ANA ELISA SERAFIM JORGE

Ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização de úlcera venosa crônica: estudo comparativo de duas técnicas de aplicação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós–Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos - da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

São Carlos
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

J586u

Jorge, Ana Elisa Serafim
Ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização de úlcera venosa crônica : estudo comparativo de duas técnicas de aplicação / Ana Elisa Serafim Jorge ; orientador Marco Andrey Cipriani Frade. -- São Carlos, 2009.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Bioengenharia) -- Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2009.

1. Cicatrização. 2. Úlcera venosa crônica. 3. Ultrassom pulsado de baixa intensidade. 4. Leito. 5. Borda. 6. Análise de imagem. 7. Análise histopatológica. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

1934 | 2009 USP 75 ANOS

ANA ELISA SERAFIM JORGE
MESTRADO EM BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA EESC – FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 03/09/09.

PROF. DR. MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE (ORIENTADOR)
Julgamento: Aprovada

Fundação de Apoio ao Ensino e Pesquisa e Assistência – FAEPA / HCFMRP-USP
Assinatura:

PROF. DR. JOSÉ MARCOS ALVES
Julgamento: Aprovado

Escola de Engenharia de São Carlos - USP
Assinatura:

PROF. DR. RINALDO ROBERTO JESUS GUIRRO
Julgamento: Aprovada

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
Assinatura:

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - Centro - São Carlos - SP - 13566-590
Telefone/Fax: (16) 3373-9586 - E-mail: bioeng@sc.usp.br

Dedico este trabalho aos meus pais,

Joana e Ricardo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade, pelos ensinamentos e orientações;

À fisioterapeuta Dra. Débora Garbin Minatel, pela ajuda, disposição e colaboração;

Ao biólogo Nelson Ferreira da Silva Júnior e ao Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva, pela amizade e pelos conselhos dados ao longo de toda minha jornada na Bioengenharia;

À Turma "Wound Healing" da Divisão de Dermatologia da FMRP-USP, pelas constantes colaborações, conselhos e amizade, em especial à Luísiane de Ávila Santana e ao Thiago Antônio Moretti de Andrade;

À dermatologista do Centro Saúde Escola (FMRP), Camila Teles Franco da Silveira, pela assistência aos pacientes deste trabalho e pelas biópsias realizadas;

À técnica de laboratório Marilena Heredia, pela ajuda na preparação das lâminas histopatológicas e pelas palavras de carinho;

Ao técnico do laboratório de eletrônica da Bioengenharia, Mário Gazziro, pelo auxílio com as dosimetrias do ultrassom;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, do Centro Saúde Escola e da Biblioteca da Escola de Engenharia de São Carlos da USP, pelos serviços prestados;

Ao André Luiz Barbosa Nunes da Cunha, pela ajuda e carinho;

Aos pacientes, pelo carinho, colaboração e confiança a mim depositados;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos meus amigos,

muito obrigada!!

“A sabedoria não nos é dada.

É preciso descobri-la por nós mesmos,

depois de uma viagem que ninguém

nos pode poupar ou fazer por nós.”

Marcel Proust

RESUMO

JORGE, A. E. S. (2009). **Ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização de úlcera venosa crônica: estudo comparativo de duas técnicas de aplicação.** 99 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

As úlceras venosas representam um grande problema de saúde mundial e elevados custos associados ao tratamento a longo prazo. A terapia ultrassônica tem sido aplicada por décadas a fim de acelerar o processo de cicatrização de feridas crônicas. Muitos autores observaram os efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS) em úlceras venosas, no entanto não há dados concisos sobre os modos de aplicação. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de duas técnicas de aplicação (borda e leito) do LIPUS, comparada à terapia convencional (creme sulfadiazina de prata 1%) na cicatrização de úlceras venosas crônicas. Para tanto, vinte e quatro pacientes com úlceras venosas foram avaliados no Ambulatório de Úlceras da Dermatologia (AUD) do Centro Saúde Escola (CSE) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e alocados aleatoriamente nos: Grupo Borda (média da idade 63 anos; 37,5% mulheres; e 62,5% brancas) com 9 úlceras (13,49 ± 14,41 cm² inicial) tratadas com LIPUS (1,5 MHz, 30 mW/cm^2) na borda; Grupo Leito (média da idade 73 anos; 100% mulheres; e 87,5% brancas) com 8 úlceras (15.61 ± 13.36 cm² inicial) tratadas com LIPUS no leito; e Grupo Sulfadiazina (média da idade 76 anos; 20% mulheres; e 40% brancas) com 7 úlceras (24,06 ± 30,10 cm² inicial) tratadas diariamente com creme sulfadiazina de prata 1%. Durante o tratamento, as úlceras foram fotografadas quinzenalmente e analisadas pelo *software ImageJ* a fim de se obter a área ulcerada e posterior Índice de Cicatrização da Úlcera (ICU) e Relação Esfácelo/ Granulação (REG). No Grupo Leito foi realizada uma análise histopatológica (contagem de fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e colágeno) a partir de biópsias coletadas no 1º e no 45º dia de tratamento. Os dados foram analisados pelo teste de efeitos mistos e por Poisson a fim de comparar os grupos, com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Assim, considerando as discretas diferenças encontradas no ICU e na REG dos dois grupos irradiados somadas às alterações histopatológicas do GL, torna-se evidente a ação positiva do LIPUS no tratamento das úlceras venosas crônicas superior à terapia com sulfadiazina de prata 1%, independente do local de aplicação.

Palavras-chave: Cicatrização. Úlcera venosa crônica. Ultrassom pulsado de baixa intensidade. Leito. Borda. Análise de imagem. Análise histopatológica.

ABSTRACT

JORGE, A. E. S. (2009). **Low-intensity pulsed ultrasound on chronic venous ulcer healing: comparison of two application techniques.** 99 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Venous ulcers represent a major health problem in the world and high costs associated with long-term treatment. Ultrasonic therapy has been applied for decades to enhance the process of chronics wound healing. Many authors have assessed the effects of LIPUS on venous ulcers, but there were no data about the different application techniques. This study aimed to assess the effectiveness of two application techniques (edge and bed) of LIPUS, comparing with the conventional therapy (1% silver sulfadiazine cream) on the chronic venous ulcers healing. Therefore, twenty four patients with venous ulcers were evaluated at the Ulcers Outpatient of Dermatology at the Teaching Health Center, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo (FMRP-USP) and randomly allocated, as follows: Edge Group (mean age 62.9 years, 37.5% women, 62.5% white) with nine ulcers ($13,49 \pm 14,41$ cm²) treated with LIPUS (1.5 MHz, 30 mW/cm^2) at the edge, Bed Group (mean age 72.6 years, 100% women, 87.5% white) with eight ulcers (15.61 ± 13.36 cm²) treated with the same LIPUS at the bed and Sulfadiazine Group (mean age 75.7 years, 20% women, 40% white) with seven ulcers ($24,06 \pm 30,10$ cm^2) treated daily with 1% silver sulfadiazine cream. During treatment, they were photographed every fifteen days and analyzed with the software ImageJ to obtain the ulcerated area, Wound Healing Index (WHI) and Sphacel and Granulation Ratio (SGR) from all ulcers. At the Bed Group, it was performed a histopathological analysis (fibroblasts, inflammatory cells, blood vessels, and collagen counting) from biopsies collected at the 1st and the 45th treatment day. Data were analyzed by mixed effects and Poisson tests for comparison among groups, with the level of significance set at 95% ($p<0.05$). Thus, considering the slight differences found in ICU and REG of irradiated groups and GL histopathological changes, it is evident better effects in chronic venous ulcers with LIPUS treatment than conventional therapy with silver sulfadiazine 1%, independently of application site.

Keywords: Wound healing. Chronic venous ulcer. Low-intensity pulsed ultrasound. Bed. Edge. Image analysis. Histopathological analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme 17

Figura 2 – Porção de uma molécula de tropocolágeno 19

Figura 3 – Reparo tecidual por regeneração e por fibrose 20

Figura 4 – Úlceras venosas crônicas: tecido de granulação com presença de esfácelo 26

Figura 5 – Movimento oscilatório de partículas e a onda sonora..... 30

Figura 6 – Características de uma onda sonora..... 31

Figura 7 – Frequências de onda distintas 31

Figura 8 – Campo acústico do US..... 32

Figura 9 – Comportamento da onda incidente em um meio 33

Figura 10 – Transdutor do LIPUS acoplado ao dosímetro..... 41

Figura 11 – Aparelho de LIPUS e seu transdutor devidamente acondicionado..... 42

Figura 12 – Técnicas de aplicação do LIPUS nas úlceras..... 42

Figura 13 – Suporte metálico e máquina fotográfica 44

Figura 14 – Segmentação semiautomática da área ulcerada 46

Figura 15 – Definição da cor de interesse pela barra de rolagem 47

Figura 16 – Seleção (em preto) das áreas do tecido de granulação e de esfácelo, respectivamente 47

Figura 17 – Procedimento para análise das lâminas coradas com HE (400x) utilizando o *Plugin* "*Cell Counter*" do *ImageJ*. Aquisição da imagem (A) e respectivas contagens (B) 49

Figura 18 – Procedimento para análise do colágeno utilizando o *Plugin* "*Colour Deconvolution*" do *ImageJ* (400x). Aquisição da imagem (A) e sua decomposição em três cores (B)..... 50

Figura 19 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 8 do GB nos 1º, 30º, 60º e 90º dias..... 54

Figura 20 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 1 do GL nos 1º, 30º, 60º e 90º dias 55

Figura 21 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 2 do GL no início e após 30 dias 55

Figura 22 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 4 do GL nos 30º e 60º dias 55

Figura 23 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 2 do GS nos 1º, 30º, 60º e 90º dias 56

Figura 24 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 4 do GS nos 1º, 30º, 60º e 90º dias 56

Figura 25 – Imagem histopatológica (HE) do centro da úlcera com infiltrado inflamatório associado a fibroblastos no 1º dia (A) e aumento do número de fibroblastos em relação às células inflamatórias no 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)] 57

Figura 26 – Imagem histopatológica (HE) da borda da úlcera com menor quantidade de fibroblastos no 1º dia (A), comparado ao 45º dia (B). [barra de escala de 50 µm (400x)] 57

Figura 27 – Imagem histopatológica (HE) da borda da úlcera com pouco infiltrado inflamatório no 1º dia (A), comparado ao 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)] 58

Figura 28 – Imagem histopatológica (HE) do centro da úlcera com grande quantidade de células inflamatórias no 1º dia (A), comparado ao 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)] 58

Figura 29 – Imagem histopatológica (HE) da borda da úlcera com pequena quantidade de vasos sanguíneos no 1º dia (A), comparado ao 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)] 59

Figura 30 – Imagem histopatológica (TG) do colágeno menos reorganizado no 1º dia (A) em relação ao 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)] 59
Figura 31 – Box-plot para a variável ICU dos grupos nos 30º, 60º e 90º dias 60
Figura 32 – Box-plot para a variável REG dos grupos nos 1º, 45º e 90º dias 61
Figura 33 – Box-plot para a variável Fibroblastos por local e tempo 61
Figura 34 – Box-plot para a variável Células Inflamatórias por local e tempo 62
Figura 35 – Box-plot para a variável Vasos Sanguíneos por local e tempo 62
Figura 36 – Box-plot para a variável Colágeno por local e tempo 63
Figura 37 – 1º, 30º e 60º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 1 83
Figura 38 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 2 83
Figura 39 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 3 83
Figura 40 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 4 83
Figura 41 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 5 83
Figura 42 – 1º, 30º e 60º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 6 84
Figura 43 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 7 84
Figura 44 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 8 84
Figura 45 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 9 84
Figura 46 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 1 85
Figura 47 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 2 85
Figura 48 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 3 85
Figura 49 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 4 85
Figura 50 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 5 86
Figura 51 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 6 86
Figura 52 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 7 86
Figura 53 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 8 86
Figura 54 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 1 87
Figura 55 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 2 87
Figura 56 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 3 87
Figura 57 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 4 87
Figura 58 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 5 88
Figura 59 – 1º e 30º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 6 88
Figura 60 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 7 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Dados clínico-demográficos dos grupos..... 53
Tabela 2 – Características das úlceras dos grupos..... 54
Tabela 3 – ICUs dos grupos 56
Tabela 4 – REGs dos grupos 56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16

2.1 Pele 17

2.2 Anatomia da Pele 17

2.2.1 Epiderme 17

2.2.2 Derme 18

- TECIDO CONJUNTIVO: 18
- VASCULARIZAÇÃO SANGUÍNEA, LINFÁTICA E INERVAÇÃO 19

2.2.3 Tecido subcutâneo (Hipoderme) 19

2.3 Reparo Tecidual 20

2.3.1 Cicatrização 20

- FASE DE COAGULAÇÃO 21
- FASE INFLAMATÓRIA 21
- FASE PROLIFERATIVA 22
- FASE DE REMODELAMENTO 23

2.4 Úlceras Venosas 23

2.4.1 Etiologia e patogênese 24

- ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA VENOSO 24
- FISIOPATOLOGIA 24

2.4.2 História clínica 26

2.4.3 Diagnóstico 26

2.4.4 Prognóstico 27

2.4.5 Fatores de risco 27

2.4.6 Interação medicamentosa 28

2.4.7 Tratamento 28

2.5 Ultrassom 30

2.5.1 Base física 30

2.5.2 Características das ondas sonoras 30

2.5.3 Produção 31

2.5.4 Campo acústico e energia 32

2.5.5 Propagação 32

2.5.6 Impedância acústica *33*
2.5.7 Reflexão e refração *33*
2.5.8 Atenuação *34*
2.5.9 Interação do US com o tecido biológico *34*

2.6 Ultrassom e Úlceras Venosas **35**

3 MATERIAL E MÉTODOS **40**

3.1 Material Utilizado **41**
3.1.1 Ultrassom *41*
3.1.2 Técnicas de aplicação do LIPUS *41*

3.2 Seleção dos Pacientes **42**
- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO 43
- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO 43

3.2.1 Padronização dos grupos *43*

3.3 Tratamento **44**
3.3.1 Padronização dos atendimentos *44*

3.4 Avaliação Clínico-Fotográfica **44**

3.5 Estudo Histopatológico **45**

3.6 Análise de Imagem **45**
3.6.1 Análise clínico-fotográfica *46*
- DELIMITAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA TOTAL DA ÚLCERA 46
- DELIMITAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ÁREAS DE GRANULAÇÃO E DE ESFÁCELO 46
- CÁLCULO DO ICU E DA REG 47

3.6.2 Análise microscópica *48*
- HISTOMORFOMETRIA DAS CÉLULAS E VASOS SANGUÍNEOS 48
- QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO 49

3.7 Análise dos Resultados **51**

4 RESULTADOS **52**

4.1 Análise Descritiva **53**
4.1.1 Dados amostrais *53*

4.1.2 Características das úlceras *53*
4.1.3 Análise das imagens *54*
- ANÁLISE CLÍNICO-FOTOGRÁFICA 54
- MICROSCÓPICA PARA O GRUPO LEITO 57

4.2 Análise Estatística 60

5 DISCUSSÃO 64

6 CONCLUSÃO 69

REFERÊNCIAS 71

APÊNDICES 78

ANEXOS 89

1 INTRODUÇÃO

A úlcera venosa é a manifestação clínica tardia da Insuficiência Venosa Crônica (IVC), a qual conduz a uma hipertensão venosa persistente. Representa a maior prevalência (70 a 80%) das úlceras de perna (MILLER, 2000) e tem incidência de até 1% na população mundial adulta (MARGOLIS et al., 2004). No Brasil, Cabral (2000) demonstrou que a incidência e a prevalência de úlceras venosas são altas e responsáveis pela segunda causa de afastamento do trabalho.

Com isso, o objetivo das pesquisas na cicatrização é desenvolver produtos, técnicas e métodos que estimulem e acelerem o processo cicatricial e evitem recidivas. Dentre as inúmeras formas de tratamento das úlceras venosas crônicas, o uso do Ultrassom Pulsado de Baixa Intensidade (LIPUS - *Low-Intensity Pulsed Ultrasound*) está indicado. Desde a década de 60, pesquisas apontam evidências consideráveis sobre uso do LIPUS como recurso terapêutico na cicatrização dessas úlceras (ANASTÁCIO, 2000; CALLAM, 1987; DYSON; FRANKS; SUCKLING, 1976; HILÁRIO, 1993; SANTANA, 2006; WEICHENTHAL et al., 1997).

No entanto, a maioria dos estudos utiliza protocolos com aplicação do ultrassom (US) na borda da úlcera (na pele íntegra) em detrimento de seu leito. Prováveis razões a respeito dessa escolha apontam riscos de contaminação, de causar trauma ou dor (POLTAWSKI; WATSON, 2007). Por isso, é válido examinar qual a melhor técnica de aplicação dessas ondas sonoras, visto que esse tema é pouco abordado na literatura.

Por sugestão de alguns pesquisadores (JOHANNSEN; NYHOLM; KARLSMARK, 1998; MENDONÇA et al., 2006; POLTAWSKI; WATSON, 2007) e pela necessidade de entender o mecanismo de interação do LIPUS aplicado diretamente no leito das úlceras, justifica-se este trabalho. Com isso, o presente estudo avaliou a eficácia de duas técnicas de aplicação do LIPUS, como na borda e no leito das úlceras venosas, comparando-as com o tratamento convencional à base de creme sulfadiazina de prata 1%.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a eficácia terapêutica de duas técnicas de aplicação (borda *versus* leito) do LIPUS no tratamento de úlceras venosas crônicas. Para isso, a dinâmica da cicatrização foi avaliada clinicamente pelo Índice de Cicatrização da Úlcera (ICU) e pela Relação Esfácelo/Granulação (REG); e histologicamente pela quantificação de fibroblastos, de células inflamatórias, de vasos sanguíneos e de colágeno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pele

A pele (cútis) é o órgão mais extenso do ser humano e representa 16% da massa de seu corpo. De acordo com a Figura 1, é composta por duas camadas principais: a epiderme, mais superficial e onde se encontram as estruturas anexais; e a derme, que contém o suprimento sanguíneo e a inervação da pele. Logo abaixo, situa-se o tecido subcutâneo (hipoderme), constituído de tecido adiposo (McGRATH; EADY; POPE, 2004).

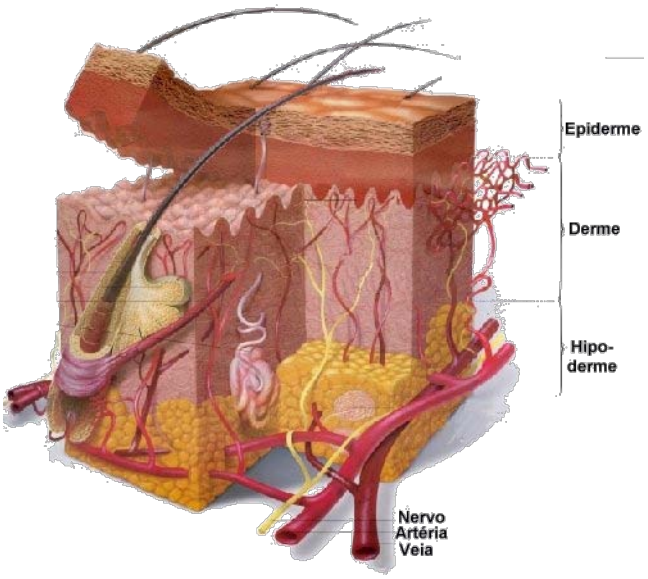


Figura 1 – Representação das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme
Fonte: Saúde Total (2009)

Inúmeras são suas funções: protege o organismo contra substâncias lesivas e contra a desidratação; auxilia na regulação da temperatura corporal; atua como órgão sensitivo de pressão, temperatura e dor; excreta água, lipídeos e outras substâncias pelas glândulas; barreira contra a radiação ultravioleta (UV); e exerce proteção mecânica devido à presença de elastina e de fibras colágenas (SAMPAIO, 2001).

2.2 Anatomia da Pele

2.2.1 Epiderme

A epiderme, demonstrada na Figura 1, é constituída por um epitélio pavimentoso pluriestratificado queratinizado (avascular) e apresenta 4 tipos celulares: queratinócitos, células mais abundantes nessa camada (95% do total); melanócitos, que sintetizam a

melanina; células de Langerhans ou dendríticas, apresentadoras de antígenos; e células de Merkel, que atuam como mecanorreceptores (GARTNER, 2003).

Os queratinócitos são renovados devido a mitoses contínuas da membrana basal da epiderme. As células recém formadas migram dessa camada mais profunda à superfície da pele, onde morrem e sofrem descamação (McGRATH; EADY; POPE, 2004). Morfologicamente, a epiderme é dividida em 5 zonas, da mais profunda à superfície: estrato basal (germinativo); estrato espinhoso (malpighiano); estrato granuloso; estrato lúcido (presente apenas em pele espessa); e estrato córneo (GARTNER, 2003).

2.2.2 Derme

A derme (córion) é formada por um tecido conjuntivo denso não-modelado e situa-se subjacente à epiderme, dessa separada pela membrana basal. Essa região da pele apresenta duas camadas: a papilar, mais frouxa e superficial; e a reticular, mais densa e profunda (GARTNER, 2003).

