

Gráfico 8 - Apresentação dos resultados comparativos de média e desvio padrão de Vv de fibroblastos.



NS= não significante

Interação p= 0,154

Tempo p = 0,195

UST p = 0,002

* Significante em relação ao controle

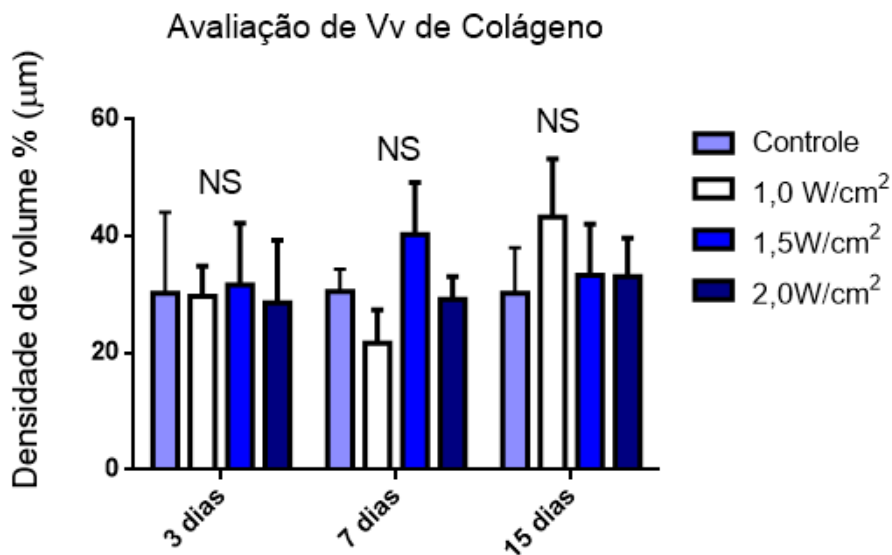
A densidade de volume de fibroblastos foi significativa nos grupos que sofreram intervenção apresentando p<0,002.

No terceiro dia de tratamento o grupo irradiado com 2,0 W/cm² apresentou maior densidade de volume de fibroblastos (39,16 % μm) quando comparado ao grupo 1,0 W/cm² (23,33 % μm), ou seja, 40,42% a mais que o grupo 1,0 W/cm².

No sétimo dia nenhum grupo apresentou resultados significantes quando comparados entre si.

No décimo quinto dia de intervenção o grupo tratado com $2,0 \text{ W/cm}^2$ apresentou maior densidade de área de fibroblasto que todos os grupos testados com outras intensidades, inclusive quando comparado ao grupo controle.

Gráfico 9 - Apresentação dos resultados comparativos de média e desvio padrão de Vv de colágeno.



NS= não significante

Interação $p = 0,025$

Tempo $p = 0,134$

UST $p = 0,377$

Houve interação entre os fatores tempo e intervenção com $p = 0,025$ o que impede uma avaliação precisa de significância entre grupo controle e grupos tratados nos diferentes intervalos de tempo.

7 DISCUSSÃO

Os artigos que tratam do UST em feridas cutâneas ainda são escassos e sugerem em sua unanimidade que ele é benéfico no tratamento de feridas cutâneas sem explicar, contudo, quais os mecanismos fisiológicos são estimulados por esse recurso (OLSSON et al, 2008). Essa dissertação explora dados macroscópicos e microscópicos, entretanto com os dados, não se teve como afirmar em que momento celular o UST atuou no processo de cicatrização das feridas. É possível sugerir uma alteração na produção e proliferação de células inflamatórias bem como um aumento na permeabilidade da membrana de fatores de crescimento de neovascularização, aumentando dessa forma a atividade de células presentes no processo de cicatrização tecidual.

BLUME et al (2005), afirma que os efeitos do ultrassom dependem de vários fatores, dentre eles fatores físicos e biológicos, como o tempo de exposição às ondas ultrassônicas, a estrutura espacial e temporal do campo ultrassônico, o tecido a ser tratado e o estado fisiológico em que se encontra a área lesada.

Dentre os possíveis parâmetros ajustados no aparelho, o tempo apresenta diferentes variações de valores entre os autores. FERREIRA, 2005 utilizou 10 minutos para tratamento de uma área de 1,0 cm de diâmetro, já YOUNG E DYSON (1990), observaram os efeitos do UST utilizando tempo de aplicação diária de 5 minutos por área. Ambos afirmaram que o UST auxiliou o processo de fechamento da ferida. Nessa dissertação o tempo de exposição ao UST foi estabelecido através da fórmula da ERA/ÁREA (DYSON, 1987) ficando determinado o uso de 2 minutos de exposição ao UST com aplicação diária. Entretanto, os resultados obtidos não apresentam diferença significativa em algumas variáveis avaliadas, sugerindo uma modificação dos parâmetros utilizados neste trabalho, o que pode envolver o tempo de exposição do tecido às ondas ultrassônicas.

GUIRRO (1995), afirma que UST no modo pulsado não gera calor suficiente para ocasionar alterações biológicas nos tecidos sendo essas alterações decorrentes de efeitos mecânicos causados pela onda ultrassônica. FREITAS (2011), afirma através de uma revisão bibliográfica que efeitos não térmicos do UST pulsátil são benéficos no processo de cicatrização em diversos tecidos. Ainda não está estabelecido na literatura qual faixa de calor produzida pelo ultrassom interferirá na atividade celular. Ao utilizarmos UST de forma pulsada (não térmico) com largura de pulso de 100 Hz (20%) observamos que o mesmo inibiu a atividade dos mastócitos e macrófagos e aumentou o número de fibroblastos e fibras de

colágeno. No intervalo entre a injúria e o início da fase proliferativa o controle da inflamação é um dos fatores mais importantes, visto que a permanência de células inflamatórias podem cronificar o processo de reparo tecidual. Já na fase de proliferação e regeneração são necessários estímulos a produção de fibroblasto e células de colágeno visando uma melhor retração da área da ferida.

Nesta dissertação, utilizamos o paquímetro mecânico manual para avaliação da área de retração da ferida. Não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com UST e o grupo controle contradizendo o estudo de FERREIRA (2005), onde a mesma observou através da planimetria, que houve uma redução significativa da ferida no 14º dia, não tendo diferença entre os demais dias estudados (3º e 7º). O estudo de FERREIRA 2005, foi composto por 60 animais tratados com 1,5 MHz de frequência fundamental, pulsado, por 10 minutos de aplicação em dias alternados e 30 mW/cm^2 . A autora comparou o fechamento da ferida através do método de planimetria. Apesar de ser um meio seguro, esse método avalia apenas a retração da ferida de forma macroscópica necessitando de métodos de avaliação microscópicos visto a complexidade do processo de cicatrização.

Quando comparamos os valores utilizados por FERREIRA, 2005 com os valores utilizados nessa dissertação para o tratamento da ferida podemos salientar que não existe comercialmente um UST de 1,5 MHz de frequência fundamental, levando a acreditar que a autora produziu um aparelho especificamente para este experimento. Além disso, o tempo de tratamento, utilizado pela autora contradiz informações que estão dispostas nos artigos os quais orientam que o tempo de terapia para aplicação do ultrassom varia conforme o tamanho da área de lesão, da intensidade de saída, do efeito térmico desejado visto que esse uso incorreto pode trazer danos teciduais e desorganização na deposição de células nos tecidos tratados mesmo que a ferida tenha fechado mais rápido.

Para acrescentar informações aos dados do fechamento da ferida, foi analisada a porcentagem de retração da área da ferida a fim de mensurar o quanto a lesão retraiu em cada intervalo de tempo. Foi possível observar que mesmo não havendo diferença significativa quanto ao tempo de fechamento da ferida a partir da aplicação do UST em diferentes intensidades, no terceiro dia, o grupo tratado com $1,5 \text{ W/cm}^2$ sofreu maior efeitos do fator tempo, ou seja, nesse grupo irradiado não fazer nenhum tratamento traria melhores resultados. O UST de $1,5 \text{ W/cm}^2$ de alguma forma interferiu negativamente para o a retração da área da ferida.