- **TECIDO CONJUNTIVO:**

O tecido conjuntivo é composto por uma matriz extracelular (MEC) e células, sendo responsável por algumas funções, como sustentação estrutural, preenchimento, nutrição, transporte (meio para trocas), defesa e reparo tecidual (GARTNER, 2003).

A MEC é constituída por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) imersas em uma substância fundamental amorfa (SFA), cujo componente principal é um gel hidrofílico de polissacarídeos associados ou não a proteínas, isto é, glicosaminoglicanas (GAGs), proteogicanas e glicoproteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

Os tipos celulares presentes na derme são: células fixas, que se desenvolvem e permanecem no próprio tecido, como fibroblastos (mais abundante no tecido conjuntivo), mastócitos, macrófagos e células adiposas; e células transitórias, que migram da corrente sanguínea para a derme quando recrutadas, como plasmócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e macrófagos (GARTNER, 2003).

Quanto ao colágeno, participa do reparo da pele traumatizada ou ulcerada. É uma proteína fibrosa alongada que constitui aproximadamente um terço do total de polipeptídeos do organismo (na derme, o colágeno tipo 1 predomina). A fibra de colágeno é formada por subunidades delgadas, o tropocolágeno (Figura 2), composta por três cadeias α entrelaçadas em tripla-hélice (MINOR, 1980).

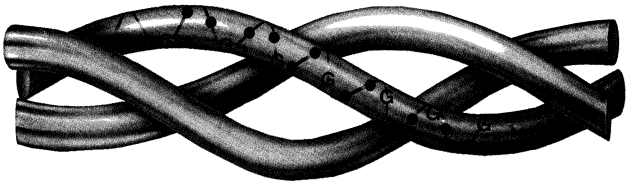


Figura 2 – Porção de uma molécula de tropocolágeno
Fonte: Culav, Clark e Merrilees (1999)

- **VASCULARIZAÇÃO SANGUÍNEA, LINFÁTICA E INERVAÇÃO**

Na derme encontram-se ainda os vasos sanguíneos e linfáticos e as estruturas nervosas, além dos anexos da pele, como glândulas sudoríparas, folículos pilosos e o músculo eretor do pêlo (SAMPAIO, 2001).

As artérias calibrosas do tecido subcutâneo ramificam-se e penetram na camada reticular da derme, onde se unem e formam retículos cutâneos. Esses emitem ramos à camada papilar da derme e formam as redes subpapilares, que irrigam as papilas, glândulas sebáceas e folículos pilosos (BAILEY, 1973).

Além disso, os vasos linfáticos são formados por uma camada de células endoteliais e se apresentam em alças na derme papilar, as quais desembocam no plexo linfático profundo, que se localiza entre a derme e o tecido subcutâneo. Eles também circundam glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos (SAMPAIO, 2001).

Em relação à inervação, a pele contém nervos cutâneos sensitivos, mielinizadaos, que se apresentam em terminações nervosas livres ou nociceptivas (receptores de dor) na epiderme e formações mais complexas (órgãos terminais específicos) - como os Corpúsculos de Vater-Pacini, táteis de Meissner, de Krause, de Ruffini e os Meniscos de Merkel-Ranvier - na derme das faces plantar e palmar, lábios e genitais (REBOLLO, 1973; SAMPAIO, 2001).

2.2.3 Tecido subcutâneo (Hipoderme)

A hipoderme representa a camada mais profunda da pele e é composta por tecido adiposo de espessura variável, também chamada de panículo adiposo. Esta camada tem a função de reserva energética, isolamento térmico e proteção mecânica do corpo às agressões físicas externas (SAMPAIO, 2001).

2.3 Reparo Tecidual

O ser humano é capaz de substituir suas próprias células e reparar o tecido que foi lesado por qualquer agente físico, químico ou biológico estranho a ele. Isso garante a manutenção da integridade tecidual e sua homeostase e ocorre por duas vias, como mostra a Figura 3: a da regeneração, que é o reparo tissular por células idênticas às lesadas, e a da substituição por tecido conjuntivo (fibroplasia ou fibrose), com perda funcional do tecido acometido e posterior formação de cicatriz (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

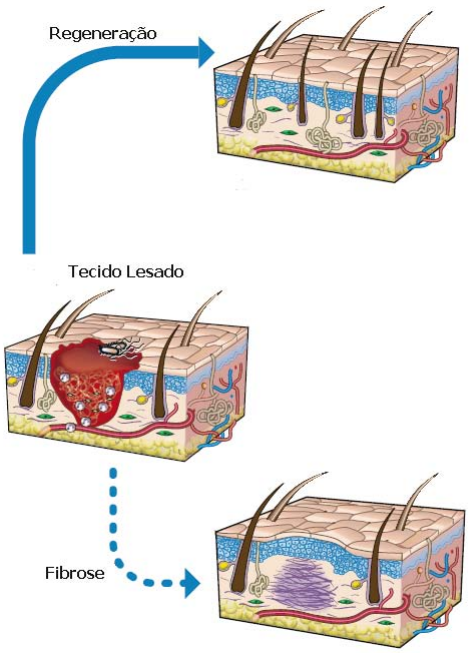


Figura 3 – Reparo tecidual por regeneração e por fibrose

2.3.1 Cicatrização

A cicatrização (fibrose) ocorre quando as células parenquimatosas e a MEC são acometidas e impossibilitadas de gerar novos tecidos. Na tentativa de reestruturar a parte lesada, o organismo sofre um processo complexo e dinâmico desencadeado por sinalização bioquímica e mediadores inflamatórios no local da lesão. Com isso, o espaço é substituído por tecido conjuntivo, que produz fibrose e posterior cicatriz (BALBINO, 2005).

Esse processo é constituído por uma cascata de eventos que se sobrepõem e, didaticamente, pode ser representado pelas seguintes fases: de coagulação, inflamatória, de fibroplasia e de remodelamento (STEED, 2003).

- **FASE DE COAGULAÇÃO**

A lesão por fissura ou erosão da pele frequentemente leva à ruptura dos vasos e capilares sanguíneos adjacentes e subsequente extravasamento de constituintes como plasma, plaquetas, fibrinogênio e fibrina para a MEC. Esse processo constitui a primeira onda de sinalizadores para ocorrer o reparo tecidual (BALBINO, 2005).

Após o trauma, ocorre uma resposta vasculomotora imediata que permite o estancamento do sangue. A vasoconstrição, que propicia a homeostasia, é mediada pela descarga adrenérgica e pela degranulação de mastócitos (STADELMANN, 1998).

Em seguida, ocorre uma vasodilatação local e aumento da permeabilidade dos capilares, o que contribui para a adesão leucocitária no endotélio e para o extravasamento de mediadores pró-inflamatórios. As plaquetas iniciam um processo de agregação devido à exposição de colágeno subendotelial e ativam a cascata da coagulação sanguínea (WITTE; BARBUL,1997).

As plaquetas agregadas formam um trombo (coágulo) que tampona provisoriamente a lesão endotelial. Juntamente à trombina, à fibronectina e a fragmentos plaquetários, esse coágulo libera citocinas, fatores de crescimento, como Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF), Fator de Transformação de Crescimento Beta (TGF-β), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e Fator de Agregação Plaquetária (PAF), assim como serotonina, bradicinina e histamina (STADELMANN, 1998; WITTE; BARBUL, 1997).

Esse coágulo, incrementado por fibrina, representa um importante gradiente químico sinalizador de células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais.

- **FASE INFLAMATÓRIA**

Os neutrófilos ou polimorfonucleares (PMN) são os primeiros tipos celulares a migrarem para o sítio da lesão em até 24 horas, os quais são responsáveis pela fagocitose de micro-organismos, restos celulares e agentes estranhos à ferida. A proliferação dessas células é ativada pelo aumento da permeabilidade vascular e por um gradiente de substâncias quimiotáticas, como fatores de complemento, IL-1β, Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-α), TGF-β, Fator Plaquetário 4 (PF-4) e produtos bacterianos (WITTE; BARBUL, 1997).

Os macrófagos, derivados de monócitos, constituem o tipo celular mais expressivo e abundante na fase inflamatória após 48 horas aproximadamente. Além de complementarem a atividade fagocitária exercida pelos neutrófilos, removem seus restos celulares, desbridam a

ferida e liberam peptídeos (IL-1β e TNF-α) às células T auxiliares (linfócitos). Além disso, também são responsáveis pela quimiotaxia (PDGF e TGF- β como sinalizadores) de fibroblastos e subsequente síntese e degradação de colágeno (BALBINO, 2005; DIEGELMANN; EVANS, 2004). Macrófagos também sintetizam Óxido Nítrico (NO), que exerce propriedades antimicrobianas. Essa substância é ativada pela enzima NO sintase induzida (iNOS), estimulada por citocinas e células pró-inflamatórias, como linfócitos (WITTE; BARBUL, 1997).

Os linfócitos recolhem neutrófilos inativos, induzem à angiogênese e liberam citocinas, como Interferon (IFN) e IL, que são mitogênicos e quimiotáticos para fibroblastos (AGAIBY, 1999; STADELMANN, 1998).

- **FASE PROLIFERATIVA**

Esta fase, que ocorre entre o segundo e o terceiro dia pós-lesão, é caracterizada pela proliferação de fibroblastos e células endoteliais. Os principais mediadores dessa fase são citocinas e fatores de crescimento, como PDGF e EGF, liberados por plaquetas e macrófagos presentes no local (AGAIBY, 1999).

Os fibroblastos migram e proliferam na MEC, composta por fibronectina e ácido hialurônico, a qual garantirá o suporte necessário para a fibroplasia. Esse fenômeno é caracterizado pela síntese de GAGs e colágeno, o que torna o tecido conjuntivo mais resistente pela deposição e agregação dessas fibras (STADELMANN, 1998).

Paralela à fibroplasia, a angiogênese local é induzida pela baixa tensão de oxigênio tissular e por fatores de crescimento (TGF-β e PDGF). Essa neovascularização ocorre pelo estímulo de receptores de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) que se encontram no endotélio de vasos não-lesados e propicia o suporte nutricional dos fibroblastos. As células endoteliais secretam colagenase e degradam os ativadores de plasminogênio, migram e formam novos tubos capilares no leito da ferida (BALBINO, 2005; STADELMANN, 1998).

Assim, o tecido de granulação é formado, sendo composto por fibroblastos, vasos neoformados e macrófagos suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno. Segundo Balbino (2005), esse novo tecido exerce papel de preenchimento e sustenta a migração de fibroblastos e queratinócitos da borda ao centro da ferida, os quais são proliferados por estímulo do TGF-β, caracterizando a fase de re-epitelização.

A contração da ferida ocorre pela re-epitelização e pela aproximação de suas bordas, realizada por miofibroblastos (fenótipo de fibroblastos ativados pelo TGF-β). Essa nova célula apresenta capacidade contrátil similar às células do tecido muscular liso, garantindo o movimento centrípeto das bordas da lesão (WITTE; BARBUL, 1997).

Por fim, ocorre o processo de maturação, no qual os fibroblastos instalados no leito da ferida sintetizarão colágeno, que passará a ser o principal componente da nova matriz. A deposição de fibras colágenas é essencial à resistência do tecido neoformado. O tecido de granulação, antes altamente vascularizado e habitado por muitas células, agora apresenta características de uma massa fibrótica avascular e acelular, denominada cicatriz.

- **FASE DE REMODELAMENTO**

O remodelamento da cicatriz é caracterizado pelo balanço entre síntese e degradação do colágeno anteriormente depositado. Segundo Witte e Barbul (1997), a enzima colagenase, responsável pela quebra da estrutura do colágeno, é controlada por citocinas e fatores de crescimento lançados por fibroblastos (TNF, IL-1β, PDGF, TGF-β) e queratinócitos (EGF e TGF-β).

O colágeno tipo III é substituído em sua maioria pelo colágeno tipo I e há uma remodelagem dessas fibras de acordo com a direção das tensões aplicadas no tecido. A cicatrização, após o terceiro mês, atinge permanentemente sua máxima resistência, que corresponde de 70 a 80 % da pele íntegra (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

2.4 Úlceras Venosas

A úlcera é uma ferida crônica da pele que se estende à derme com taxa lenta de cicatrização, presente a mais de quatro semanas (PATEL; LABROPOULOS; PAPPAS, 2006). Essa afecção é um problema comum e muito relevante nos serviços de saúde, com incidência entre 0,2 a 1 % na população adulta mundial (MARGOLIS, 2002).

Embora não haja dados nacionais concisos, Cabral (2000) demonstrou que a incidência e a prevalência de úlceras de perna são altas, especialmente as venosas, as quais representam a segunda causa de afastamento do trabalho no Brasil. Em um levantamento realizado em Juiz de Fora (MG), Frade et al. (2005) observaram uma prevalência das úlceras venosas (59%) dentre as úlceras de perna, com duração média de 94,2 meses e 50% de casos recidivantes. Os impactos psíquico, social e econômico dessas lesões crônicas repercutem em elevados custos financeiros e em profundas consequências sociais sobre os pacientes ulcerados.

As úlceras venosas representam a maior prevalência (70 a 80 %) das úlceras de perna (MILLER, 2000), também denominadas como úlceras varicosas, úlceras de estase, úlceras hipoestáticas ou úlceras gravitacionais. Essa lesão prejudica a qualidade de vida dos pacientes e constitui um importante desafio à equipe de saúde devido a sua alta morbidade e ao seu comportamento crônico e imprevisível, associado a uma carga econômica (VALENCIA, 2001).

Nos EUA, 4% da população acima de 65 anos apresenta úlcera venosa e a proporção é de 3:1 entre mulheres e homens, respectivamente. Esse país gasta em torno de 1 bilhão de dólares por ano no tratamento dessa afecção (MARGOLIS et al., 2002; MILLER; PHILLIPS, 2000; PATEL; LABROPOULOS; PAPPAS, 2006).

2.4.1 Etiologia e patogênese

- **ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA VENOSO**

A circulação venosa da perna é dividida em três componentes básicos: veias superficiais, veias comunicantes ou perfurantes e veias profundas. O sistema venoso superficial é interligado ao sistema profundo pelos ramos comunicantes. Essas veias possuem válvulas bicúspides que permitem a passagem unidirecional do fluxo sanguíneo em condições normais (BURNAND et al., 1977).

O retorno venoso ocorre de forma ativa e passiva. A primeira é garantida pelo mecanismo de bomba muscular das pernas. Ao caminhar, a musculatura da panturrilha (músculos gastrocnêmio e sóleo) contrai e comprimi as veias profundas, o que aumenta a pressão no sistema venoso e impulsiona o sangue ao coração. Nessa ocasião, as válvulas das veias comunicantes se fecham para evitar um refluxo sanguíneo e consequente aumento na pressão do sistema superficial (BURNAND et al., 1977).

Já o mecanismo passivo ocorre durante o repouso. Nessa condição, o gradiente de pressão determina a passagem do sangue, que segue das veias superficiais onde há elevada pressão hidrostática, ao sistema venoso profundo (PATEL; LABROPOULOS; PAPPAS, 2006).

- **FISIOPATOLOGIA**

Quando há uma falência do sistema venoso ou uma disfunção do mecanismo de bomba muscular, ocorre um fenômeno chamado Insuficiência Venosa Crônica (IVC), que leva à hipertensão venosa persistente. A etiologia dessa afecção é atribuída a um dos fatores

descritos: disfunção valvar das veias superficiais, comunicantes ou profundas; obstrução do sistema venoso profundo; disfunção da musculatura da panturrilha (VALENCIA, 2001).

A patogênese da úlcera venosa crônica ainda é controversa e não há consenso geral de sua evolução, no entanto, são consideradas três hipóteses consistentes e que têm como fator comum a hipertensão venosa persistente.

A primeira e mais antiga hipótese descreve a formação de uma barreira de fibrina perivascular. Segundo Burnand et al. (1982), a hipertensão venosa crônica distende os capilares sanguíneos e abre as junções endoteliais permitindo, assim, o extravasamento intersticial de macromoléculas, como o fibrinogênio. Devido à anormalidade fibrinolítica, logo há formação de um tampão de fibrina, que constitui uma barreira à difusão de oxigênio e nutrientes. Com isso, há hipóxia tecidual, morte celular, necrose e, consequentemente, ulceração.

A segunda hipótese envolve a adesão leucocitária e decorrente inflamação persistente. Devido à hipertensão venosa, o gradiente de pressão entre o sistema venoso e arterial (perfusão sanguínea) reduz e com isso o fluxo sanguíneo nos capilares venosos diminui. Em decorrência disso, no endotélio desses vasos ocorre uma agregação de leucócitos, que lançam enzimas proteolíticas (colagenase e elastase), citocinas, radicais livres e fatores quimiotáticos, além de atuarem como barreira física. Esses mediadores aumentam a permeabilidade vascular e permitem a passagem de fibrinogênio para o tecido pericapilar, posterior formação da barreira de fibrina e, por fim, ulceração (COLERIDGE-SMITH et al., 1988).

A terceira hipótese propõe a inibição de certos fatores de crescimento endógenos. A distensão dos capilares sanguíneos devido à hipertensão venosa favorece o extravasamento de macromoléculas, como o fibrinogênio e a macroglobulina-α, para o tecido adjacente. Essas macromoléculas inibem os fatores de crescimento responsáveis pela manutenção da integridade tecidual e pelo processo de reparo, como o TGF-β (FALANGA, EAGLSTEIN, 1993).

Ainda assim, recentemente foi criada a hipótese de que o desencadeamento e a persistência das úlceras venosas são induzidos pela lesão por isquemia-reperfusão, em que leucócitos são ativados e espécies reativas de oxigênio lesionam o tecido (MUSTOE; O’SHAUGHNESSY; KLOETERS, 2006).

2.4.2 *História clínica*

Pacientes ulcerados apresentam um conjunto de fatores intrínsecos à IVC. Geralmente, há grande desconforto associado à úlcera venosa e seu prognóstico é imprevisível e individual.

Segundo Finlayson (2009), úlceras recidivantes têm prevalência de até 70% dos casos. Essa recorrência está atrelada a certos fatores de risco, como tempo prolongado de úlcera e caso de insuficiência venosa profunda.

2.4.3 *Diagnóstico*

O diagnóstico baseia-se nos achados clínicos advindos de um criterioso e acurado exame físico e da história pregressa do paciente. Alguns sinais e sintomas são característicos, como: edema nos membros inferiores (MMII), veias varicosas, hiperpigmentação (dermatite ocre) devido ao extravasamento de hemossiderina, dermatite (eczema) de estase venosa, lipodermatoesclerose (induração) e perna com aparência de “garrafa de champanha invertida” (KACHEMOUNE, 2002; VALENCIA, 2001).

Frequentemente as úlceras venosas localizam-se no terço distal e na face medial da perna, próximas ao maléolo interno. Suas bordas são irregulares, porém bem delimitadas, e tanto seu tamanho quanto sua profundidade são variáveis. Apresentam exsudato amarelado em quantidade moderada à intensa e fibrina (ou esfácelo) contida no tecido de granulação, como demonstra a Figura 4. O odor pode ser forte na ocorrência de infecção e a dor nem sempre está presente (ABBADE, 2004; MILLER, 2000).

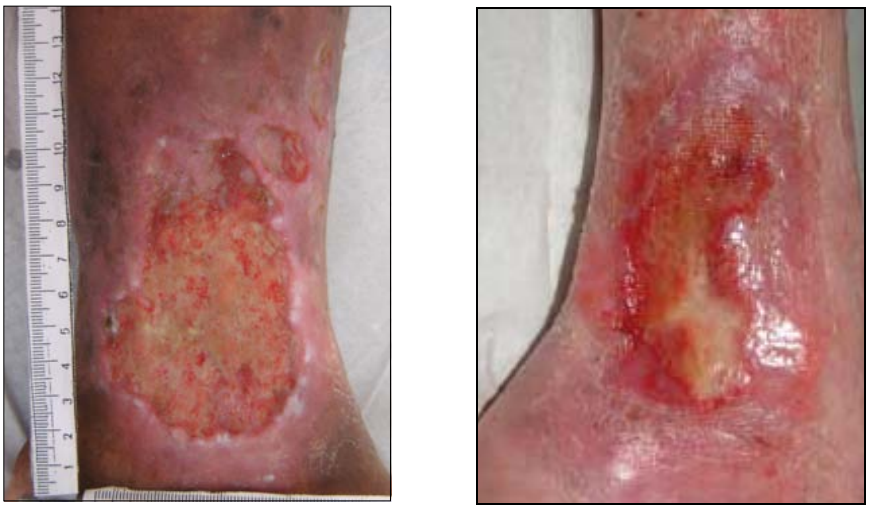


Figura 4 – Úlceras venosas crônicas: tecido de granulação com presença de esfácelo

Muitas vezes faz-se necessária uma avaliação pelo método não-invasivo do *Doppler* (ultrassonometria) na busca de possível obstrução venosa. Quando o paciente apresenta sinais de atrofia da musculatura da perna, a pletismografia é requerida para mensurar o grau de disfunção da bomba muscular (PATEL; LABROPOULOS; PAPPAS, 2006).

2.4.4 Prognóstico

A progressão da úlcera venosa crônica é tida como individual e complexa, no entanto alguns estudos demonstram ferramentas úteis para se avaliar a evolução de cada caso.