Os macrófagos fazem parte do grupo celular responsável por fagocitar os restos celulares e estimular os fatores de crescimento que irão estimular a produção de fibroblastos e posteriormente o colágeno. KORELO, 2016, avaliou a interferência do ultrassom na resposta imune do rato a partir do tratamento de ferida cutânea e afirmou que não há diferença na retração da área da ferida entre os grupos tratados com UST e controle, entretanto, o UST interferiu na atividade dos macrófagos aumentando sua atividade.

Nessa dissertação avaliamos a densidade de área e densidade de volume dos macrófagos e observamos que a medida que aumentamos a intensidade, houve uma diminuição nessas variáveis. Isso sugere que UST de intensidades mais altas, por 2 minutos de exposição de ondas na forma pulsada, controla no 3º dia os efeitos indesejáveis do processo de inflamação, entretanto, a partir do 7º dia essa queda na densidade de área e volume podem diminuir o estímulo à produção de fibroblastos.

Quanto aos mastócitos, células responsáveis pela resposta inflamatória, liberação de citocinas e fatores de crescimento para neovascularização observamos que o grupo tratado com $1,5 \text{ W/cm}^2$ diminuiu a quantidade de mastócitos no leito da ferida quando comparado aos demais grupos no 7º dia. Considerando que os mastócitos são células imunologicamente ativas na fase inflamatória espera-se uma diminuição na presença dessas células na fase proliferativa e regenerativa (BARRETO, 2013) como visto nessa dissertação ao utilizar o UST de 3 MHz com intensidade de $1,5 \text{ W/cm}^2$. Esse evento auxilia o processo de cicatrização permitindo uma menor presença de matriz extracelular provisória causada pela presença do influxo sanguíneo e células inflamatórias.

Ao avaliar a espessura do epitélio nessa dissertação não houve presença de diferença significativa para o uso do UST. O tempo foi significativo permitindo afirmar que para essa variável o tempo trouxe melhores resultados. Diferente do estudo realizado por De Bem et al (2008). No estudo desses autores eles utilizaram UST de 3 MHz em pele sadia de ratos a fim de observar alterações biológicas permanentes, variando a frequências entre 0,5 e $2,0 \text{ W/cm}^2$ tratados com 2 minutos de irradiação diária por quatro dias consecutivos. A partir dessa pesquisa os autores afirmaram que houve saturação no aumento da espessura da epiderme, infiltrado inflamatório e uma proliferação das fibras colágenas. O aumento na espessura do epitélio pode ser justificado pelo aumento na proliferação de células inflamatórias e neovascularização na área da lesão, entretanto pode levar a um desarranjo estrutural do tecido cicatrizado.

Essa dissertação refere-se ao processo de cicatrização tecidual, o que comparado a um tecido sadio, apresenta diferenças quanto à migração das células que participam do processo de reparo tecidual visto que no momento da lesão o fluxo sanguíneo é interrompido e uma neovascularização deve ocorrer para que todo o processo de cicatrização ocorra adequadamente.

Quando avaliamos a espessura da queratina presente na camada córnea do tecido epitelial, observamos que os grupos tratados com UST não apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle. No estudo de CHORILLI et al. (2007), os autores observaram uma diminuição na espessura da queratina quando utilizado UST com gel estéril e parâmetros semelhantes aos utilizados nesta dissertação, 3 MHz e $0,2 \text{ W/cm}^2$ por 2 minutos de exposição às ondas ultrassônicas. Esse efeito possivelmente se dá pela desnaturação da queratina e remoção das células mortas ao se aplicar o transdutor do UST diretamente na ferida com uma intensidade de $0,2 \text{ W/cm}^2$ que possivelmente é mais superficial que as intensidades testadas nessa dissertação.

É possível verificar a deposição de colágeno tipo I e tipo III nos grupos estudados. Há uma prevalência de colágeno tipo III (verde - amarelado) no grupo $1,0 \text{ w/cm}^2$ e no grupo controle, respectivamente. Já o colágeno tipo I (vermelho) tem prevalência no grupo $1,0 \text{ w/cm}^2$ e $2,0 \text{ w/cm}^2$ nesta ordem. Nesses grupos, as fibras de colágeno apresentam-se igualmente distribuídas no leito da ferida exceto no grupo tratado com $1,5 \text{ W/cm}^2$ onde as fibras apresentam-se mais finas e mais distantes uma das outras com espaços escuros que sugere estar preenchidos por outros tipos de células que não o colágeno.