Uma das alternativas que prediz a taxa de cicatrização da úlcera, ou seja, a velocidade com que ela é reparada, consiste em averiguar a porcentagem de mudança da área durante as quatro semanas iniciais de tratamento. Alguns autores (KANTOR; MARGOLIS et al., 2004; PHILLIPS et al., 2000; ROBSON et al., 2000; SHEEHAN, 2003) afirmam que essa estratégia prediz com confiança a trajetória dessas úlceras, classificando-as em de difícil ou fácil cicatrização.

A área inicial da úlcera, antes de se iniciar a proposta terapêutica, também é levada em conta (MARGOLIS et al., 2004; PHILLIPS et al., 2000; SKENE et al., 1992). Esses autores afirmam que úlceras pequenas – menores que 5 cm^2 (PHILLIPS et al., 2000) – cicatrizam com maior velocidade do que úlceras médias a grandes.

Essa medida pode ser realizada de diversas maneiras: por planimetria; por medidas de comprimento e de largura; e por análise de imagem a partir de programas computacionais (MANI, 2001). Essa última pode ser considerada a ferramenta mais fidedigna, pois a partir de imagens digitais são fornecidos dados quantitativos da análise morfológica da úlcera. Um exemplo disso, é o *ImageJ*, um *software* livre que fornece a área total da ferida, bem como a de seus tecidos - de granulação, caracterizado pela cor vermelha; e esfácelo ou fibrina, na cor amarela (CAETANO et al., 2009; SANTANA, 2006).

2.4.5 Fatores de risco

Alguns aspectos gerais devem ser considerados fatores de risco potenciais à predisposição de IVC e consequente úlcera venosa, como sexo (feminino), faixa etária (idosos), raça, obesidade, número de gestações, história familiar de varicosidades, história pregressa de fratura de perna (tromboembolia), profissão (ortostatismo prolongado), tabagismo e carência de serviço médico (GREY, 2006; MAFFEI, 2002).

Fatores sistêmicos, como o estado nutricional (deficiências vitamínicas e protéicas), presença de infecção e resposta imunológica alterada, interferem no prognóstico de cicatrização da úlcera (WERDIN; TENENHAUS; RENNEKAMPFF, 2008). Outros fatores também estão envolvidos, como o estado metabólico (presença de *Diabetes mellitus*), o estado hormonal (glicocorticóides inibem a síntese de colágeno) e o estado circulatório - anormalidades venosas, arteriais e linfáticas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Segundo Margolis, Berlin e Strom (1999), também afetam a cicatrização fatores locais, como presença de tecido desvitalizado ou necrótico, quantidade exacerbada de fibrina ou esfácelo (mais de 50% da úlcera), corpos estranhos, tamanho e localização da ferida.

2.4.6 Interação medicamentosa

Segundo Karukonda et al. (2000), alguns medicamentos podem afetar a dinâmica do reparo das lesões, cada qual com seu mecanismo de bloqueio. Drogas antiplaquetárias (aspirina) e agentes anti-inflamatórios não-esteroidais prejudicam a fase de coagulação. Corticosteróides suprimem a fase inflamatória ao inibir o recrutamento de leucócitos e interferem na formação tecidual ao impedir a proliferação de queratinócitos. A colchicina impede a formação do tecido de granulação. Antissépticos têm ação tóxica contra queratinócitos e fibroblastos.

2.4.7 Tratamento

O objetivo das pesquisas em cicatrização de úlceras é desenvolver produtos, técnicas e métodos que estimulem e acelerem seu processo e previnam recidivas. Para que qualquer terapia seja eficaz, é necessário considerar cautelosamente os fatores individuais do paciente, que também deve colaborar com o profissional da saúde. Conscientização da moléstia, higienização adequada e assiduidade ao tratamento são princípios que contribuem para seu sucesso (WERDIN; TENENHAUS; RENNEKAMPFF, 2008).

Um conceito que compreende características intrínsecas aos cuidados com a ferida foi adotado pela *The Wound Healing Society*. *TIME* é o acrônimo em inglês utilizado para melhor avaliar os elementos envolvidos na úlcera venosa, como tecido (*tissue*), infecção (*infection*), umidade (*moisture*) e borda da ferida (*edge*). Qualidade do tecido (desvitalizado ou necrótico), presença de infecção, estado de hidratação e inspeção da borda da ferida são pontos de partida para uma adequada terapia (KEAST, 2007; WERDIN; TENENHAUS; RENNEKAMPFF, 2008).

A partir dessa análise criteriosa, o profissional da saúde elege a opção terapêutica mais apropriada. Convencionalmente, o tratamento baseia-se na terapia de compressão e na aplicação de agentes tópicos e de curativos oclusivos. Quando necessário, a antibioticoterapia oral é recomendada.

Há muitos anos a terapia por compressão é tida como cuidado primário das úlceras venosas, pois controla sua doença de origem: a IVC. Pode ser realizada de duas maneiras: pelo uso de meias elásticas especiais que exercem uma pressão de 30 a 40 mmHg; ou por bandagens com faixas elásticas, que são aplicadas firmemente do tornozelo ao joelho, exercendo um gradiente de pressão ascendente. Há também uma bandagem semirrígida impregnada por uma pasta de Óxido de Zinco denominada Bota de Unna. Sua utilização promove atividade fibrinolítica e redução do desconforto, mas frequentemente promove bastante exsudato (ABBADE, 2004; KUNIMOTO, 2001).

Os agentes antibióticos tópicos previnem ou tratam a infecção instalada na lesão e reduzem a contaminação bacteriana. Com isso, o odor, o exsudato, a inflamação exacerbada e a dor diminuem. Os princípios ativos comumente utilizados incluem a neomicina, a polimixina, a sulfadiazina de prata 1%, entre outros (EAGLSTEIN, 1997; FALANGA, 1998).

Os agentes desbridantes enzimáticos promovem a remoção do tecido necrótico e desvitalizado, o que auxilia na formação do tecido de granulação. Os mais utilizados são as colagenases, a papaína e a tripsina (VALENCIA, 2001).

Os curativos oclusivos são responsáveis por manter o leito da ferida úmido, que favorece o processo de cicatrização, e protegem contra agressões externas. Esses curativos apresentam ação desbridante autolítica suave, redução e prevenção a infecções, diminuição da dor e estimulação do tecido de granulação. As categorias dessas coberturas compreendem os filmes, os hidrocolóides, o hidrogel, os alginatos e as coberturas absorventes (EAGLSTEIN, 1997; KUNIMOTO, 2001).

Há outras opções terapêuticas mais sofisticadas, porém dispendiosas. Constituem aplicação de fatores de crescimento tópicos (PDGF), enxertos de pele autóloga, bioengenharia de tecido (cultura de fibroblastos e queratinócitos) e terapia gênica (HARDING, 2002; MUSTOE, 2004).

Como coadjuvantes, existem alguns aparelhos responsáveis por estimular o reparo tecidual e melhorar a resistência mecânica da cicatriz. Dentre esses, encontram-se a fototerapia com Laser (*Light Amplification by* S*timulated Emission of Radiation* – Amplificação da Luz pela Emissão Estimulada de Radiação) e LED (*Light Emitting Diode* –

Diodo Emissor de Luz); a estimulação elétrica de alta-voltagem e o Ultrassom, cada qual com seu mecanismo próprio de interação com o tecido ulcerado.

2.5 Ultrassom

2.5.1 Base física

O som é uma onda mecânica que, ao se propagar, causa perturbações vibratórias em partículas contidas em um meio gasoso, líquido ou sólido, conforme a Figura 5. O movimento periódico e ordenado dessas partículas gera uma transmissão de energia cinética para sua vizinhança, caracterizando a energia acústica.

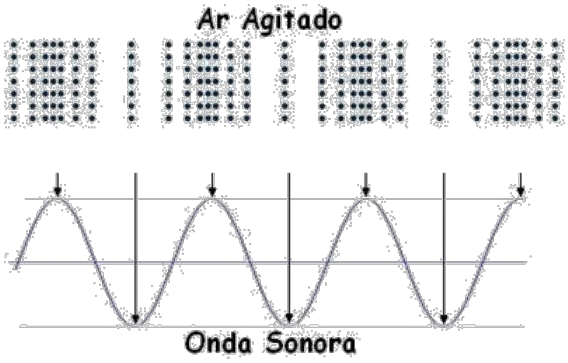


Figura 5 – Movimento oscilatório de partículas e a onda sonora

O US é a radiação sonora cuja frequência está acima do limiar máximo da audição humana, que corresponde a aproximadamente 20 kHz (LEIGHTON, 2007).

A propagação do US em meios sólidos ocorre por três modos: longitudinal, transversal e superficial. Ondas longitudinais apresentam direção de propagação da energia paralela à direção oscilatória das partículas, já as ondas transversais deslocam-se perpendicularmente. Em meios gasosos e líquidos, como em tecidos biológicos, ocorre apenas propagação longitudinal, em que há regiões de rarefação e compressão criadas pelo movimento das partículas (GRANDOLFO, 1987).

2.5.2 Características das ondas sonoras

Algumas características básicas de uma onda serão descritas brevemente, como comprimento, amplitude, frequência e período e velocidade de propagação (Figura 6).

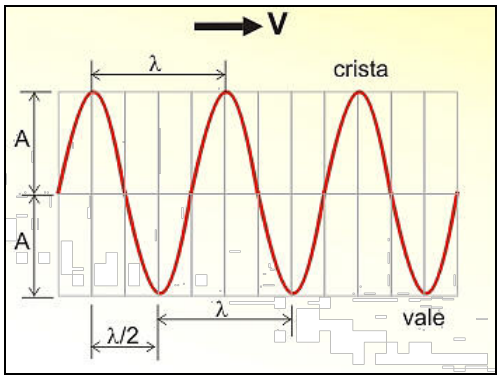


Figura 6 – Características de uma onda sonora

O comprimento de onda (λ) é caracterizado pela distância entre as duas regiões vizinhas de compressão e rarefação do meio em um determinado instante.

A amplitude (*A*) é a distancia máxima do deslocamento de uma partícula em relação a sua posição de repouso.

A frequência (*f*) é o número de repetições cíclicas de uma partícula por unidade de tempo (Figura 7).

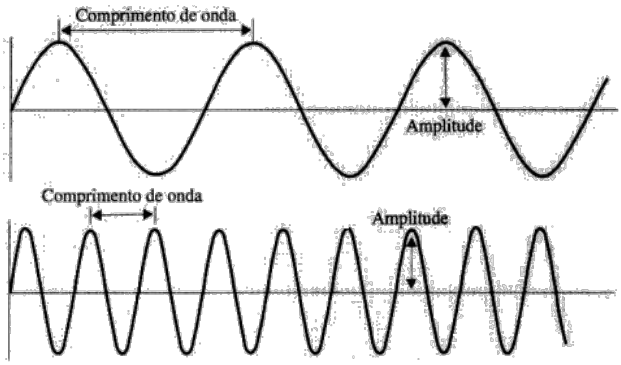


Figura 7 – Frequências de onda distintas

O período (*T*) é o inverso da frequência. É descrito pelo tempo que uma partícula leva para completar um ciclo oscilatório.

A velocidade de propagação (*c*) de uma onda é descrita como a distância percorrida pela partícula por unidade de tempo. É diretamente proporcional ao seu comprimento de onda e à frequência, dada pela equação: $c = \lambda \cdot f$.

2.5.3 Produção

A radiação ultrassônica é gerada por um transdutor, que recebe a energia elétrica do aparelho de US e a converte em energia acústica. Tal fato ocorre devido ao fenômeno piezoelétrico, que é a capacidade de materiais naturais – cristais de quartzo ou turmalina – ou

cerâmicas sintéticas de transformarem energia elétrica em energia mecânica, e vice-versa (WELLS, 1977).

O transdutor comumente utilizado na prática terapêutica é cilíndrico e feito de material cerâmico sintético, como o Titanato Zirconato de Chumbo (PZT). Ao passar a corrente elétrica, o dispositivo contrai e expande numa frequência de ressonância que determinará a frequência do aparelho. Na fisioterapia, esse parâmetro varia de 0,75 a 5,0 MHz (Ter HAAR, 1999).

2.5.4 Campo acústico e energia

O campo acústico é a região na qual é encontrada a energia ultrassônica emitida pelo transdutor. Segundo Dyson (1990), esse campo apresenta uma configuração complexa e é dividido em duas regiões: campo próximo ou Zona de Fresnel, na qual a distribuição energética é heterogênea, e o campo distante ou Zona de Fraunhofer, em que há uma distribuição de energia mais homogênea, como mostra a Figura 8.

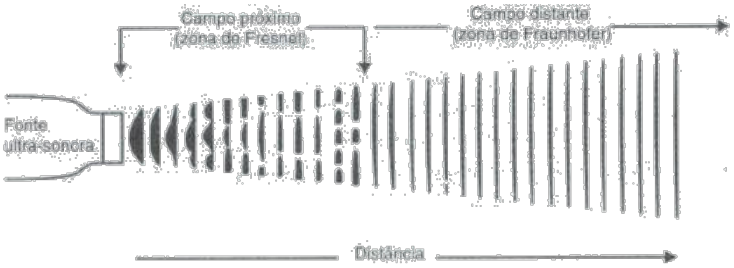


Figura 8 – Campo acústico do US

A energia total (*E*) transmitida pelo feixe de US em uma unidade de tempo é denominada Potência e é medida em Watts (*W*). Ao considerar essa quantidade de energia por unidade de área (cm^2), tem-se a Intensidade (*I*) acústica, medida em W/cm^2.

Essa potência pode ser aferida por dosímetros, que medem a força de radiação do US. A partir desse parâmetro, tem-se a intensidade em médias espacial e temporal ou SATA - Spacial-Average Temporal-Average (GRANDOLFO, 1987). Na clínica, a faixa de intensidade SATA utilizada na fisioterapia está entre 0,1 a 3,0 W/cm^2 (WATSON, 2008).

2.5.5 Propagação

Há dois modos de propagação da onda sonora, pulsado e contínuo. Seu fator determinante é a interrupção da radiação acústica. O modo contínuo é caracterizado por uma

onda de amplitude fixa, em uma frequência constante e em uma duração ilimitada. Com isso, há uma deposição constante de energia no local irradiado. O modo pulsado, por sua vez, apresenta interrupções na propagação sonora. Por isso, apresenta novos parâmetros, como a largura do pulso (tempo de duração) e a frequência de repetição do pulso, que é o numero de pulsos propagados por segundo (GRANDOLFO, 1987).

2.5.6 Impedância acústica

A impedância acústica (*Z*) é o comportamento resistente imposto pelo meio à propagação de onda. Essa resistência é proporcional à densidade do meio (ρ) e à velocidade do som (*c*) nesse meio, dada pela equação $Z = \rho.c$ (medida em Rayls).

Conforme Wells (1977), a razão da impedância entre dois meios determina o grau de reflexão e refração da onda sonora na interface, que é o elemento que propicia a ligação física entre esses meios.

2.5.7 Reflexão e refração

A onda sonora, ao se deparar com uma interface, comporta-se de duas maneiras: reflete e refrata. Quanto maior a discrepância da densidade desses meios (M1 e M2), maior será a reflexão. Nesse caso, a onda refletida (R) retorna ao meio incidente com a mesma velocidade e a onda refratada (R') penetra no segundo meio com velocidade alterada, conforme Figura 9.

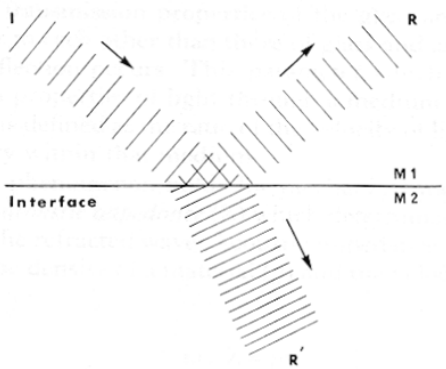


Figura 9 – Comportamento da onda incidente em um meio

2.5.8 Atenuação

A atenuação do US é caracterizada pela diminuição da energia da onda sonora ao atravessar um meio. Uma pequena parte dessa energia sofre espalhamento e a outra parte (60 a 80%) é absorvida pelo tecido, que sofre aquecimento (Ter HAAR, 1999).

2.5.9 Interação do US com o tecido biológico

Wood e Loomis[1] (1927, *apud* Ter HAAR, 2007, p.112) foram os primeiros a descobrir que o tecido biológico responde ao estímulo do US. A partir desse estudo, muitas pesquisas foram realizadas envolvendo o US como ferramenta diagnóstica, terapêutica e, mais recente, ablativa (cirúrgica).

Há basicamente dois mecanismos pelos quais o US interage com o tecido e produz mudanças biológicas: térmico e não-térmico. Ambos estão intimamente relacionados com alguns parâmetros, como a intensidade acústica e o modo de propagação. Quanto maior for o acúmulo e consequente absorção de energia, isto é, com uma intensidade alta e no modo contínuo, maior será o efeito térmico, e vice-versa.

Inicialmente, o US foi utilizado como recurso de diatermia alternativo a terapias como bolsa-quente, ondas-curtas e micro-ondas. A vantagem do aquecimento por energia acústica é a seletividade tecidual, determinada pela especificidade dos coeficientes de absorção de cada meio biológico - devido ao gradiente de concentração protéica (ZISKIN, 1987).

Por exemplo, tecidos cuja quantidade de colágeno é alta absorvem uma boa fração da energia ultrassônica e sofrem aquecimento. Com isso, alguns efeitos benéficos são observados, como aumento da extensibilidade de tendões e de cicatriz, diminuição da rigidez articular, alívio da dor, mudanças no fluxo sanguíneo e diminuição do espasmo muscular (Ter HAAR, 1999).

Para Baker, Robertson e Duck (2001) e Dyson (1982), os efeitos térmico e não-térmico estarão sempre associados, pois a interação US e tecido é tanto mecânica quanto térmica, por mais imperceptível que seja a elevação de temperatura.

No entanto, estudos apontam para uma nova abordagem terapêutica: exaltar o efeito não-térmico, responsável por estimular o reparo tecidual, como a consolidação de fraturas

---

[1] WOOD, R.W.; LOOMIS, A.L. (1927). The physical and biological effects of high frequency sound waves of great intensity. **Phil. Mag**. v. 4, p. 417-436.

ósseas (DUARTE, 1983) e a cicatrização de feridas (DYSON, 1976). O fenômeno não-térmico (mecânico) é alcançado com o uso do LIPUS (ENNIS; LEE; MENESES, 2007; Ter HAAR, 2007).

O efeito não-térmico no tecido biológico é causado por mecanismos distintos, como ondas estacionárias (sobrepostas), cavitação, microfluxo e fluxo acústico, demonstrados *in vitro* (DYSON, 1982).

Segundo Dyson e Suckling (1978), denomina-se cavitação o fenômeno de formação, crescimento e pulsação (contração e expansão intermitentes) de cavidades preenchidas por gás ou vapor (bolhas) e pode ocorrer quando o feixe ultrassônico se propaga em fluidos corporais, em células em suspensão ou em tecidos. Há dois tipos de cavitação: estável e transiente.

A cavitação estável é caracterizada pelo seu ritmo cíclico ininterrupto. As microbolhas contraem e expandem, porém permanecem intactas (não se rompem). Devido à pulsação dessas bolhas, ao seu redor forma-se uma correnteza oscilatória denominada microfluxo. Segundo Baker, Robertson e Duck (2001), esse fenômeno tem força suficiente para alterar a permeabilidade da membrana celular, favorecer a entrada de íons cálcio (Ca^{+2}) e estimular sua atividade, porém não é detectado *in vivo*, exceto em cavidades preenchidas por gás.

A cavitação transiente ocorre quando altas pressões acústicas expandem rapidamente a microbolha, a qual colapsa violentamente. Esse rompimento ocasiona uma alta liberação de energia e de radicais livres no tecido, o que aumenta bruscamente a temperatura local. Esse fenômeno ocorre apenas em altas intensidades sonoras (em torno de 10 W/cm^2) e quando aplicado no modo estacionário (WELLS, 1977).

O fluxo acústico é caracterizado por movimentos unidirecionais no fluido devido à passagem do campo sonoro. Essa força de radiação modifica a permeabilidade da membrana celular, aumenta a concentração iônica (Ca^{2+}) de seu citoplasma e, consequentemente, altera o mecanismo de ação da célula. Com isso, pode haver aumento da síntese de certas proteínas envolvidas no processo do reparo tecidual, como de colágeno (DYSON; SUCKLING, 1978).

2.6 Ultrassom e Úlceras Venosas

Desde a década de 60, pesquisas apontam evidências consideráveis sobre uso do LIPUS como recurso terapêutico na cicatrização de úlceras venosas (ANASTÁCIO, 2000; CALLAM et al., 1987; DYSON; FRANKS; SUCKLING, 1976; HILÁRIO, 1993; ROCHE; WEST, 1984; SANTANA, 2006; WEICHENTHAL et al., 1997). O primeiro estudo clínico

com úlceras foi realizado por Paul et al.[2] (1960 *apud* DYSON; FRANKS; SUCKLING, 1976, p.232) e na preparação de enxertos de pele em úlceras tróficas por Galitsky e Levina[3] (1964 *apud* DYSON; FRANKS; SUCKLING, 1976, p.232).

A aplicação do LIPUS intervém nas diversas etapas da cicatrização e tende a acelerar o reparo tecidual. Na fase inflamatória, induz macrófagos a produzirem citocinas e fatores de crescimento, como IL-1, TNF-α e FGF-β (REHER et al., 1999; YOUNG; DYSON, 1990a, 1990b), estimula a adesão leucocitária e aumenta o NO (ENNIS; LEE; MENESES, 2007).

Na fase proliferativa exerce papel fibrinolítico (WEICHENTHAL et al., 1997), aumenta a angiogênese local (REHER et al., 1999; YOUNG; DYSON, 1990b, 1990c) e incrementa a deposição da MEC (principalmente colágeno) por proliferação de fibroblastos (WEBSTER et al., 1978; ZHOU et al., 2004). Na fase de remodelamento, devido à força da radiação acústica, reorganiza as fibras colágenas e aumenta a resistência cicatricial (BYL et al., 1993).

Para dar suporte a esses achados, estudos experimentais (pré-clínicos) abordam o efeito do LIPUS aplicado no leito de feridas em animais.

Young e Dyson (1990b) utilizaram o LIPUS com frequências distintas e avaliaram quantitativamente células inflamatórias e fibroblastos pós lesão total de pele em 36 ratas *Wistar* no quinto (Grupo 1) e no sétimo (Grupo 2) dia de tratamento. Cada grupo (n = 18) foi subdividido em mais três: controle (irradiação simulada ou *sham*) e dois com irradiação efetiva do LIPUS com 0,75 e 3,0 MHz (ambos com intensidade SATA de 0,1 W/cm^2 e regime pulsado de razão *on/off* 1:4). No quinto dia, os subgrupos tratados com LIPUS apresentaram mais tecido de granulação, poucos PMNs e macrófagos (12,1% no de 0,75 MHz e 13% no de 3 MHz) e maior quantidade de fibroblastos (83,2% no de 0,75 MHz e 84% no de 3 MHz) comparados com o subgrupo controle (33% de células inflamatórias e 61,9% de fibroblastos). No sétimo dia não houve diferença significante entre os subgrupos, permitindo a afirmação de que o LIPUS atua na fase inicial do processo inflamatório da cicatrização.

Em 1994, Schafer e colaboradores estudaram o efeito do LIPUS combinado à terapia com colágeno em 4 mini-porcos Yucatan. Foram realizadas 13 lesões totais de pele em cada animal para testar 3 tratamentos tópicos (soro fisiológico, fibras colágenas derivadas de

---

[2] PAUL, B.J. et al. (1960). Use of the ultrasound in the treatment of pressure sores in patient with spinal cord injury. **Arch. Phys. Med. Rehabil**., v. 41, p. 438-440.

[3] GALITSKY, A.B.; LEVINA, S.I. (1964). Vascular origin of trophic ulcers and application of ultrasound as preoperative treatmen to plastic surgery. **Acta Chir. Plast.**, v. 6, p. 271-278.

tendão bovino e curativo oclusivo *Duoderm*™) em duas condições de aplicação do LIPUS (aparelho desligado e ligado). O LIPUS (0,75 MHz e 100 mW/cm^2) foi aplicado de forma estacionária no leito da ferida diariamente por 5 minutos durante 21 dias. A avaliação histológica da lesão no final do tratamento indicou uma maior organização celular na terapia com colágeno e uma redução do processo inflamatório na terapia ultrassônica. À parte, testes mecânicos *in vitro* mostraram que o tecido tratado com LIPUS e soro fisiológico ou colágeno apresentou-se mais resistente contra um tecido mais fraco e frágil do curativo oclusivo.

Com o mesmo intuito, Thawer e Houghton (2004) examinaram o efeito do LIPUS em feridas de camundongos diabéticos. Os pesquisadores utilizaram um aparato nebulizador para conduzir as ondas sonoras ao leito das feridas. Durante 10 dias alternados, 27 camundongos foram efetivamente irradiados com uma intensidade SATA de 0,1 W/cm^2 e 23 receberam irradiação simulada (*sham*), ambos por 1,5 minuto. Ao final do 10º dia, cada ferida foi biopsada e análises histológicas foram realizadas. Não houve diferença significante entre as áreas finais dos grupos, no entanto foi observada uma alta deposição de colágeno no grupo LIPUS (0,92 ± 0,06%) contra o grupo *sham* (0,82 ± 0,14%) e de vasos sanguíneos, 41,3 ± 23,0 contra 25,7 ± 20,3, respectivamente.

Em outro estudo, 60 ratos *Wistar* foram divididos em 2 grupos (irradiações simulada e efetiva) e tratados durante 14 dias alternadamente. Os parâmetros do LIPUS utilizado foram idênticos ao deste trabalho (1,5 MHz de frequência, 30 mW/cm^2 e regime pulsado de razão 1:4). Os animais que receberam o tratamento de LIPUS apresentaram maior área cicatrizada (141,88 ± 18,50 mm^2) do que o grupo placebo (117,38 ± 15,14 mm^2) no 14º dia, um número menor de células inflamatórias (2196,56 ± 234,93 cel/mm^2) contra (2611,68 ± 423,82 cel/mm^2) e um incremento na angiogênese já no 3º dia. Todos esses dados foram estatisticamente diferentes, com um $p < 0,05$ (MENDONÇA et al., 2006).

Podemos ainda extrapolar esses achados experimentais para estudos clínicos, que também confirmam a mesma tendência angiogênica e ativadora de fibroblatos (e consequente deposição de colágeno) do LIPUS em úlceras venosas crônicas.

Dyson, Franks e Suckling (1976) averiguaram o impacto do LIPUS em 25 úlceras venosas, as quais foram aleatoriamente separadas em 2 grupos. Os pacientes foram tratados por 2 meses: no primeiro mês, um grupo foi efetivamente irradiado e o segundo recebeu irradiação simulada; no segundo mês esse padrão se inverteu, pois quem era tratado com LIPUS recebia agora tratamento placebo, e vice-e-versa. Dessa forma foi possível tornar cada úlcera seu próprio controle. A terapia foi realizada 3 vezes por semana e cada ferida tratada de 5 a 10 minutos, dependendo de sua extensão. Em termos de parâmetros, o LIPUS foi

estabelecido com: 3 MHz de frequência, 1,0 W/cm^2 de intensidade média espacial e modo pulsado de 2:8 ms (1:4), tornando a intensidade SATA de 0,2 W/cm^2. A técnica de aplicação foi na borda da úlcera, com o transdutor em movimento. Os resultados dessa pesquisa apontaram uma diferença significante na área total das úlceras tratadas com LIPUS (66,4 ± 8,8%) logo após 4 semanas, comparada às úlceras com tratamento placebo (91,6 ± 8,9%). O mesmo efeito se repetiu no final da oitava semana dentro de cada grupo.

Em outro estudo, Roche e West (1984) estudaram o comportamento de úlceras venosas crônicas frente ao LIPUS (1 W/cm^2, 3 MHz, modo pulsado 1:4, aplicado na borda) e a sua irradiação simulada. Para tanto, 26 úlceras foram aleatoriamente separadas em 2 grupos: *sham* (n = 13) e LIPUS (n = 13), ambos tratados por um período de 5 a 10 minutos, 3 vezes por semana, durante 1 mês. As áreas das feridas foram mensuradas semanalmente para se obter a porcentagem do reparo tecidual. Ao término da cada terapia, identificaram uma diferença significante nas taxas de cicatrização entre os grupos LIPUS (35,42%) e *sham* (9,7%).

Callam et al. (1987) analisaram o uso do LIPUS em 108 úlceras venosas crônicas. Os pacientes foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: controle (n = 56), o qual foi mantida terapia convencional (soro fisiológico e bandagem); e experimental (n = 52), com o mesmo tratamento mais o uso do LIPUS – 0,5 W/cm^2 de intensidade SATA, 1 MHz de frequência, modo pulsado, aplicado ao redor da úlcera (borda) com o transdutos em movimento. As feridas foram tratadas semanalmente durante 3 meses e, a cada 4 semanas, analisadas por meio de suas imagens digitais por um programa computacional, que calculava a área da úlcera. Ao final do seguimento terapêutico, houve uma significativa diferença (p = 0,02) entre as médias das áreas de úlceras resiudual do grupo tratado experimental (9%) e do grupo controle (27%), o que provou os benefícios do LIPUS na reparo dessas feridas.

Já Weichental et al. (1997) investigaram o LIPUS de baixa frequência (30 kHz). Pacientes com úlceras venosas crônicas (n = 38) foram separados aleatoriamente em 2 grupos: um controle com terapia convencional (agentes tópicos fibrinolíticos, antibióticos/ antissépticos e curativo oclusivo) e outro com LIPUS de 100 mW/cm^2 aplicado diretamente no leito da ferida pela técnica subaquática (perna imergida em recipiente com água), a uma distância de 5 cm, por 10 minutos. À terapia ultrassônica também foi adicionada a convencional e, com isso, a proposta terapêutica foi realizada 3 vezes por semana durante 2 meses. A fim de se comparar a evolução dos grupos, as áreas ulceradas foram aferidas pelo método de planimetria após a 3ª e a 8ª semana de seguimento. Após 3 semanas já houve diferença significante (p < 0,05) na redução da área ulcerada do grupo LIPUS (75%) contra o

grupo controle (96%). Na mesma direção, foi observada diferença no final do tratamento (8ª semana) para o grupo LIPUS (57%) contra 87% do grupo controle. Eles concluiram que a aplicação do LIPUS de baixa frequência em ulceras venosas crônicas pode ser uma boa opção terapêutica.

Hilário (1993) e Anastácio (2000) também trataram úlceras venosas crônicas com LIPUS (25 mW/cm^2 de intensidade SATA; 1,5 MHz de frequência, modo pulsado 1:4). O tempo de irradiação (20 a 40 minutos) foi estabelecido de acordo com os tamanhos das feridas – pequena (< 5 cm^2), média (5 a 15 cm^2) e grande (> 15 cm^2) – 3 vezes por semana, por até 3 meses em ambas as pesquisas. Hilário (1993) observou a variação média das úlceras pequenas, médias e grandes após 8 semanas e constatou valores de 91,75%, 75,59% e 65,59%, respectivamente. Após 12 semanas de terapia, 66,6% das feridas estavam cicatrizadas. Já Anastácio (2000) elaborou estudos histopatológicos do leito ulcerado no decorrer do tratamento. Com isso, detectou casos de angiogênese e aumento do número de fibroblastos. Macroscopicamente, também obteve redução significativa das áreas ulceradas.

Na mesma linha de pesquisa, Santana (2006) aplicou esse mesmo LIPUS (intensidade SATA 30 mW/cm^2) na borda de úlceras venosas crônicas (n = 9) e comparou ao tratamento convencional diário à base de sulfadiazina de prata 1% (n = 7). Com isso, observou um reparo acelerado das úlceras tratadas com LIPUS, com aumento significante de tecido de granulação e diminuição de esfácelo/fibrina comparado àquelas tratadas convencionalmente.

A partir dessas pesquisas podemos afirmar que o LIPUS contribui para acelerar o reparo das úlceras venosas crônicas. No entanto, a maioria dos estudos utiliza protocolos com aplicação do LIPUS ao longo da borda da ferida (na pele íntegra) em detrimento de seu leito. Motivos na literatura abordam riscos de contaminação cruzada, possibilidade de causar trauma ou dor e diminuição da temperatura local quando aplicado diretamente na superfície ulcerada (POLTAWSKI; WATSON, 2007).

Por sugestão de alguns pesquisadores (JOHANNSEN; NYHOLM; KARLSMARK, 1998; MENDONÇA et al., 2006; POLTAWSKI; WATSON, 2007) e pela necessidade de entender o resultado da interação do LIPUS aplicado diretamente no leito de úlceras, assunto pouco abordado na literatura, justifica-se este trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Utilizado

3.1.1 Ultrassom

O Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos/USP forneceu o aparelho de US com as seguintes características: baixa intensidade SATA (30 mW/cm^2); com frequência de ressonância de 1,5 MHz; modo pulsado com largura de pulso 200 µs e frequência de repetição de 1 kHz; e transdutor circular com diâmetro de 22 mm e elemento piezoelétrico de PZT. Por segurança, a potência de saída do LIPUS foi aferida bimestralmente no Laboratório de Eletrônica do mesmo programa de pós-graduação (ANEXO A), conforme Figura 10.

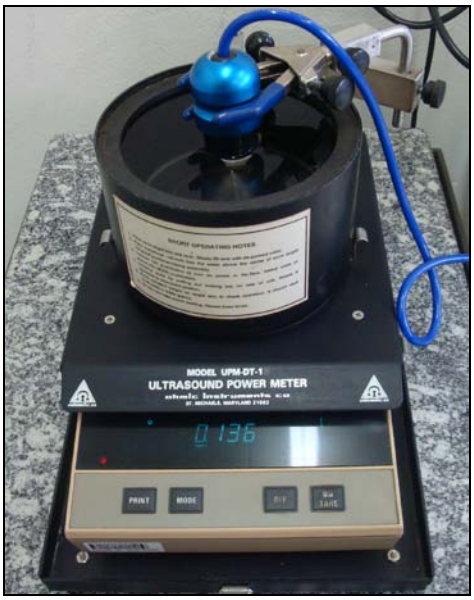


Figura 10 – Transdutor do LIPUS acoplado ao dosímetro

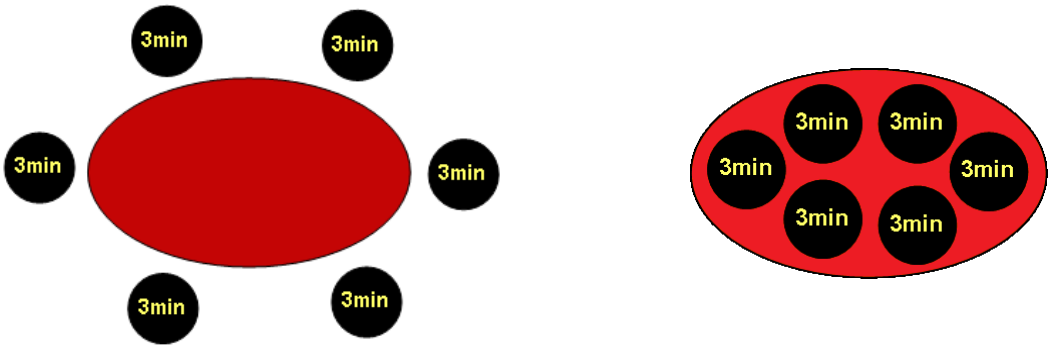
3.1.2 Técnicas de aplicação do LIPUS

Neste estudo, duas técnicas de aplicação do LIPUS foram estudadas: sobre o leito e na borda das úlceras. Para isso, o transdutor do aparelho foi devidamente preparado para evitar contaminações e proporcionar um bom acoplamento à superfície de contato.

Após assepsia com álcool 70%, o transdutor do LIPUS foi coberto por um filme de PVC a fim de promover higiene adequada na interface aparelho/paciente. Como agente acoplador, foi utilizado um gel estéril à base de água (Figura 11).

Figura 11 – Aparelho de LIPUS e seu transdutor devidamente acondicionado

A aplicação foi realizada de forma estacionária durante 3 minutos até cobrir toda extensão da úlcera, conforme o grupo de tratamento (Figura 12).



(a) Aplicação na borda (b) Aplicação no leito

Figura 12 – Técnicas de aplicação do LIPUS nas úlceras

3.2 Seleção dos Pacientes

Este estudo clínico foi realizado no Ambulatório de Úlceras da Dermatologia (AUD) do Centro Saúde Escola (CSE) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP, sob supervisão clínica dos dermatologistas Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade e Dra. Camila Teles Franco da Silveira e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CSE, de processo número 019/20089 (ANEXO B). Os pacientes participaram desta pesquisa após leitura, compreensão e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

Os pacientes com úlceras venosas crônicas foram selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- **CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**
  - → Diagnóstico de úlcera venosa;
  - → úlcera maior ou igual a 1,0 cm^2;
  - → úlcera presente por, no mínimo, seis semanas;
  - → úlceras localizadas nas extremidades inferiores;
  - → úlceras que estendam através da derme e tecidos subcutâneos, porém sem exposição de músculos, tendão, osso ou cápsula articular;
  - → pacientes que apresentem sinais clínicos clássicos de insuficiência venosa como edema, varicosidades, lipodermatoesclerose, eczema e elefantíase nostra;
  - → pacientes que possuam Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) controlada, ou seja, Pressão Arterial Diastólica (PAD) < 95 mmHg.
- **CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**
  - → Evidência de celulite, osteomielite ou gangrena em algum lugar da extremidade afetada;
  - → presença de uma ou mais condições clínicas, incluindo doença renal, hepática, hematológica, neurológica ou imunológica, as quais constituem uma variável que possa alterar o estudo, na opinião dos investigadores principais;
  - → presença de doenças malignas ou carcinomas não remissivos por mais de 5 anos;
  - → uso de corticosteróide oral ou parenteral, imunossupressores ou agentes citotóxicos durante o tratamento;
  - → infecção conhecida em adjunto a HIV ou presença de AIDS.

Após a seleção, os pacientes foram submetidos ao protocolo clínico contendo: identificação pessoal, doenças associadas, medicamentos em uso, exame da ferida (medidas, características teciduais e recidivas), verificação de pulsos arteriais e, quando necessário, exame Doppler (APÊNDICE B).

3.2.1 Padronização dos grupos

Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos de tratamento, de acordo com a ordem de chegada, a saber: Grupo Borda (GB), aplicação do LIPUS na borda da úlcera; Grupo Leito (GL), aplicação do LIPUS no leito da úlcera; Grupo Sulfadiazina (GS), tratamento convencional com curativo tópico diário à base de sulfadiazina de prata 1% em creme.

3.3 Tratamento

3.3.1 Padronização dos atendimentos

Inicialmente, as úlceras foram lavadas com soro fisiológico 0,9% utilizando-se de instrumental e gazes estéreis. Logo após, as úlceras foram levemente secas com gaze limpa para absorção do excesso de umidade para o início do tratamento conforme respectivo grupo.

Ao final, as úlceras do GS receberam curativo tópico com sulfadiazina de prata 1% em creme, gazes e enfaixamento. As úlceras tratadas com LIPUS receberam subsequente curativo oclusivo de gazes umedecidas apenas com soro fisiológico 0,9% e posterior enfaixamento.

Os procedimentos clínicos foram realizados 3 vezes por semana no CSE, em dias alternados, durante 90 dias. Os pacientes ou responsáveis foram instruídos quanto aos curativos diários realizados em domicílio.

3.4 Avaliação Clínico-Fotográfica

A captura das imagens das úlceras foi realizada quinzenalmente com uma máquina fotográfica digital Sony® DSC P93 com resolução de 5.0 megapixels, fixada por um suporte metálico com 30 cm de comprimento (Figura 13).

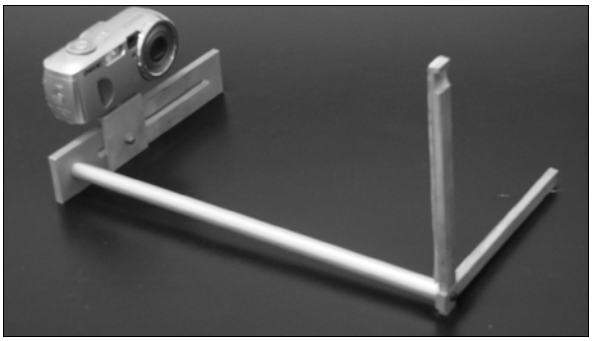


Figura 13 – Suporte metálico e máquina fotográfica

As fotografias foram realizadas sem *zoom* nem *flash*, apenas com a iluminação ambiente da sala, a qual dispunha de duas janelas que permitiam a entrada da luz solar. As fotos foram colhidas e armazenadas para posterior avaliação.

3.5 Estudo Histopatológico

Apenas nas úlceras do GL foram realizadas as biópsias para análise histológica do tecido ulcerado a fim de detectar possíveis alterações teciduais durante o tratamento.

Previamente, os pacientes foram esclarecidos em relação à técnica e tiveram o livre-arbítrio para participar de tal procedimento. As biópsias foram executadas pela dermatologista do AUD em duas etapas: 1º dia (pré-tratamento) e após 45 dias. O procedimento da retirada dos fragmentos ulcerados será descrito a seguir:

Inicialmente, a úlcera foi lavada com soro fisiológico 0,9% e gazes. Logo após, aplicou-se anestesia local (Xilocaína 2%) para a retirada de dois fragmentos com punch de 6 mm, da borda e do centro da úlcera.

Logo após, as biópsias foram armazenadas em solução de formaldeído tamponado a 10% e enviadas ao Laboratório de Patologia da Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMRP/USP. Conforme protocolo estabelecido no laboratório, banhos seriados em soluções de álcool, xilol e benzol foram realizados para posterior inclusão dos fragmentos em blocos de parafina. A partir desses blocos, foram realizados cortes de 4 µm para que as lâminas histológicas fossem devidamente preparadas e coradas com: hematoxilina-eosina (HE), para contagem de fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos; e Tricrômio de Gomori (TG), para quantificação de colágeno.