A avaliação da deposição de colágeno foi feita a partir da polarização das imagens das lâminas coradas com Picrosirius. Apesar da análise da densidade de volume de colágeno não demonstrar diferença significativa quanto ao uso do UST, as imagens realizadas nos três intervalos de tempo de cicatrização, demonstraram que no 3º dia de tratamento existiu uma prevalência na deposição do colágeno tipo III no grupo $1,0 \text{ w/cm}^2$. VISNARDI, 2007 já descrevia que o UST em baixas intensidades 30 mW/cm^2 em pele sadia causava desorganização das fibras de colágeno e no aumento do número dessas células.

Segundo, BERTGES (2015), na fase inflamatória, onde a ferida ainda apresenta um tecido imaturo e grande migração de células, o colágeno tipo III deve estar mais presente sendo posteriormente substituído, na fase de proliferação e remodelamento por colágeno tipo I, com distribuição de forma organizada. Essa disposição das fibras descrita por BERTGES, 2015 e CAMPOS, 2007 pode ser observada nesta dissertação sugerindo que o UST de $1,0$

W/cm^2 acelerou a produção e proliferação das fibras de colágeno no início do processo de cicatrização. Já o grupo tratado com $1,5 W/cm^2$ pode ter desorganizado as fases de deposição de colágeno atrasando-as e tornando a área cicatrizada com menor qualidade tecidual.

No sétimo dia a proliferação das fibras de colágeno manteve-se e os não apresentaram diferença estatística entre si, resultado também observado por meio da análise de V_v de colágeno. Segundo CAMPOS (2007), no intervalo entre o terceiro e sétimo dia do processo de cicatrização há uma queda na produção do colágeno tipo III e aumento progressivo e constante na produção das fibras de colágeno tipo I. Nessa dissertação foi possível observar que a produção de fibras de colágeno manteve-se constante à medida que a fase de proliferação e remodelamento foi acontecendo, entretanto o grupo tratado com $1,0 W/cm^2$ apresentou a substituição do colágeno tipo III por colágeno tipo I em maior proporção quando comparado aos demais grupos.

No 15º dia foi observada a deposição de colágeno tipo I (vermelho) predominantemente no grupo $1,0 W/cm^2$ quando comparado aos demais grupos, inclusive ao grupo controle. Assim é possível afirmar que a substituição da matriz colagenosa não sofreu interferência negativa pelo uso do UST seguindo o curso do processo inflamatório fisiológico.

Essas fibras estão mais adelgaçadas nos grupos que receberam maiores intensidades ($1,5 W/cm^2$ e $2,0 W/cm^2$) o que segundo De Bem, 2008, também ocorreu em seu estudo. Mesmo tratando pele sadia de ratos *Wistar* a autora observou que os grupos tratados com intensidades acima de $1,0 W/cm^2$ apresentaram suas fibras de colágeno mais finas.

Não foram realizados estudos sobre a resistência tênil desses tecidos o que nos impediu de afirmar se haveria ou não perda de elasticidade do tecido cicatrizado. O grupo controle ainda apresenta transição de colágeno tipo III e certa desorganização dessas fibras se comparado ao grupo $1,0 W/cm^2$ o que demonstra mais lentidão no processo de transição do colágeno tipo III para tipo I, o qual deveria estar se completando no período de remodelamento.