As imagens histológicas dessas lâminas foram capturadas pela câmera *Leica*® DFC 280 embutida no microscópio óptico *Leica*® DM 4000B e processadas pelo *software LAS - Leica*® *Application Suite* - versão 3.2.0 (*Leica*® *Microsystems* - Wetzlar, Alemanha) no Laboratório da Dermatologia do HC da FMRP/USP. Com aumento de 400 vezes, foram obtidos 10 campos (264 x 211 µm) aleatórios de cada lâmina para posterior quantificação no *ImageJ*.

3.6 Análise de Imagem

Para análise das imagens macroscópicas (úlceras) e microscópicas (lâminas histológicas) foi utilizado o programa *ImageJ* versão 1.36 (*Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*). Esse *software* processa e analisa imagens em computadores que possuam Java e pode ser obtido gratuitamente em http://rsb.info.nih.gov/ij.

3.6.1 Análise clínico-fotográfica

- **DELIMITAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA TOTAL DA ÚLCERA**

Inicialmente, a fim de padronizar sua escala, cada imagem foi calibrada pela ferramenta "*Analyze/Set Scale*", a qual permitiu ajustar a medida em pixels/cm por meio da régua contida na foto. Após essa padronização, selecionou-se o *plugin* "*Polygon*" para a delimitação da borda da úlcera com o mouse (Figura 14), salva com extensão ROI. Logo após o procedimento, o *software* calculou automaticamente a área em cm^2 pelo comando <CTRL+M>. Com isso, os resultados foram tabulados para posterior análise.

Figura 14 – Segmentação semiautomática da área ulcerada

- **DELIMITAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ÁREAS DE GRANULAÇÃO E DE ESFÁCELO**

A delimitação das áreas dos tecidos de granulação e de fibrina/esfácelo foi realizada pelo *plugin* "*Threshold Colour*". Para tanto, foi selecionada a cor de interesse, sendo vermelha para o tecido de granulação e amarela para esfácelo e/ou fibrina. Ao definir o intervalo da cor de interesse (Figura 15), a região tornou-se preta como mostra a Figura 16. Assim, a área delimitada com extensão ROI foi aberta e pelo comando <CTRL+M> calculados a área em cm^2 e o percentual da área analisada.

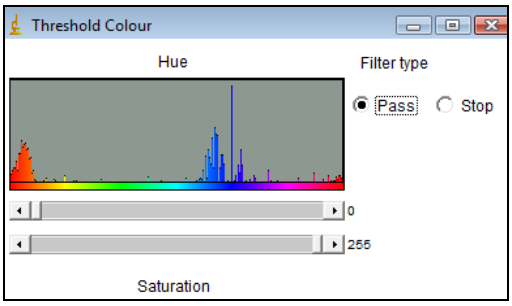


Figura 15 – Definição da cor de interesse pela barra de rolagem

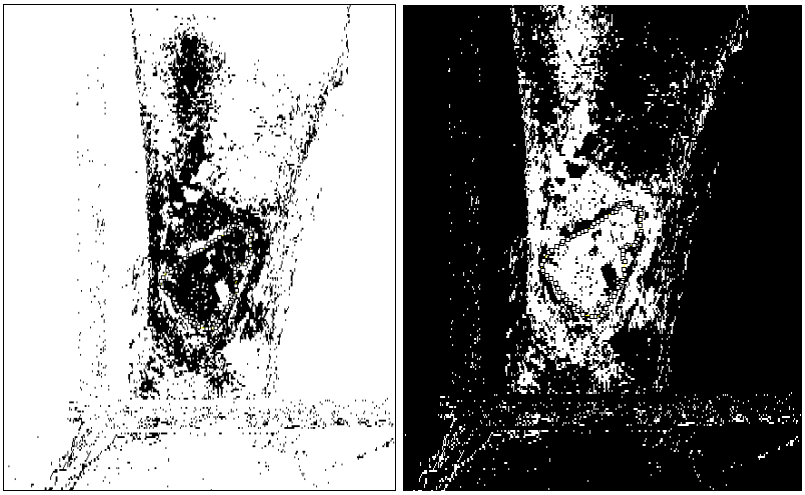


Figura 16 – Seleção (em preto) das áreas do tecido de granulação e de esfácelo, respectivamente

- **CÁLCULO DO ICU E DA REG**

A partir da quantificação das áreas totais, foram calculados quinzenalmente os Índices de Cicatrização das Úlceras (ICUs) dos grupos de forma normalizada, conforme a equação abaixo:

$$ICU = \frac{Ai - Af}{Ai} \qquad (1)$$

sendo:

A_i: área inicial; e

A_f: área final (no dia da avaliação).

Assim, o ICU representa o resultado do seguimento terapêutico pela área da úlcera tendo como base a re-epitelização, com a seguinte interpretação:

ICU = 0: área da úlcera inalterada;

ICU < 0: aumento da área ulcerada;

ICU > 0: diminuição da área ulcerada; e

ICU = 1: úlcera cicatrizada.

A partir da quantificação das áreas do tecido de granulação ($A_{granulação}$) e do esfacelo ($A_{esfácelo}$), foi calculada a Relação Esfácelo/Granulação (REG), dada pela equação:

$$REG = \frac{A_{esfácelo}}{A_{granulação}} \tag{2}$$

em que:

$A_{esfácelo}$: área do tecido desvitalizado (cor amarela); e

$A_{granulação}$: área do tecido viável (cor vermelha).

A Relação Esfácelo/Granulação (REG) permite observar o dinamismo das modificações teciduais no leito da úlcera durante o seguimento terapêutico, sendo interpretado da seguinte forma:

REG = 0: úlcera cicatrizada ou contendo apenas tecido de granulação;

REG < 1: predomínio do tecido de granulação;

REG = 1: quantidades iguais de esfácelo e granulação; e

REG > 1: predomínio de esfácelo.

3.6.2 Análise microscópica

- **HISTOMORFOMETRIA DAS CÉLULAS E VASOS SANGUÍNEOS**

Por meio das imagens histológicas coradas com HE obtidas pelo *software* LAS, foi realizada a contagem do número de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos do tecido ulcerado a partir do *ImageJ*.

Após aberto o campo histológico a ser analisado, foi selecionado o *plugin* "*Cell Counter*" para quantificar as células e vasos sanguíneos, selecionados pelo avaliador manualmente com auxílio do mouse. Esse *plugin* marca e quantifica diferentes áreas de interesse, sendo que o *software* automaticamente faz a contagem das marcações, fornecendo o total de cada tipo de célula. Desta forma, foi estabelecido o tipo 1 para fibroblastos, o tipo 2 para células inflamatórias e o tipo 3 para vasos sanguíneos, como mostra a Figura 17.

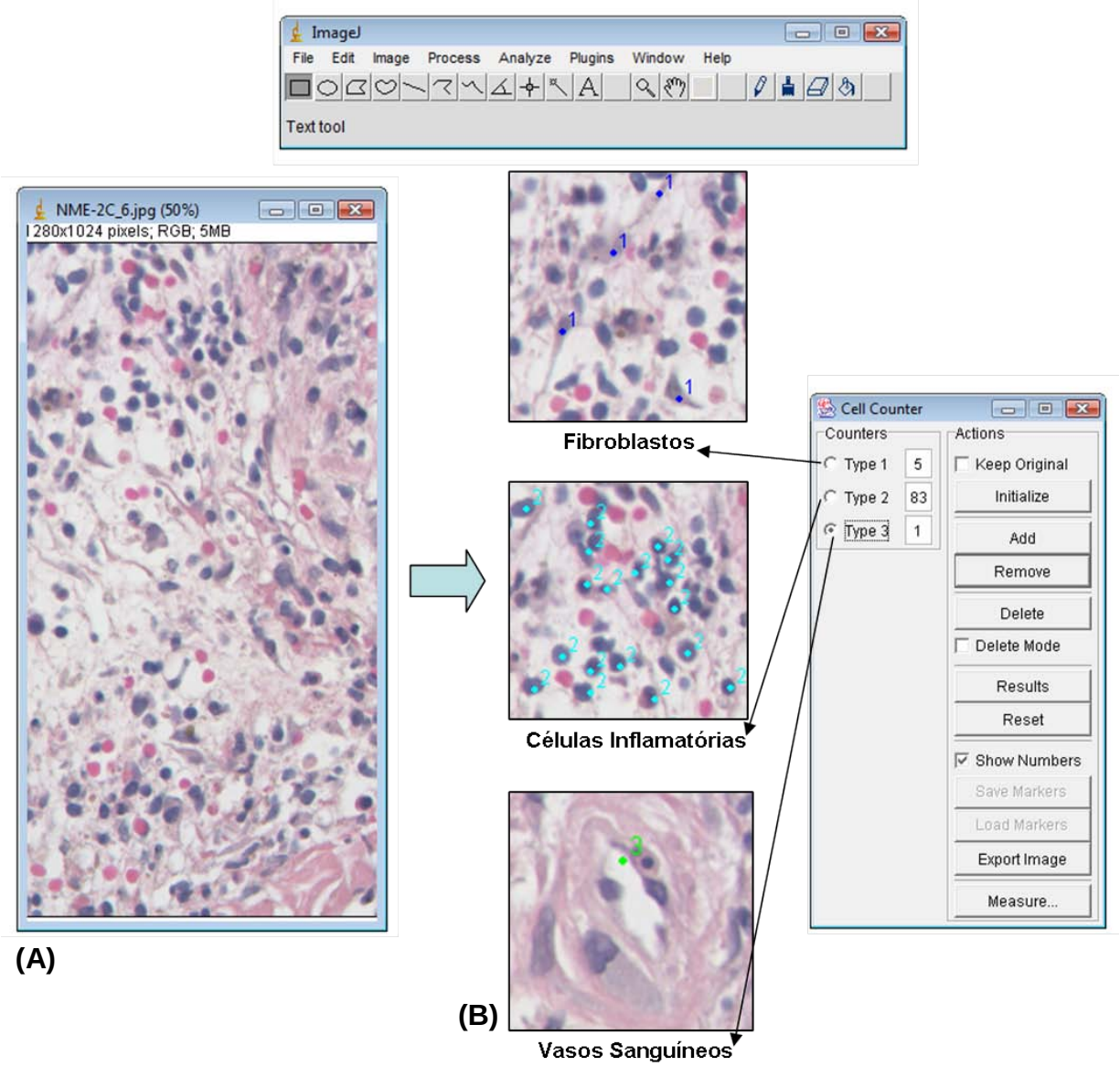


Figura 17 – Procedimento para análise das lâminas coradas com HE (400x) utilizando o *Plugin* "*Cell Counter*" do *ImageJ*. Aquisição da imagem (A) e respectivas contagens (B)

- **QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO**

A partir das lâminas coradas com TG, foi obtida a área percentual do colágeno contido no campo analisado. Para isso, o *plugin* "*Colour Deconvolution*" foi utilizado, como ilustra a Figura 18.

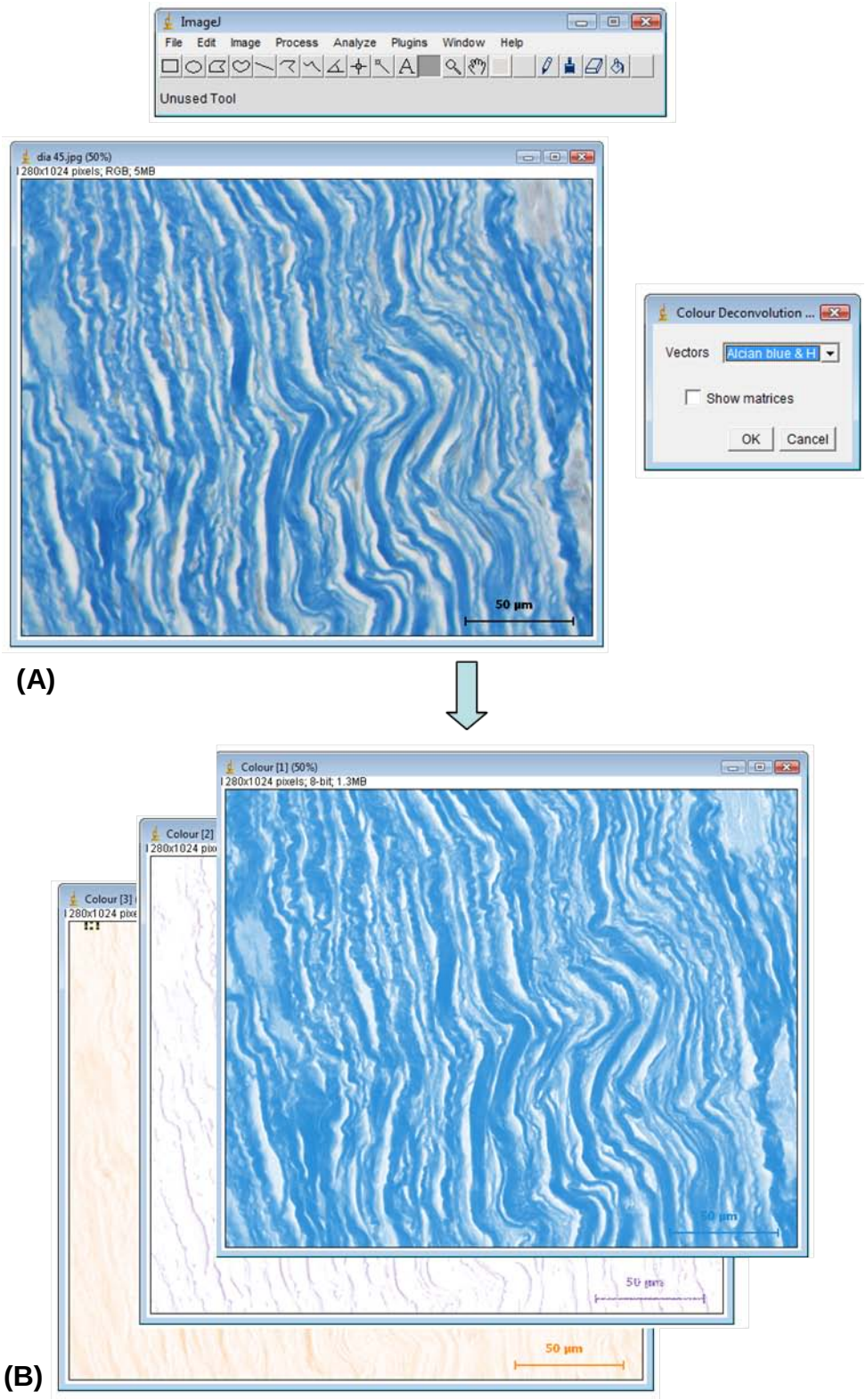


Figura 18 – Procedimento para análise do colágeno utilizando o *Plugin* "*Colour Deconvolution*" do *ImageJ* (400x). Aquisição da imagem (A) e sua decomposição em três cores (B)

3.7 Análise dos Resultados

O estudo estatístico foi assessorado pelo Centro de Métodos Quantitativos (CEMEQ) da FMRP/USP. Inicialmente, a partir dos dados obtidos foi realizada uma estatística descritiva a fim de sintetizar valores de mesma natureza em tabelas, gráficos e outras descrições. Para análise do comportamento das variáveis, foram utilizados dois testes: modelo de regressão linear com efeitos mistos (aleatórios e fixos) para análise de ICU, REG e colágeno; e modelo de Poisson com efeito aleatório para análise de fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos, por se tratarem de contagem. Para tanto, os testes foram estabelecidos com 95% de potência ($p < 0,05$) a fim de verificar possíveis diferenças significantes entre os grupos.

4 RESULTADOS

Os dados apresentados neste capítulo condizem com a observação de 24 úlceras venosas crônicas tratadas no AUD do CSE da FMRP/USP, dispostas em 3 grupos: GB (N = 9), GL (N = 8) e GS (N = 7). Desse total, 16 úlceras (GB e GS) foram previamente estudadas em outro trabalho realizado no mesmo local, sob as mesmas condições (SANTANA, 2006).

4.1 Análise Descritiva

4.1.1 Dados amostrais

As características clínicas obtidas durante a primeira avaliação dos pacientes foram agrupadas e sintetizadas na Tabela 1.

Tabela 1– Dados clínico-demográficos dos grupos

Características		***Grupo Borda (n=9)***	***Grupo Leito (n=8)***	***Grupo Sulfadiazina (n=7)***
Número de Pacientes		8	8	5
Sexo (feminino: masculino)		3:5	8:0	1:4
Cor (branca: não branca)		5:3	7:1	2:3
Idade (anos)	Média	63	73	76
	Mínima	36	60	59
	Máxima	78	89	81

4.1.2 Características das úlceras

A Tabela 2 descreve as características das úlceras observadas no início do seguimento terapêutico dos grupos Borda, Leito e Sulfadiazina, respectivamente.

Tabela 2 – Características das úlceras dos grupos

Características das Úlceras		*Grupo Borda (n=9)*	*Grupo Leito (n=8)*	*Grupo Sulfadiazina (n=7)*
Número de Úlceras		9	8	7
Classificação por Tamanho	Pequena (< 5 cm^2)	3	1	1
	Média (5-10 cm^2)	2	3	2
	Grande (> 10 cm^2)	4	4	4
História Pregressa de Úlceras (sim: não)		6:3	6:2	6:1
Tempo de Duração (média ± DP – meses)		68,89 ± 70,56	141,50 ± 154,86	53,29 ± 24,49
Áreas Inicias (média ± DP – cm^2)		13,49 ± 14,41	15,61 ± 13,36	24,06 ± 30,10

4.1.3 Análise das imagens

- **ANÁLISE CLÍNICO-FOTOGRÁFICA**

Em relação à análise qualitativa, as imagens das úlceras obtidas nos 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico dos grupos Borda, Leito e Sulfadiazina estão demonstradas nos Apêndices C, D e E, respectivamente.

Para exemplificar, a Figura 19 aponta o efeito do LIPUS na úlcera venosa. Pode-se observar uma acentuada diminuição na área da ferida, a qual apresenta uma importante re-epitelização já no 30º dia.

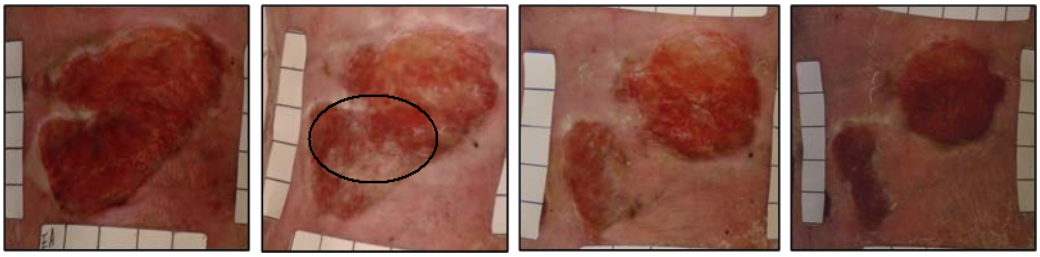


Figura 19 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 8 do GB nos 1º, 30º, 60º e 90º dias

Da mesma maneira, a úlcera 1 do GL apresentou um bom prognóstico, com presença de tecido de granulação já no 30º dia, comparado com o quadro clínico inicial, em que o esfácelo era predominante (Figura 20).

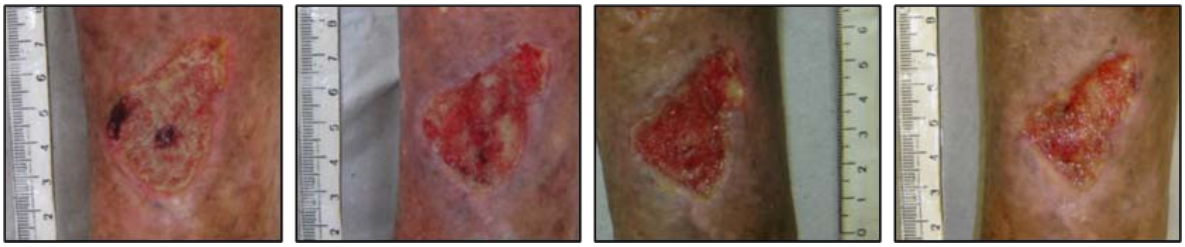


Figura 20 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 1 do GL nos 1º, 30º, 60º e 90º dias

Ainda no GL, o esfácelo, tecido desvitalizado e impróprio para o processo de cicatrização, foi logo substituído por um tecido sadio e viável (granulação), observado nas Figuras 21 e 22.

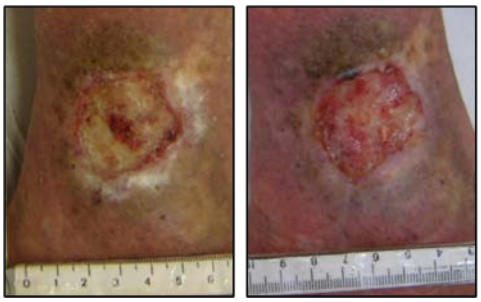


Figura 21 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 2 do GL no início e após 30 dias

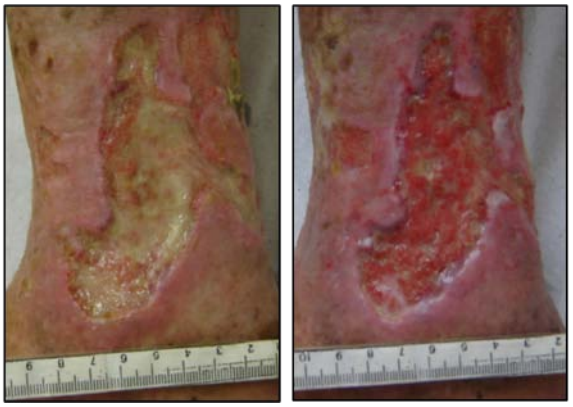


Figura 22 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 4 do GL nos 30º e 60º dias

Já no GS, o dinamismo tecidual não se assemelha ao padrão dos outros grupos tratados por LIPUS. Nele encontram-se úlceras indolentes, com uma evolução lenta e prejudicada pela presença de muito tecido desvitalizado, vistas nas Figuras 23 e 24. Nota-se que as bordas dessas feridas encontram-se maceradas (tecido esbranquiçado pelo excesso de exsudato) e edemaciadas, o que caracteriza uma inflamação crônica.