Para descrever melhor os resultados dessa dissertação quanto aos fibroblastos, foi utilizado a estereologia como recurso auxiliar e através desta técnica foram medidas a densidade de área e densidade de volume dessas estruturas. Observamos que a densidade de área de fibroblastos sofreu interferência do UST quando aplicada uma intensidade de $1,5 W/cm^2$, especialmente no 15º dia, período em que há aceleração do processo de desgranulação dessas células para substituição da mesma pelo colágeno. Na densidade de volume de fibroblastos tanto no 3º quanto no 15º dia, o grupo tratado com $2,0 W/cm^2$ apresentou maior

densidade de volume que os demais grupos estudados, sugerindo maior produção dessas células. A permanência do fibroblasto na fase de remodelamento sugere um atraso na proliferação de colágeno bem como na substituição de colágeno tipo III para colágeno tipo I, podendo levar à área cicatrizada a hipertrofias, como citado por ISAAC et al. 2011. Não encontramos estudos que descrevessem claramente essa ação, nem tampouco observamos na avaliação das imagens dessa dissertação alguma área que sugerisse hipertrofia. Os resultados dessa dissertação sugerem que o grupo tratado com maior intensidade de $2,0 \text{ W/cm}^2$ leva o tecido a um processo cicatricial mais lento, visto que nessa fase já deveria estar acontecendo apoptose das células de fibroblastos para finalmente formar a cicatriz.

As fibras elásticas foram observadas para reforçar a necessidade desse estudo abranger também a qualidade do tecido cicatricial e não apenas o tempo de fechamento da ferida ou a área de retração quando comparada ao grupo controle. Nelas podem ser observados que a disposição das fibras elásticas apresenta prevalência nos grupos controle e $1,0 \text{ W/cm}^2$ quando comparados aos outros grupos, entretanto, não foi possível quantificar essas células para demonstrar diferenças significantes entre esses dois grupos no que diz respeito ao número de fibras elásticas, visto termos apenas uma imagem por lâmina corada.

Nessa dissertação não avaliamos a neovascularização, mas como é conhecida, a proliferação das células do processo de cicatrização está intrinsicamente ligada à presença de novos vasos na área da ferida. Concordando com este estudo, doses mais baixas, na faixa entre $1,0$ e $1,5 \text{ W/cm}^2$, trazem melhores resultados quando comparados a doses maiores, no processo de cicatrização tecidual. Essa afirmativa foi possível após a análise qualitativa da deposição de fibras de colágeno e fibras elásticas onde o UST com dose de $1,0 \text{ W/cm}^2$ apresentou melhores resultados quanto à deposição dessas células na área tratada. Ao contrário disso, as variáveis estereológicas (V_v e Q_a de fibroblastos, macrófagos e colágeno) tiveram os piores resultados quando utilizamos doses de $2,0 \text{ W/cm}^2$.

MENDONÇA (2006), avaliou os efeitos do ultrassom terapêutico de baixa intensidade no processo de cicatrização por segunda intenção. Semelhante a essa dissertação, o autor utilizou 60 ratos Wistar dividindo-os em dois grupos. Esses animais foram subdivididos em grupos que relacionassem o tempo de cicatrização (3º, 7º, e 14º) dias. Os grupos foram tratados com 1,5 MHz de frequência fundamental, pulsado, por 10 minutos de aplicação em dias alternados e 30 mW/cm^2 e outro foi o grupo controle. O autor concluiu que na presença do UST a cicatrização cutânea por segunda intenção em condições experimentais teve uma melhora moderada na cicatrização quando comparado ao grupo controle, sem possíveis

efeitos deletérios. Entretanto, o estudo em questão utilizou um tempo de aplicação acima do valor estimado por BLUME et al, (2005), visto que a área da ferida foi de apenas 1,0 cm de diâmetro, ou seja, esse autor utilizou um tempo 5 vezes maior que o esperado.

Nessa dissertação, aplicando a relação de ERA/Área, utilizaram-se apenas 2 minutos de ondas efetivas para o tratamento respeitando os parâmetros citados nos artigos. É possível que o aumento do tempo de irradiação efetiva estimule mais as células da fase de proliferação e remodelamento, entretanto, pela falta de protocolo foi decidido nessa dissertação, ajustar os parâmetros mais próximos dos habituais a fim de evitar lesão cutânea.

FERREIRA (2005), realizou um experimento idêntico ao anterior e concluiu, através da planimetria, que houve uma redução significativa da ferida no 14º dia, não tendo diferença entre os demais dias estudados (3º e 7º). A autora comparou ainda a eficácia da planimetria quando comparado a outras formas de avaliação não invasiva da área de retração da ferida. Avaliamos a retração da ferida através do paquímetro mecânico manual. Com esse instrumento, não foi observado diferença significativa entre os grupos tratados com UST e o grupo controle. Todavia, os parâmetros propostos nessa dissertação são diferentes daqueles propostos por FERREIRA, 2005. Diferente desse estudo, essa dissertação utilizando UST pulsado de 3,0 MHz, pulsado em diferentes intensidades avaliou, além da biometria, a espessura da queratina e do epitélio, não evidenciando diferença significativa.

Observa-se que não existem muitos estudos relacionados ao uso do ultrassom terapêutico no processo de cicatrização de feridas e que apresente dados da biometria, histologia e morfometria dessas áreas. Os resultados mostraram que as doses mais elevadas do ultrassom terapêutico prejudicam o processo de cicatrização de feridas, especialmente após o sétimo dia de tratamento, entretanto, nos primeiros dias de tratamento, pode-se observar uma tendência para melhores resultados no grupo tratado com 1,0 e 1,5 W/cm².

Foi possível observar que o modelo animal e o número de animais utilizados neste estudo foram suficientes para coleta dos dados não sendo necessário, portanto, a modificação por outro modelo experimental no momento. Quanto ao uso do ultrassom terapêutico de 3 MHz para cicatrização de feridas cutâneas é possível reavaliar a variável para retração da área da ferida e espessura do epitélio e da queratina a partir de mudanças nos parâmetros usados sendo eles o tempo de aplicação e o modo contínuo. Esses parâmetros podem alterar a forma de absorção das ondas ultrassônicas e produzir calor no tecido em tratamento. Essa produção de calor favorece a vasodilatação e migração celular para área lesionada interferindo na cascata inflamatória e no reparo tecidual. É possível afirmar ainda que o ultrassom terapêutico

com dose de $2,0 \text{ W/cm}^2$ prejudicou em alguns momentos o processo de cicatrização, especialmente quando avaliamos o fibroblasto e o colágeno, sugerindo ser desnecessário o uso dessa intensidade em novos estudos.

8 CONCLUSÃO

De acordo com o nosso experimento, o melhor protocolo proposto para tratamento de feridas cutâneas experimentais não infectadas através do UST pulsado, com 100 Hz de largura de pulso (20%) com 3 MHz de frequência é a aplicação da intensidade de $1,0 \text{ W/cm}^2$ nos 3 primeiros dias, seguidos de $1,5 \text{ W/cm}^2$ nos dias subsequentes até o 15º dia com duração de 2 minutos por dia.

O UST pulsado com 100 Hz de largura de pulso (20%) e 3 MHz de frequência, é eficaz no tratamento de feridas cutâneas experimentais nas intensidades de 1,0 e $1,5 \text{ W/cm}^2$.

As feridas apresentam melhor fechamento com aplicação do UST a depender dos parâmetros aplicados, sendo que sua utilização diminuiu a produção de mastócitos e macrófagos em todas as fases do processo de cicatrização.

Não há diferença significativa no tempo de fechamento da ferida entre os grupos que receberam intervenção com UST e o grupo controle.

O ultrassom terapêutico pulsado com os parâmetros propostos aumentou significativamente a proliferação de fibroblastos, colágeno e fibras elásticas especialmente quando utilizados doses entre 1,0 e $1,5 \text{ W/cm}^2$.

REFERÊNCIAS

BAKER, KG; ROBERTSON. A Review of Therapeutic Ultrasound Biophysical Effects. *Physical Therapy*. V. 81, 2001.