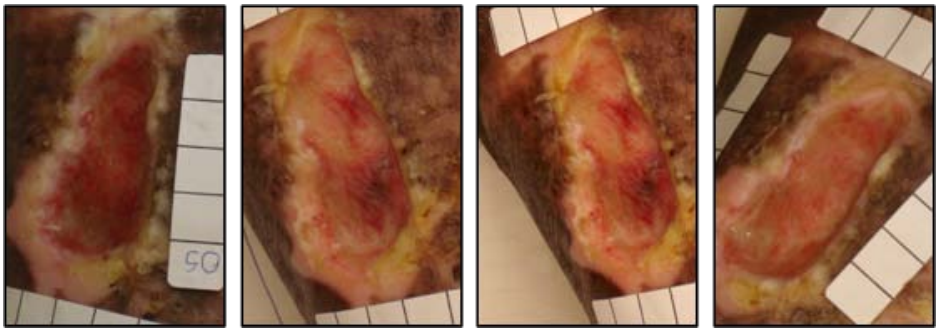


Figura 23 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 2 do GS nos 1º, 30º, 60º e 90º dias

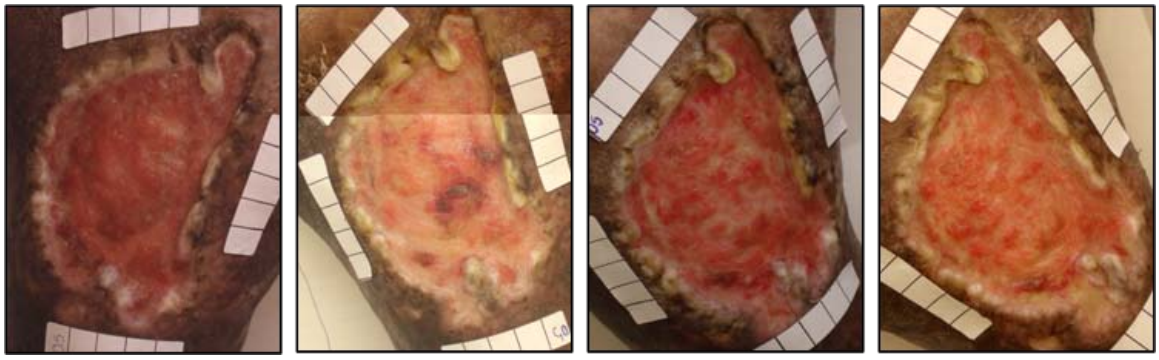


Figura 24 – Seguimento clínico-fotográfico da úlcera 4 do GS nos 1º, 30º, 60º e 90º dias

Dados como média, DP, mínimo, mediana e máximo dos ICUs e das REGs das úlceras dos grupos estão representados no Anexo C. A Tabela 3 sintetiza os ICUs dos grupos apenas nos 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico:

Tabela 3 – ICUs dos grupos

Grupos	***ICU (média ± DP)***		
	30º dia	***60º dia***	***90º dia***
Borda	-0,21 ± 0,43	-0,04 ± 0,68	0,25 ± 0,53
Leito	-0,01 ± 0,34	0,09 ± 0,39	0,19 ± 0,40
Sulfadiazina	-0,13 ± 0,47	0,03 ± 0,45	-0,03 ± 0,49

A Tabela 4 reúne as REGs dos grupos nos 1º, 45º e 90º dias de seguimento clínico:

Tabela 4 – REGs dos grupos

Grupos	***REG (média ± DP)***		
	1º dia	***45º dia***	***90º dia***
Borda	1,42 ± 2,63	0,55 ± 0,55	0,10 ± 0,9
Leito	1,66 ± 2,63	0,72 ± 0,70	0,96 ± 1,17
Sulfadiazina	0,75 ± 0,67	2,99 ± 1,61	1,28 ± 0,29

- **MICROSCÓPICA PARA O GRUPO LEITO**

Qualitativamente, o número de fibroblastos aumentou do início ao 45º dia de seguimento terapêutico com LIPUS, tanto no centro (Figura 25) quanto na borda da úlcera (Figura 26).

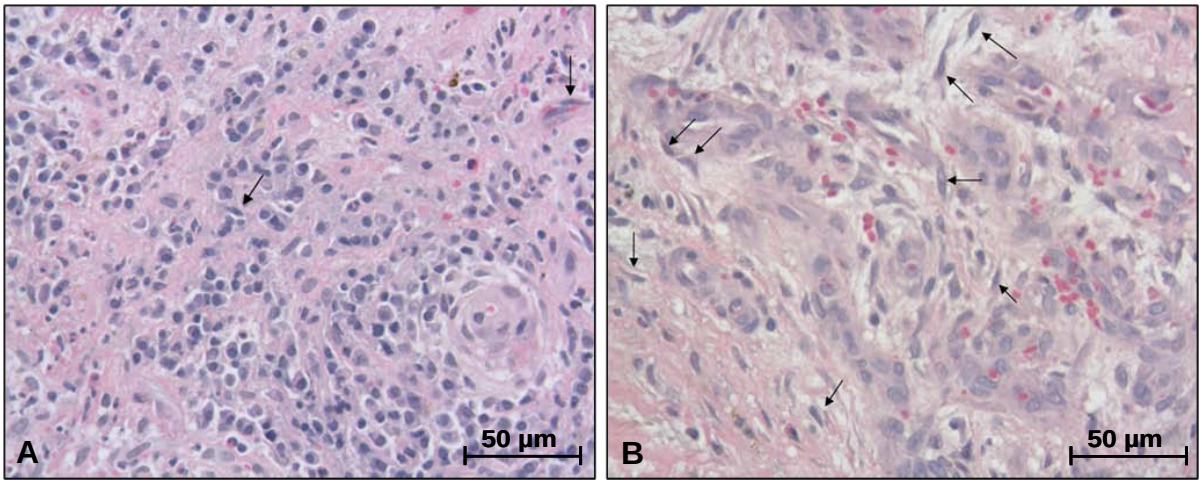


Figura 25 – Imagem histopatológica (HE) do centro da úlcera com infiltrado inflamatório associado a fibroblastos no 1º dia (A) e aumento do número de fibroblastos em relação às células inflamatórias no 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)]

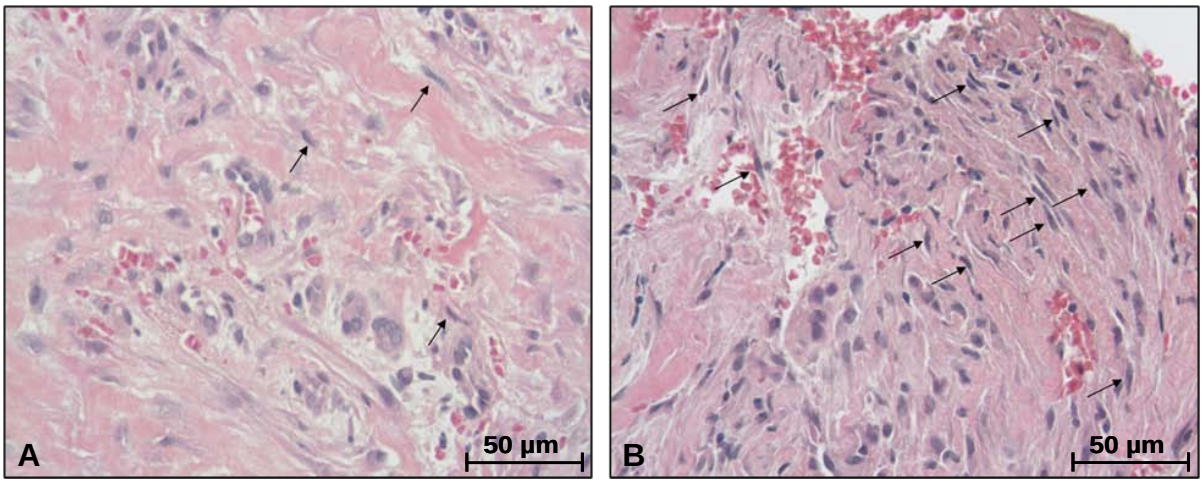


Figura 26 – Imagem histopatológica (HE) da borda da úlcera com menor quantidade de fibroblastos no 1º dia (A), comparado ao 45º dia (B). [barra de escala de 50 µm (400x)]

Em relação ao número de células inflamatórias, houve um aumento do infiltrado na borda da úlcera no 45º dia (Figura 27) concomitante a uma diminuição em seu centro (Figura 28).

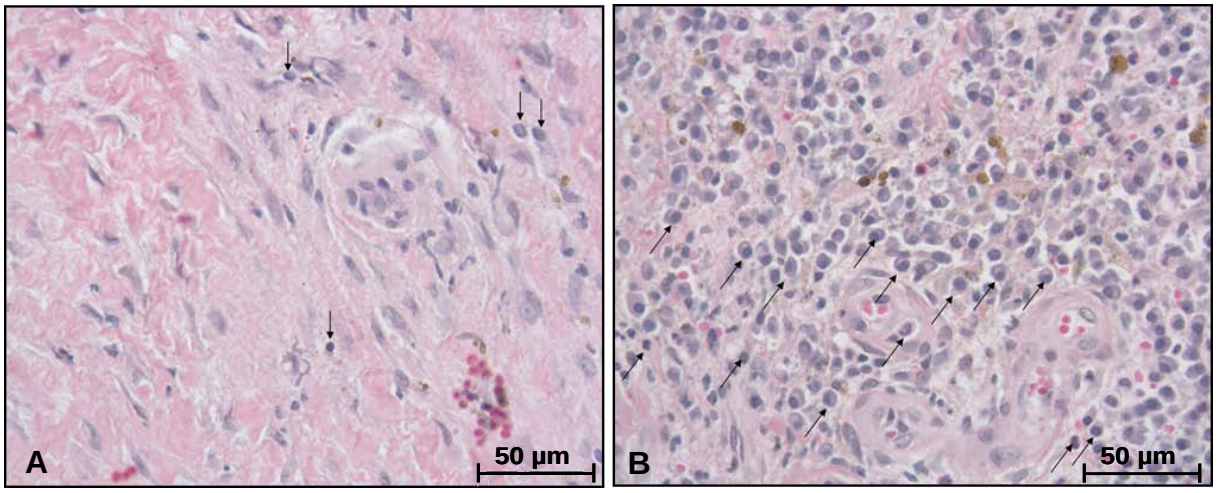


Figura 27 – Imagem histopatológica (HE) da borda da úlcera com pouco infiltrado inflamatório no 1º dia (A), comparado ao 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)]

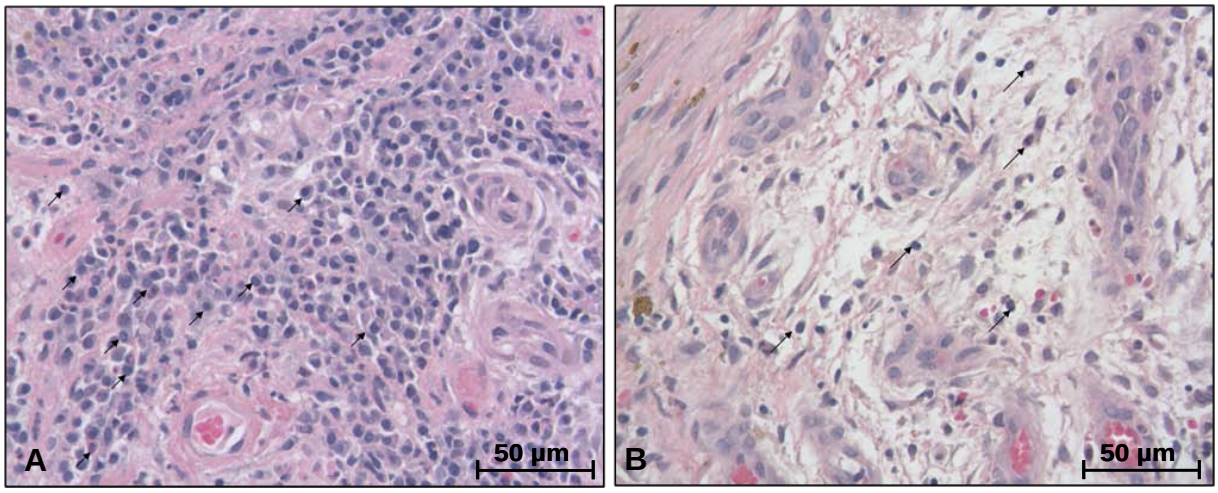


Figura 28 – Imagem histopatológica (HE) do centro da úlcera com grande quantidade de células inflamatórias no 1º dia (A), comparado ao 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)]

Houve um importante incremento no número de vasos sanguíneos após 45 dias de seguimento terapêutico, principalmente na borda da úlcera (Figura 29).

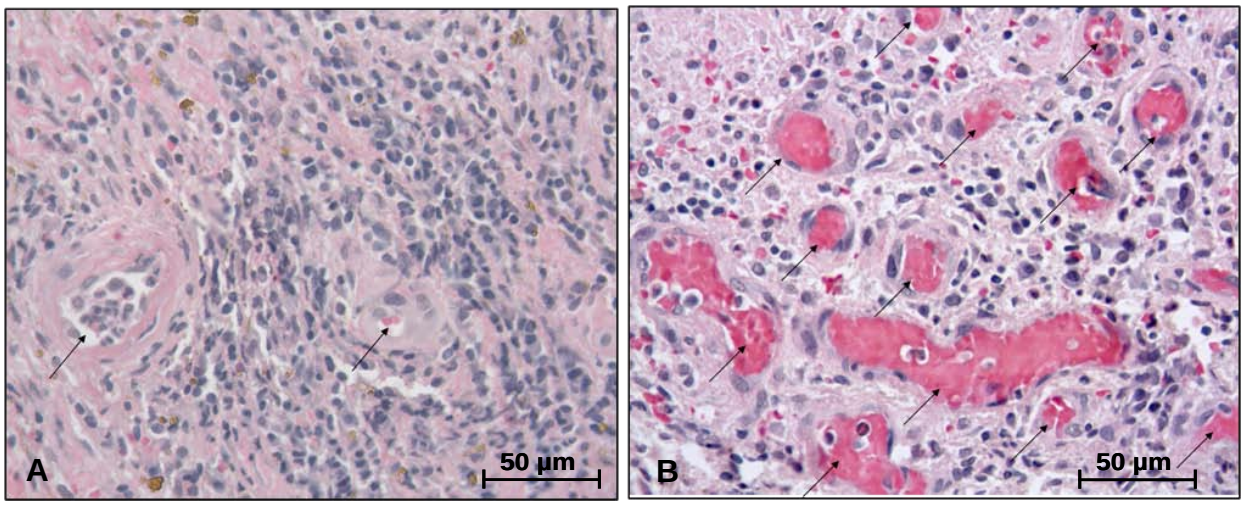


Figura 29 – Imagem histopatológica (HE) da borda da úlcera com pequena quantidade de vasos sanguíneos no 1º dia (A), comparado ao 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)]

Como ilustra a Figura 30, o colágeno no 45º dia apresentou-se mais adelgaçado, porém reorganizado, disposto paralelamente, em relação ao colágeno presente antes de iniciar o tratamento. Essa característica predominou tanto na borda quanto no centro das úlceras.

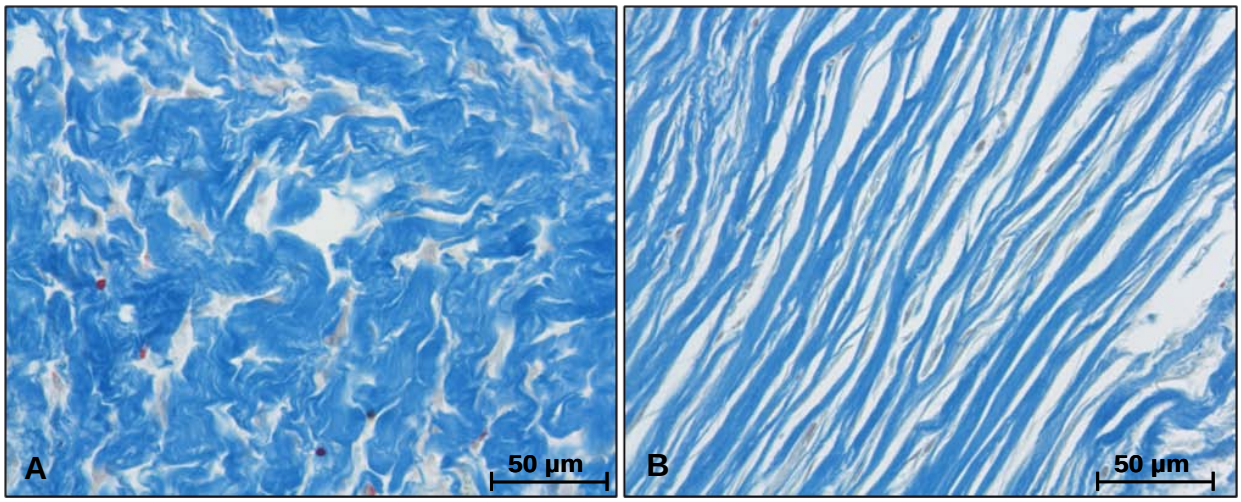


Figura 30 – Imagem histopatológica (TG) do colágeno menos reorganizado no 1º dia (A) em relação ao 45º dia (B) [barra de escala de 50 µm (400x)]

Dados como média, DP, mínimo, mediana e máximo das variáveis Fibroblasto, Células Inflamatórias, Vasos Sanguíneos e Colágeno do GL estão reunidos no Anexo D.

4.2 Análise Estatística

A partir dos dados obtidos dos grupos, isto é, ICU e REG; e fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e colágeno do GL, foi feito um estudo exploratório dos resultados a fim de analisar o comportamento dessas variáveis (ANEXOS E – J). Para tanto, os testes aplicados foram estabelecidos com 95% de potência ($p < 0,05$) para verificar possíveis diferenças significantes entre os grupos.

O ICU foi analisado pelo Modelo de Efeitos Mistos e a representação de sua amostragem está ilustrada na Figura 31. No 30º dia observou-se um ICU estatisticamente maior no GL, comparado ao GB. Da mesma forma, manteve-se maior ($p = 0,01$) no GL no 60º dia. Embora não houver diferença estatística no 90º dia, os valores dos ICUs dos Grupos Borda e Leito aumentaram do início ao fim do tratamento, o que representou um prognóstico favorável às úlceras.

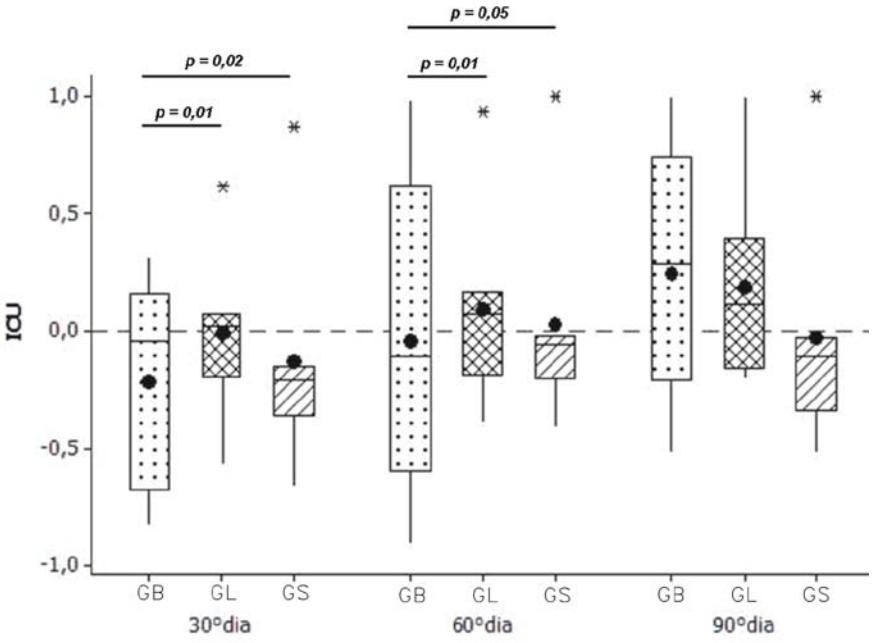


Figura 31 – Box-plot para a variável ICU dos grupos nos 30º, 60º e 90º dias

A REG também foi explorada pelo Modelo de Efeitos Mistos e sua distribuição está ilustrada na Figura 32. Estatisticamente, não houve diferença entre os três grupos, salvo no 45º dia, em que o GS apresentou altos valores ($p = 0,01$) comparados aos outros grupos (GB e GL). Apesar de não significante, houve uma queda nos valores da REG para os grupos tratados com LIPUS no decorrer do seguimento clínico, concomitante ao aumento dos valores no GS.