BARRETO A.L.S.; BASTOS T.S et al. Análise quantitativa de mastócitos na cicatrização de feridas tratadas com membranas de colágeno contendo própolis vermelha. *Interfaces Científicas -Saúde e Ambiente*. n. 2. V.1. p. 79-90. Aracaju. fev. 2013

BLUME K.; MATSUO E.; LOPES M. S.; LOPES L. G. Dosimetria Proposta para o Tratamento por Ultra-Som – Uma Revisão de Literatura. *Fisioterapia em Movimento*. V.18, N.3, p. 55-64, Jul/Set, 2005. Curitiba.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Manual de estrutura física das unidades básicas de saúde: saúde da família*. 2º ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BERTGES, T.A.B.S. Comparative Study of Low Intensity Laser Effects and Therapeutic Ultrasound In Tissue Repair of Cutaneous Surgical Wounds in Wistar Rats: Histopathology and in Situ Production of Inflammatory Mediators. 2015. 71f. Dissertation. Juiz de Fora (MG).

CAMPOS A.C.L.; BORGES-BRANCO A.; GROTH A.K.; Cicatrização de Feridas. *Arquivos Brasileiro de Cirurgia Digestiva*. V. 1, N. 20, p. 51-8, 2007.

CHORILLI M.; ZAGUE V.; RIBEIRO A.C.A.P.; LEONARDI G.R et al. Avaliação Histológica da Pele Após Exposição à Gel Acrescido de Hialuronidase Associado ou Não a Ultrassom. *Latin American Journal of Pharmacy*. V.26. N.1. p.26-30. 2007

DE BEM DAIANE M. et al. Análise Histológica em Tecido Epitelial Sadio de Ratos Wistar (In Vivo) Irradiados com Diferentes Intensidades do Ultrassom. *Revista Brasileira De Fisioterapia [On-Line]*. V.14, 2010.

DIONÍSIOVC, VOLPON JB. Ação do Ultra-Som Terapêutico Sobre a Vascularização Pós-Lesão Muscular Experimental em Coelho. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. V.4, p. 19-25, 1999.

DYSON M. Mecanisms Involved in Therapeutic Ultrasound. *Physiotherapy*. V.73, N.3, p. 116-130, 1987.

EMING S.A., WERNER S., BUGNON P. et al. Accelerated Wound Closure in Mice Deficient for Interleukin-10. *American Journal Pathology*. V.170, N.1, p.188-202, 2007.

FERNANDES M.A.L. et al. Efeito do ultra-som terapêutico em tendinite experimental de eqüinos: estudo clínico, ultrasonográfico e histopatológico de dois protocolos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, V.55, n.1, p.27-34, 2003.

FREITAS, TP; FREITAS, LS; STRECK, EL; Ultrassom Terapêutico No Mecanismo De Cicatrização: Uma Revisão. *Arquivos Catarinenses De Medicina*. V. 40 N.1, 2011.

GUIRRO, EC et al. efeitos da estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade no processo cicatricial: estudo experimental em ratos. *Revista Ciência & Tecnologia*. N.8, p.37-47, 1995.

GUIRRO, R.; SANTOS, S.C.B. A realidade da potência acústica emitida pelos equipamentos de ultra-som terapêutico: uma revisão. *Revista De Fisioterapia Da Universidade de São Paulo*, V.4, n.2, p.76-82, 1997.

ISAAC C. et al. Alterações no Processo de Reparo Fisiológico. *Revista Brasileira de Queimaduras*. V.10, N.2, p. 61-5, 2011.

KORELO RIG, KRYCZYK M, GARCIA C, NALIWAIKO K, FERNANDES LC. Wound healing treatment by high frequency ultrasound, microcurrent, and combined therapy modifies the immune response in rats. *Brazilian Journal Physicaltherapy*. Mar-Apr; V.20. N.2 p.133-141, 2106.

MENDONÇA, A.C. et al. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Acta Ortopédica Brasileira* [online]. v.14, n.3, p.152-157, 2006.

MENDONÇA RJ, COUTINHO-NETTO. Aspectos Celulares Da Cicatrização - *Anais Brasileiros De Dermatologia*, V.84, N.3, P.257-262, 2009.

NESTLÉ F.O et al. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *Journal of Immunology* . V.151: p.6535-6545, 1993.

NITZ A.C., ELY J.B., CAMPORA A.J., TAMES D.R., CORRÊA B.P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopu didymus* e *Calêndula officinali*. *Arquivos Catarinenses de Medicina* V. 35, N. 4, 2006.

OLSSON, DC et al. Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. *Ciencia Rural* [Online]. V.38, n.4, p. 1199-1207, 2008

PARK JE, BARBUL A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American Journal Surgical*. V.187. p. 1-6, 2004.

PAULA, J.L. Ultra-som terapêutico: considerações gerais. *Fisioterapia em Movimento*. V.VII, n.1, p. 9-16, 1994.

ROBERTSON VJ, BAKER KGA Review of Therapeutic Ultrasound: effectiveness studies. *Physical Therapy*. V.81. N.7. p.1339-1350, 2001.

RODRIGUES CJ, RODRIGUES JUNIOR AJ. A comparative study of aging of the elastic fiber system of the diaphragm and the rectus abdominis muscles in rats. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. V.33. N.12. p.1449- 54, 2000.

SANTORO MM, GAUDINO G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research*. V.304. p.274-86, 2005.

SIMPSON DM, ROSS R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *The Journal of Clinical Investigation*. V.51. p. 2009-23, 1972.

SINGER AJ, CLARK RA. Cutaneous wound healing. *New England Journal Medicine*. V.341. p.738-46, 1999.

SOUTO LRM, et al. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *The Medicine Journal*. V.124. N.2. p.71-6, 2006.

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

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

VISNARDI AR. Efeito do ultra-som de baixa intensidade no colágeno da pele sadia de ratos [dissertação]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo; 2007.

ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS
UNCISAL

Transformada pela Lei nº 6.660 de 28 de dezembro de 2005

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO – CEUA

Protocolo: Nº 111 A

Título: Proposta de protocolo para a utilização de ultrassom terapêutico de 3 mhz pulsado no processo de cicatrização de feridas experimentais em ratos wistar.
Pesquisador Responsável: Célio Fernando de Sousa Rodrigues

Maceió, 22 de dezembro de 2014

Sr^(a). Pesquisador (a),

Conforme deliberação em plenária ordinária do CEUA/UNCISAL ocorrida no dia 22/12/14, foi de consenso a aprovação do protocolo nº 111 A intitulado: Proposta de protocolo para a utilização de ultrassom terapêutico de 3mhz pulsado no processo de cicatrização de feridas experimentais em ratos wistar. Podendo a pesquisa ser iniciada.

Nesta oportunidade, lembramos que o pesquisador tem o dever de durante a execução do experimento, manter o CEUA informado através do envio a cada seis meses, de relatório consubstanciado acerca da pesquisa, seu desenvolvimento, bem como qualquer alteração, problema ou interrupção da mesma.

Svetlana Barros
Coordenadora CEUA/UNCISAL

ANEXO II

COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL BÁSICA DA RAÇÃO NUVILAB CR-1

Carbonato De Cálcio, Farelo De Milho, Farelo De Soja, Farelo De Trigo, Fosfato Bicálcico, Cloreto De Sódio, Premix Vitamínico Mineral E De Aminoácido, Aditivo Antioxidante. Níveis De Garantia: Umidade (Max): 12,50%; Proteína Bruta (Mín): 22,00%; Extrato Etéreo (Mín): 4,00%; Material Mineral (Max): 10,00%; Matéria Fibrosa (Max): 8,00%; Cálcio (Max): 1,40%; Fósforo (Mín): 0,80%. Enriquecimento Por Quilograma Do Produto Vitaminas: Vitamina A 12.000 Ui; Vitamina D3 1.800 Ui; Vitamina E 30,00 Mg; Vitamina K3 3,00 Mg; Vitamina B1 5,00 Mg; Vitamina B2 6,00 Mg; Vitamina B6 7,00 Mg; Vitamina B12 20,00 Mcg; Niacina 60,00 Mg; Ácido Pantotênico 20,00 Mg; Ácido Fólico 1,00 Mg; Biotina 0,05 Mg; Colina 600,0 Mg. Microelementos Minerais: Ferro 50,00mg; Zinco 60,00 Mg; Cobre 10,00 Mg; Iodo 2,00 Mg; Manganês 60,00 Mg; Selênio 0,05mg; Cobalto 1,50 Mg. Aminoácidos: DI-Metionina 300,00 Mg; Lisina 100,00mg.