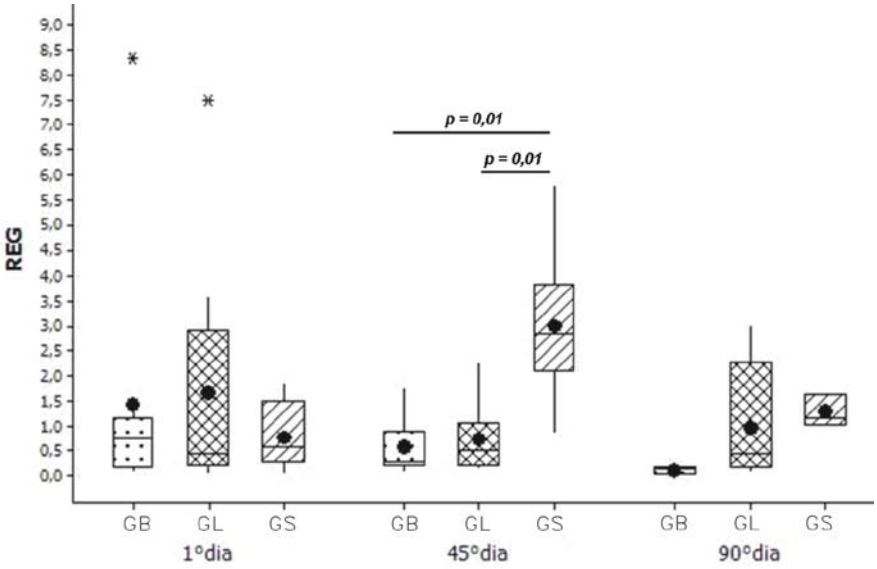


Figura 32 – Box-plot para a variável REG dos grupos nos 1º, 45º e 90º dias

A variável Fibroblastos, por se tratar de contagem, foi averiguada pelo Modelo de Poisson. O número de fibroblastos aumentou significantemente do 1º ao 45º dia de seguimento terapêutico com LIPUS, tanto no centro quanto na borda da úlcera (Figura 33).

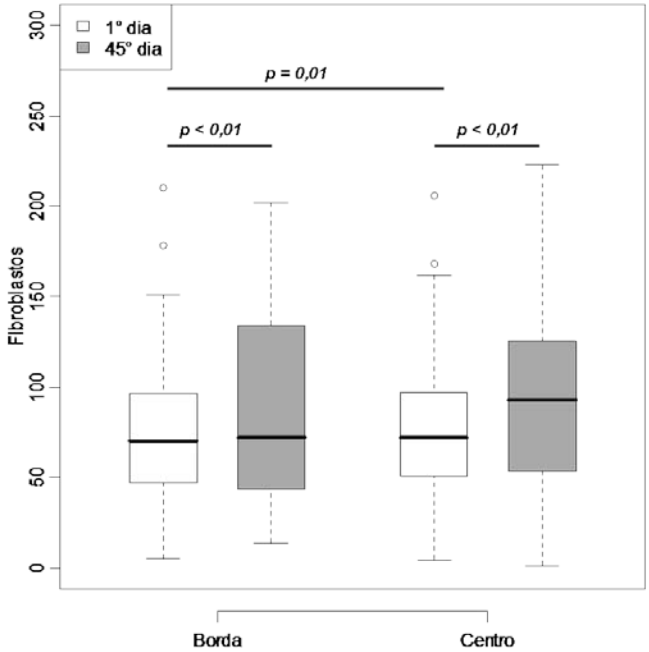


Figura 33 – Box-plot para a variável Fibroblastos por local e tempo

A variável Células Inflamatórias também foi analisada pelo Modelo de Poisson. No 45º dia, a quantidade dessas células apresentou-se estatisticamente maior na borda da úlcera enquanto ocorreu uma diminuição em seu centro, segundo a Figura 34.

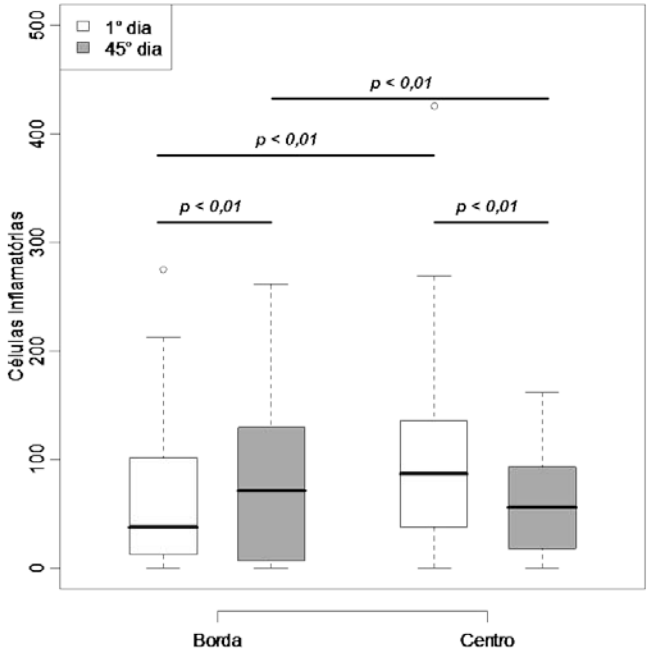


Figura 34 – Box-plot para a variável Células Inflamatórias por local e tempo

A variável Vasos Sanguíneos, explorada pelo Modelo de Poisson, teve um aumento significante no 45º dia de seguimento terapêutico na borda da úlcera, de acordo com a Figura 35.

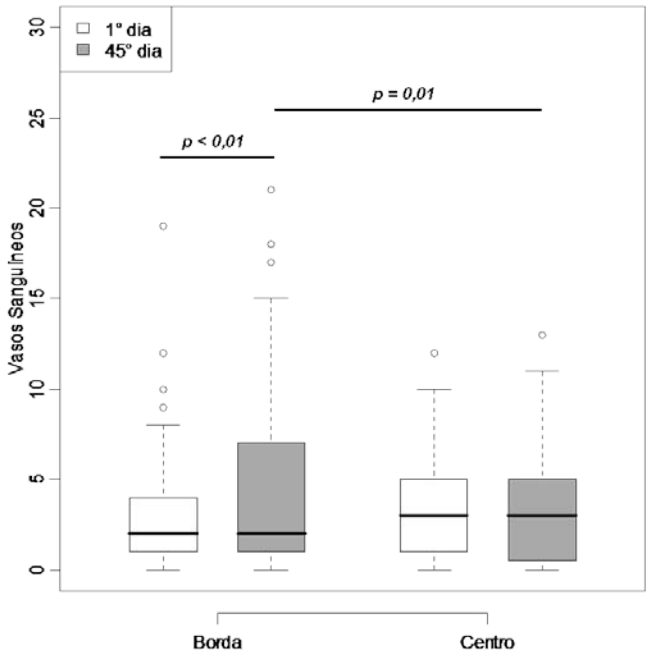


Figura 35 – Box-plot para a variável Vasos Sanguíneos por local e tempo

A variável Colágeno foi averiguada pelo Modelo de Efeitos Mistos. Em ambos os locais da úlcera, a porcentagem de área contendo colágeno diminui significantemente no 45º dia, como mostra a Figura 36.

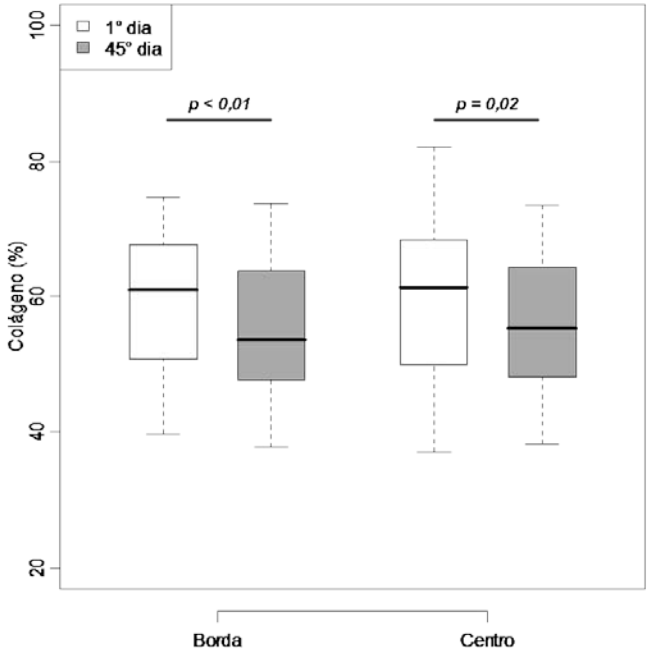


Figura 36 – Box-plot para a variável Colágeno por local e tempo

5 DISCUSSÃO

Este trabalho foi elaborado a fim de comparar a eficácia de duas técnicas de aplicação do LIPUS em úlceras venosas crônicas, bem como seu papel na dinâmica da cicatrização, tendo em vista a escassa abordagem pela literatura a respeito de sua atuação diretamente no leito da ferida.

Segundo Poltawski e Watson (2007), o fato de a irradiação ultrassônica ter sido restrita à aplicação na borda da úlcera ocorria devido à cautela com o tecido ulcerado, o qual poderia sofrer traumas (THAWER; HOUGHTON, 2004) ou disparar um estímulo doloroso em contato com o transdutor. Apregoava-se ainda que poderia haver risco de contaminação, o que danificaria o processo de cicatrização (WERDIN; TENENHAUS; RENNEKAMPFF, 2008).

Contrariamente, alguns autores afirmavam a necessidade de administrar a energia acústica sobre o leito ulcerado. Em um estudo *in vitro* para verificar a efetividade de transmissão das ondas sonoras através de curativos comumente utilizados em úlceras, Poltawski e Watson (2007) sugeriram a utilização do LIPUS diretamente no leito ulcerado, pois suspeitavam que a irradiação sonora aplicada na borda não alcançaria suficientemente o tecido danificado, comprometendo o mecanismo da cicatrização. Já Mendonça et al. (2006) verificaram o dinamismo do reparo de lesões cutâneas de ratos tratadas com LIPUS e confirmaram o efeito benéfico da aplicação direta. Por isso a necessidade de novos estudos para avaliar a real eficácia dessa técnica, comparando-a com a técnica tradicional de aplicação do LIPUS à margem da ferida.

Para tanto, o trabalho comparou o efeito do LIPUS aplicado em locais distintos (borda e leito) à terapia convencional de úlceras venosas crônicas, as quais foram avaliadas clinicamente por registros fotográficos realizados quinzenalmente. As fotos obtidas foram analisadas pelo *software ImageJ*, importante ferramenta laboratorial para processamento de imagens, conforme estabelecido e proposto por Caetano et al. (2009), Collins (2007) e Santana (2006).

A partir desses dados, a evolução das úlceras foi averiguada tanto pela velocidade de re-epitelização (mensurada pelo ICU), quanto pelo dinamismo tecidual, obtido pelas modificações teciduais durante o seguimento (REG). Essas análises permitiram acompanhar a trajetória da cicatrização, fornecendo informações relevantes a respeito do prognóstico da úlcera (ROBSON et al., 2000).

Em média, houve uma diminuição do ICU do grupo de úlceras que receberam radiação ultrassônica na borda (GB) no início do tratamento até o 30º dia, período no qual as úlceras iniciaram o processo de re-epitelização e aumentaram progressivamente o índice até o

fim do seguimento terapêutico. O ICU do grupo que recebeu radiação ultrassônica no leito (GL) também diminuiu, porém até o 15º dia, seguido por um aumento gradativo. Comparando a evolução dos ICUs das úlceras tratadas com LIPUS, o GL apresentou um ICU significantemente maior que o GB nos 30º e 60º dias. Esses resultados corroboram aos achados prévios sobre o efeito pró-inflamatório do LIPUS, como proposto por Young e Dyson (1990b). Devido à ativação da fase inflamatória, macrófagos são recrutados para fagocitar bactérias, tecido desvitalizado e restos celulares do leito ulcerado (DIEGELMANN; EVANS, 2004), o que caracteriza o desbridamento dessas úlceras, motivo do aumento de suas dimensões e consequente diminuição do ICU no início do tratamento.

Contrariamente a esses achados, o GS apresentou ICUs menores que dos grupos tratados com LIPUS. Em média, as úlceras dessa amostra resultaram em índices negativos por todo o seguimento terapêutico, salvo no 60º dia. Com isso, pode-se inferir que as mesmas não foram responsivas à terapia convencional pré-estabelecida com creme sulfadiazina de prata.

Alguns estudos (MARGOLIS; BERLIN; STROM, 1999; MARGOLIS et al., 2004; PHILLIPS et al., 2000; SKENE, 1992) relacionaram o insucesso de cicatrização da úlcera ao seu tamanho inicial, ou seja, quanto maior sua dimensão, pior o prognóstico. Por isso, esta pesquisa aderiu à proposta de categorização das úlceras, as quais foram classificadas em pequenas, médias e grandes. Considerando as úlceras menores, duas do GB ($N_{pequenas} = 3$) cicatrizaram completamente, contra uma do GL ($N_{pequenas} = 1$) e uma do GS ($N_{pequenas} = 1$).

No mesmo raciocínio, Kantor e Margolis (2000) e Sheehan et al. (2003) discutiram a relevância de se obter a taxa (ou índice) de cicatrização de uma úlcera como ferramenta prognóstica. Eles ressaltaram que a porcentagem de mudança da área de uma ferida durante 4 semanas consecutivas prediz a eficácia do tratamento utilizado. Com isso, como proposto por Caetano et al. (2009), foi observado no estudo um ICU maior ou igual a 0,4 (40% de re-epitelização) em: 2 úlceras pequenas no 60º dia e 1 úlcera média e outra grande no 90º dia do GB; 1 úlcera pequena no 30º dia e outra média no 90º dia do GL; e apenas 1 úlcera pequena no 30º dia do GS.

Em relação à análise das modificações teciduais pela quantificação de tecido de granulação e esfácelo (REG), encontraram-se relações semelhantes para as úlceras tratadas por LIPUS. Em ambos os grupos (GB e GL), a REG diminuiu progressivamente em relação ao início do tratamento, com diferença estatística significante no 45º dia comparado ao GS. Apenas no 90º dia a REG do GL sofreu um discreto aumento, porém não significante. Isso pode estar relacionado com a manutenção do estímulo inflamatório, levando à degradação do colágeno, expressa clinicamente pela cor amarelo-esbranquiçada (fibrina).

A partir desses achados, pode-se sugerir que o LIPUS incrementou o tecido de granulação das úlceras, visto seu potencial angiogênico e seu efeito na atração de fibroblastos, semelhante ao descrito por Young e Dyson (1990b, 1990c). Esses autores utilizaram o LIPUS com frequências distintas (0,75 e 3,0 MHz) e intensidade de 0,1 W/cm^2 em lesão total de pele de ratas e avaliaram quantitativamente células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos. Os grupos tratados com LIPUS apresentaram mais tecido de granulação, poucas células inflamatórias e maior quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos, comparados ao grupo controle (irradiação simulada).

Adicionalmente, a irradiação ultrassônica exerce função fibrinolítica como proposto por Ennis, Lee e Meneses (2007), uma vez que favorece a retirada de tecido desvitalizado, como a fibrina ou esfácelo. Esses achados foram corroborados pelos de Peschen et al. (1997), que verificaram que o LIPUS aplicado na superfície (técnica subaquática) de úlceras venosas crônicas 3 vezes por semana contribuiu para diminuir a quantidade de esfácelo e conseguinte aumento do tecido de granulação.

Contrariamente ao observado nos grupos tratados por LIPUS, o GS em média apresentou pouco tecido de granulação. O creme sulfadiazina de prata 1% não auxiliou na neovascularização das úlceras, tampouco na retirada de tecido desvitalizado, fatores que contribuíram para os altos valores de REG durante o seguimento terapêutico. Margolis, Berlin e Strom (1999) propuseram que o insucesso de algumas úlceras em cicatrizar pode estar relacionado à cronicidade do estado inflamatório, que aumenta a quantidade de esfácelo presente no leito ulcerado. Diante disso, os índices negativos do GS se justificam pelo insucesso de ativação da fase inflamatória pelo tratamento convencional. Entretanto, as úlceras dos grupos submetidos ao LIPUS apresentaram tempos semelhantes quanto a sua cronicidade, surpreendentemente superiores ao do GS, o que reforça a ação do LIPUS no desbridamento e granulogêse da cicatrização.

O estudo histopatológico foi realizado com as amostras do GL excisonadas da borda e do leito para avaliar as modificações teciduais relacionadas à aplicação do ultrassom no leito. As biópsias foram realizadas no início e na metade do seguimento terapêutico (1º e 45º dias). Cada úlcera foi considerada seu próprio controle.

Considerando a variável células inflamatórias, o estímulo sonoro diminuiu significantemente do 1º ao 45º dia a quantidade do infiltrado inflamatório no centro da úlcera. Sabe-se que o LIPUS potencializa a ação dos macrófagos e com isso acelera a fase inflamatória (YOUNG; DYSON, 1990b), porém esse fenômeno ocorre nas primeiras semanas, liberando importantes estímulos para as fases subsequentes da cicatrização. Essa

constatação está de acordo com o estudo experimental de Mendonça et al. (2006), que observaram já no 3º dia um número menor de células inflamatórias em lesões de ratos tratadas com LIPUS (30 mW/cm^2) pulsado de frequência 1,5 MHz.

Em contrapartida, a borda da úlcera apresentou um aumento significante das células inflamatórias no 45º dia em relação ao 1º dia. Esse fato pode estar relacionado ao maior número de células envolvidas, como queratinócitos e células de Langerhans da pele íntegra, que poderiam ativar maior quantidade de substâncias quimiotáticas para as células inflamatórias e, consequentemente, reativação do processo cicatricial, funcionando o ultrassom como um agente físico modificador do estado de indolência da úlcera.

Em relação ao número de fibroblastos no 45º dia, houve um incremento significante ($p < 0,01$) na sua proliferação, tanto na borda quanto no centro da úlcera. Qualitativamente, as células apresentaram-se agrupadas e alinhadas de maneira a favorecer a contração da úlcera. Esse achado é corroborado pelo estudo de Young e Dyson (1990b), que observaram um aumento significante de fibroblastos em lesão de pele de ratos tratada com LIPUS pulsado de intensidade SATA de 0,1 W/cm^2. Os fibroblastos têm grande importância na cicatrização por serem responsáveis pela síntese de colágeno, proteína fundamental ao reparo tecidual (ZHOU et al., 2004).

Analisando a porcentagem de colágeno depositada até o 45º dia, observou-se um decréscimo significante em relação ao 1º dia, tanto na borda quanto no centro da ferida. A partir das imagens histológicas, notou-se que o colágeno presente no 45º dia estava mais reorganizado (reordenado) e adelgaçado, o que tornaria sua quantidade menos expressiva à análise de imagem pelo programa *ImageJ*. Esse adelgaçamento das fibras colágenas devido ao ultrasson foi relatado por Thawer e Houghton (2004).

Quanto ao número de vasos sanguíneos no 45º dia, o LIPUS estimulou significantemente a neovascularização apenas na borda da úlcera, fato que pode estar relacionado à maior quantidade de células inflamatórias encontradas, o que repercutiria numa maior produção/liberação de fatores de crescimento e citocinas, importantes para a angiogênese e consequentemente para o processo de cicatrização.

Assim, considerando as discretas diferenças encontradas no ICU e na REG entre a aplicação do LIPUS na borda e no leito, aliado às alterações histopatológicas encontradas na borda e no centro das úlceras do GL, torna-se evidente sua ação positiva, independentemente se aplicado na borda ou no leito, superior ao tratamento convencional com sulfadiazina de prata 1% no tratamento das úlceras venosas crônicas.

6 CONCLUSÃO

A aplicação do LIPUS, independente do local de aplicação (borda ou leito), mostrou-se clinicamente segura e eficaz no tratamento das úlceras venosas crônicas, além de estimular modificações teciduais locais. Por ativar as fases inflamatória e proliferativa em ambos os grupos (borda e leito), o LIPUS confirma seu efeito pró-inflamatório e angiogênico na cicatrização de úlceras venosas crônicas superior ao tratamento convencional à base de sulfadiazina de prata 1%.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L.P.F; LASTÓRIA, S. (2004). Venous ulcer: epidemiology, physiopathology, diagnosis and treatment. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 6, p. 449-456.

AGAIBY, A.D; DYSON, M. (1999). Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. **Journal of Anatomy**, v. 195, p. 531-542.

ANASTÁCIO, M.A.D.J. (2000). **Reparação epitelial em úlceras vasculares após estimulação do ultra-som pulsado de baixa intensidade**. 89 p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

BAILEY, F. R. (1973). **Histologia**. Sao Paulo: Edgard Blucher.

BAKER, K.G; ROBERTSON, V.J.; DUCK, F.A. (2001). A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Physical Therapy**, v. 81, n. 7, p. 1351-1358, July.

BALBINO, C.A; PEREIRA, L.M.; CURY, R. (2005). Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-41, jan./mar.

BECHELLI, L. M.; CURBAN, G.V. (1978). **Compendio de dermatologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu.

BURNAND, K.G. et al. (1977). The relative importance of incompetent communicating veins in the production of varicose veins and venous ulcers. **Surgery**, v. 82, n. 1, p. 9-14, July.

BURNAND, K.G. et al. (1982). Pericapillary fibrin in the ulcer-bearing skin of the leg: the cause of lipodermatosclerosis and venous ulceration. **British Medical Journal**, v. 285, p. 1071-1072, Oct.

BYL, N.N. et al. (1993). Incisional wound healing: a controlled study of low and high dose ultrasound. **Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v.18, n. 5, p.619-628.

CABRAL, A.L.S. (2000). **Insuficiência venosa crônica de membros inferiores: prevalência, sintomas e marcadores preditivos**. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

CAETANO, K.S. et al. (2009). Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 1, p. 111-118.

CALLAM, M.J. (1987). A controlled trial weekly ultrasound therapy in chronic leg ulceration. **The Lancet**, v. 2, p. 204-206, July.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (2000). Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: _____. **Robbins –** Patologia Estrutural e Funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 79-100.

COLERIDGE-SMITH, P.D. et al. (1988). Causes of venous ulceration: a new hypothesis. **British Medical Journal**, v. 296, p. 1726-1727, June.

COLLINS, T.J. (2007). ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, n. 1, p. 25-30, Suppl.

CULAV, E.M.; CLARK, C.H.; MERRILEES, M.J. (1999). Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. **Physical Therapy**, v. 79, n. 3, p. 308-319, Mar.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 283-289, Jan.

DYSON, M.; FRANKS, C.; SUCKLING, J. (1976). Stimulation of healing of varicose ulcers by ultrasound. **Ultrasonics**, v. 14, n. 5, p. 232-236, Sept.

DYSON, M.; SUCKLING, J. (1978). Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. **Physiotherapy**, v. 64, n. 4, p. 105-108.

DYSON, M. (1982). Non-thermal cellular effects of ultrasound. **British Journal of Cancer**, v. 45, p. 165-171.

_____. (1990). Role of ultrasound in wound healing. In: KLOTH, L.C.; CULLOCH, J.M.; FREEDAR, J.A. **Wound Healing**. Philadelphia: FA Davis Co. p. 259-282.

DUARTE, L.R. (1983). The stimulation of bone growth by ultrasound. **Archives of Orthopedic and Traumatic Surgery**, v. 101, n. 3, p. 153-159.

EAGLSTEIN, W.H.; FALANGA, V. (1997). Chronic wounds. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n 3, p. 689-699, June.

ENNIS, W.; LEE, C.; MENESES, P. (2007). A biochemical approach to wound healing through the use of modalities. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 63-72.

FALANGA, V.; ZITELLI, J.A.; EAGLSTEIN, W.H. (1988). Wound healing. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 19, n. 3, p. 559-563, Sept.

FINLAYSON, K.; EDWARDS, H.; COURTNEY, M. (2009). Factors associated with recurrence of venous leg ulcers: a survey and retrospective chart review. **International Journal of Nursing Studies**, v. 46, n. 8, p. 1071-1078.

FOWLER, E.M. et al. (2003). Wound care for persons with diabetes. **Home Healthcare Nurse**, v. 21, p. 531–540.

FRADE et al. (2005). Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora - MG (Brasil) e região. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 1, p. 41-46.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. (2003). **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

GRANDOLFO, M. Fundamentals of acoustic wave theory. (1987). In: REPACHOLI, M.H.; GRANDOLFO, M.; RINDI, A. **Ultrasound –** Medical Applications, Biological Effects, and Hazard Potential. New York: Plenum Press, p. 13-28.

GREY, J.E.; ENOCH, S.; HARDING, K.G. (2006). Venous and arterial leg ulcers. **British Medical Journal**, v. 332, p. 347-350, Feb.

HARDING, K.G.; MORRIS, H.L.; PATEL, G.K. (2002). Healing chronic wounds. **British Medical Journal**, v. 324, p. 160-163, Jan.

HILÁRIO, M.L. (1993). **Radiação ultra-sônica de baixa intensidade na reparação tecidual de úlceras tróficas de perna**. 153 p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

JOHANNSEN, F.; GAM, A.N.; KARLSMARK, T. (1998). Ultrasound therapy in chronic leg ulceration: a meta-analysis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 6, n. 2, p. 121-126.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (2000). Biologia da interação célula-matriz extracelular. In: _____. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 233-243.

KACHEMOUNE, A.; KAUFFMAN, C.L. (2002). Diagnosis of leg ulcers. **The Internet Journal of Dermatology**, v. 1, n. 2.

KANTOR, J.; MARGOLIS, D.J. (2000). A multicentre study of percentage change in venous leg ulcer area as a prognostic index of healing at 24 weeks. **British Journal of Dermatology**, v. 142, p. 960-964.

KARUKONDA, S.R. et al. (2000). The effects of drugs on wound healing: part 1. **International Journal Dermatology**, v.39, n.4, p.250-257, Apr.

KEAST, D.H. (2007). Current chronic wound management. **US Dermatology Review**. Disponível em: <http://www.touchbriefings.com/cdps/cditem.cfm?nid=2960&cid=5>. Acesso em: 18 fev.2009

KUNIMOTO, B.T. (2001). Management and prevention of venous leg ulcers: a literature-guided approach. **Ostomy Wound Management**, v. 47, n. 6, p. 36-49, June.

LEIGHTON, T.G. (2007). What is ultrasound? **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 93, p. 3-83.

MAFFEI, F.H.A. (2002). Varizes dos membros inferiores, epidemiologia, etiopatogenia e fisiopatologia. In: _____. **Doenças Vasculares Periféricas**. 3.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 1499-1510.

MANI, R. (2001). Laboratory evaluation of non-healing wounds. In: FALANGA, V. **Cutaneous Wound Healing**. London: Martin Dunitz Ltd. p. 187-201.

MARGOLIS, D.J.; BERLIN, J.A.; STROM, B.L. (1999). Risk factors associated with the failure of a venous leg ulcer to heal. **Archives of Dermatology**, v. 135, n. 8, p. 920-926, Aug.

MARGOLIS, D.J. et al. (2002). Venous leg ulcer: incidence and prevalence in the elderly. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 46, p. 381-386.

MARGOLIS, D.J. et al. (2004). The accuracy of venous leg ulcer prognostic models in a wound care system. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 2, p. 163-168.

McGRATH, J.A.; EADY, R.A.J.; POPE, F.M. (2004). Anatomy and organization of human skin. In: ROOK, A et al. **Rook's Textbook of Dermatology**. 7th ed. New York: Wiley-Blackwell Publishing. v.1, Cap. 3, p. 3.1-3.84.

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

MILLER, O.F.; PHILLIPS, T.J. (2000). Leg ulcers. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 1, p. 91-95, July.

MINOR, R.R. (1980). Collagen metabolism. **American Journal of Pathology**, v. 98, n. 1, p. 225-280, Jan.

MUSTOE, T. (2004). Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 65S-70S, Suppl.

MUSTOE, T ; O'SHAUGHNESSY, K.; KLOETERS,O. (2006). Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, p. 35S-41S, Suppl.

PATEL, N.P.; LABROPOULOS, N.; PAPPAS, P.J. (2006). Current management of venous ulceration. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, p. 254S-260S, Suppl.

PHILLIPS, T.J. et al. (2000). Prognostic indicators in venous ulcers. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 43, p. 627-630, Oct.

POLTAWSKI, L.; WATSON, T. (2007). Transmission of therapeutic ultrasound by wound dressings. **Wounds**, v.19, n. 1, p. 1-12.

REBOLLO, M.A. (1973). **Histologia**. 3.ed. Buenos Aires: Inter-Medica.

REHER, P. et al. (1999). Effect of ultrasound on the production of Il-8, basic FGF and VEGF. **Cytokine**, v. 11, n. 6, p. 416-423.

ROBSON, M.C. et al. (2000). Wound healing trajectories as predictors of effectiveness of therapeutic agents. **Archives of Surgery**, v. 135, p. 773–777, July.

ROCHE, C.; WEST, J. A (1984). Controlled trial investigating the effect of ultrasound on venous ulcers referred from general practitioners. **Physiotherapy**, v. 70, n. 12, p. 475-477.

ROTTA, O. (2008). A pele normal. In: _____. **Guia de Dermatologia**: Clínica, Cirúrgica e Cosmiátrica. Barueri: Manole, p. 3-9.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. (2001). **Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas.

SANTANA, L.A. (2006). **Tratamento de úlceras venosas por ultra-som de baixa intensidade: avaliação por análise de imagem e imunohistoquímica**. 127 p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SAÚDE TOTAL. Disponível em: http://www.saudetotal.com.br/prevencao/topicos/histologia.asp Acesso em: 16 jun. 2009.

SCHAFER, M. et al. (1994). Experimental methods for ultrasonically enhanced wound healing. In: IEEE ULTRASONICS SIMPOSIUM, 1994, NewYork. **Proceedings…** New York: IEEE. v.3, p. 1853-1856.

SHEEHAN, P. et al. (2006). Percent change in wound area of diabetic foot ulcers over a 4-week period is a robust predictor of complete healing in a 12-week prospective trial. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, p. 239S-244S, Suppl.

SKENE, A.I. et al. (1992). Venous leg ulcers: a prognostic index to predict time to healing. **British Medical Journal**, v. 305, p. 1119-1121.

STADELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. (1998). Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, p. 26S-38S, Aug. Suppl.

STEED, D.L. (2003). Wound-healing trajectories. **Surgical Clinics of North America**, v. 83, p. 547-555.

Ter HAAR, G. (1999). Therapeutic ultrasound. **European of Ultrasound**, v. 9, p. 3-9.

Ter HAAR, G. (2007). Therapeutic applications of ultrasound. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 93, p. 111-129.

THAWER, H.A.; HOUGHTON, P.E. (2004). Effects of ultrasound delivered through a mist of saline to wounds in mice with diabetes mellitus. **Journal of Wound Care**, v. 13, n. 5, p. 1-6, May.

VALENCIA, I.C. et al. (2001). Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 3, p. 401-421, Mar.

WATSON, T. U (2008). Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. **Ultrasonics**, v.48, n.4, p.321-329, Aug.

WEBSTER et al. (1978). The role of cavitation in the *in vitro* stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 4, n. 4, p. 343-351.

WEICHENTAL, M. et al. (1997). Low-frequency ultrasound treatment of chronic venous ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v. 5, n. 1, p. 18-22, Jan.

WELLS, P.N.T. (1977). **Biomedical Ultrasonics**. London: Academic Press.

WERDIN, F.; TENENHAUS, M.; RENNEKAMPFF, H.O. (2008). Chronic wound care. **The Lancet**, v. 372, p. 1860-1862, Nov.
WITTE, M.B.; BARBUL, A. (1997). General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, Oxford, v.77, n.3, p.509-528,

YOUNG, S.R.; DYSON, M. (1990a). Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 16, n. 8, p. 809-816.

_____. (1990b). Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. **Ultrasonics**, v. 28, n. 3, p. 175-180.

_____. (1990c). The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 16, n. 3, p. 261-269.

ZHOU, S. et al. (2004). Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54463-54469.

ZISKIN, M.C. (1987). Applications of ultrasound in medicine – comparison with other modalities. In: REPACHOLI, M.H.; GRANDOLFO, M.; RINDI, A. **Ultrasound**: Medical Applications, Biological Effects, and Hazard Potential. New York: Plenum Press, p. 49-60.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Este termo deverá ser lido, entendido, preenchido e assinado pelo paciente ou pelo familiar responsável, quando se tratar de pacientes inconscientes.

Resumo simplificado do trabalho "Ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização de úlcera venosa: estudo comparativo de duas técnicas de aplicação"**:**

Introdução: O uso do ultrassom sobre a superfície ulcerada estimula a angiogênese e incrementa a deposição de colágeno, podendo acelerar a cicatrização.

Objetivo: Avaliar o uso do ultrassom no tratamento de úlceras venosas, buscando conhecer as modificações que ocorrem com os tecidos da ferida durante o tratamento.

Justificativa: O trabalho se justifica na busca de padronizar a utilização do ultrassom de baixa intensidade sobre a superfície ulcerada da perna.

Procedimento: O paciente voluntário deverá ler este termo, responder a um protocolo de avaliação clínica, além de submeter-se a um exame dermatológico geral. Ficará ciente da realização de biópsias para posterior avaliação das características teciduais das feridas, do tratamento com ultrassom que será aplicado sobre a ferida, sem perfuração ou penetração da pele, além dos curativos que deverão ser trocados diariamente, após lavagem da ferida com soro fisiológico e cobertura com gazes e faixa.

"Eu,_____DN___/___/__, identidade (ou certidão de nascimento) nº _____, sexo: ( ) M ( ) F, residente à _____nº_____Bairro_____, cidade:_____, estado_____ e telefone:_____, **declaro que recebi por escrito, li e compreendi o resumo do trabalho da pesquisa** "Ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização de úlcera venosa: estudo comparativo de duas técnicas de aplicação" **–EESC, IQSC e FMRP/USP e estou disposto a participar voluntariamente como paciente portador da lesão ulcerada, por saber que não me causará nenhum mal ou risco. Terei a liberdade de a qualquer momento discordar, não colaborar ou desistir de participar desta pesquisa. Apenas ofereço-me a:**

Preencher uma ficha que me identifica e permitir que me examinem a pele em busca de lesões cutâneas. Isso será feito sob orientação médica, sem risco a minha pele ou qualquer parte do meu corpo;

Aceitar que os pesquisadores fotografem minha ferida;

Aceitar que os pesquisadores realizem biópsias em minha pele;

Essas informações obtidas serão sigilosas (guardadas em segredo) e sei que não terei meu nome citado e que minha imagem será protegida; não permitirei nenhum tipo de atitude que me desrespeite; minha religião, minha cultura e meus valores pessoais serão levados em conta; sei também que dessa forma ajudarei no estudo científico do tratamento das úlceras, pois os dados obtidos são passíveis de publicação científica e/ou apresentação em eventos, o que não acarretará em qualquer tipo de dano moral a minha pessoa.

Para qualquer esclarecimento, acompanhamento ou tratamento dermatológico, terei acesso aos serviços da equipe de saúde desta pesquisa, que me fornecerá seu endereço e contatos caso eu queira."

Ribeirão Preto, _____de _____de 200__.

_____

Assinatura do voluntário

_____	_____
Ft Ana Elisa Serafim Jorge	Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade
CREFITO-3/ 79730-F	CRM-SP/ 115222 T

APÊNDICE B - Protocolo de avaliação clínica

Indentificação:

Caso nº:
Início do acompanhamento:
Nome:
Sexo:
Idade:
Cor:
Residência:
Naturalidade:
Estado Civil:
Profissão:

Exame Geral:

Doença de Base:

( ) Arteriosclerose
( ) Insuficiência Arterial
( ) Insuficiência Venosa Crônica
( ) Diabetes tipoI
( ) Diabetes tipo II
( ) Outras doenças associadas:
( ) AVC
( ) TVE
( ) HAS
( ) Epilepsia
( ) Alcoolismo

Medicamentos em uso:

( ) ATB
( ) Anti-hipertensivo
( ) Hipoglicemiantes
( ) Vitaminas
( ) Anticoagulante
( ) Outros:
( ) Quimioterápicos
( ) Imunossupresor
( ) Hemotransfusões
( ) Insulina

Exames Laboratoriais:

Hemoglobina: Glicemia: Albumina:

Exame Físico:

Exame da Ferida:

Comprometimento Tecidual:
( ) Estágio I
( ) Estágio II
( ) Estágio III
( ) Estágio IV

Maior extensão: Vertical: cm Horizontal: cm
Presença de Tecido Necrótico: ( ) Não ( ) Sim

Exsudato: ( ) Não ( ) Sim, característica: ( ) Serosa
( ) Serossanguinolenta
( ) Sanguinolenta
( ) Purulenta

Volume do Exsudato:
( ) Ausente ( ) Moderado
( ) Pouco ( ) Acentuado

Sinais de Infecção: ( ) Não ( ) Sim

Odor: ( ) Ausente ( )Discreto ( )Acentuado

Dor/*Escore*: ( )Ausente ( )Leve ( ) Moderada ( )Intensa

Tempo de Existência da Úlcera: Já cicatrizou anteriormente? ( )Sim ( ) Não

Exame Histopatológico:

Inicial:	45d:

Exame Fotográfico:

Inicial:	15º dia:	30º dia:	45º dia:	60º dia:	75º dia:	90º dia:

Avaliação Terapêutica:

Resposta ao tratamento/	Ferida		
Aspecto clínico observado	Sim	Não	Data
Evidência de granulação			
Evidência de re-epitelização			
Cicatrização total			
Aumento da úlcera			
Controle do odor			
Suspensão do tratamento			
Abandono do tratamento			

Causas da Suspensão:
Causas do Abandono:

APÊNDICE C – Seguimento Clínico-Fotográfico das Úlceras do Grupo *Borda*

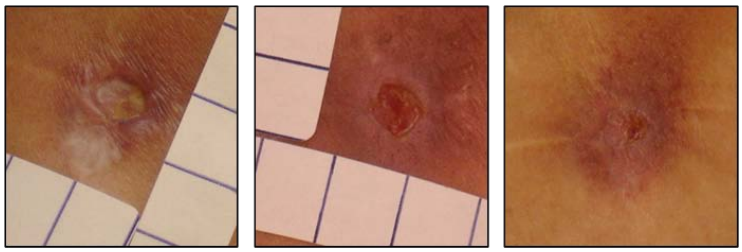


Figura 37 – 1º, 30º e 60º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 1

Figura 38 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 2

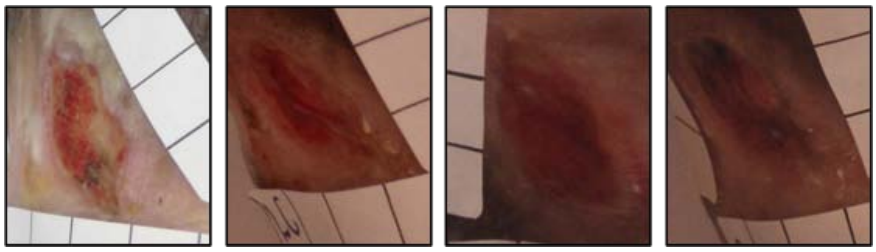


Figura 39 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 3

Figura 40 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 4

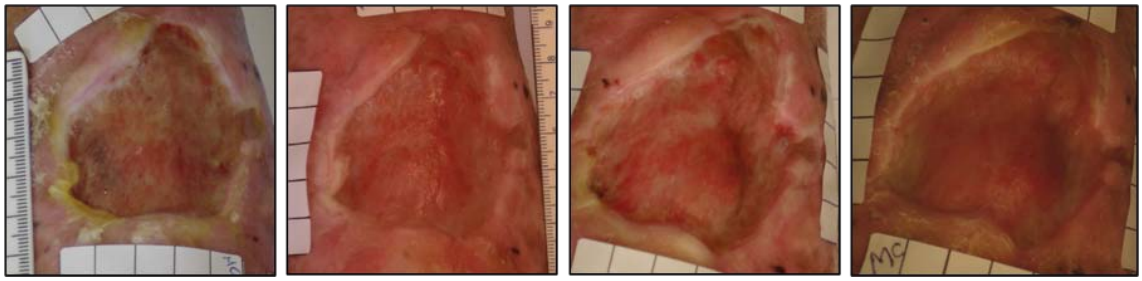


Figura 41 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 5

Figura 42 – 1º, 30º e 60º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 6

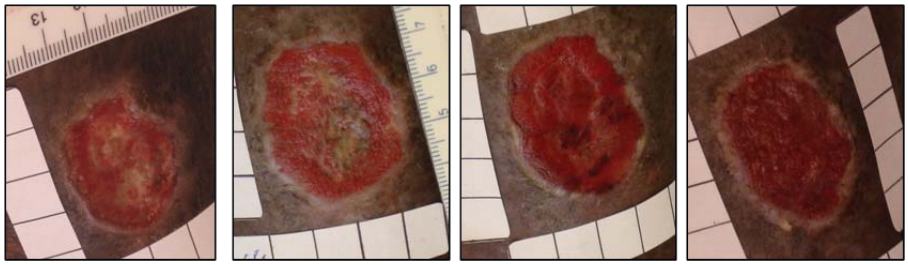


Figura 43 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 7

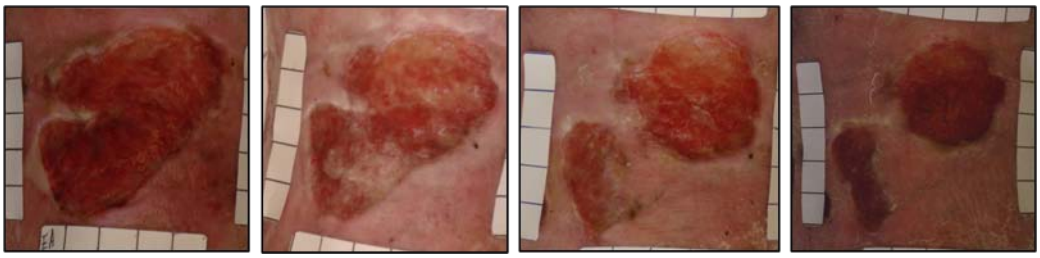


Figura 44 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 8

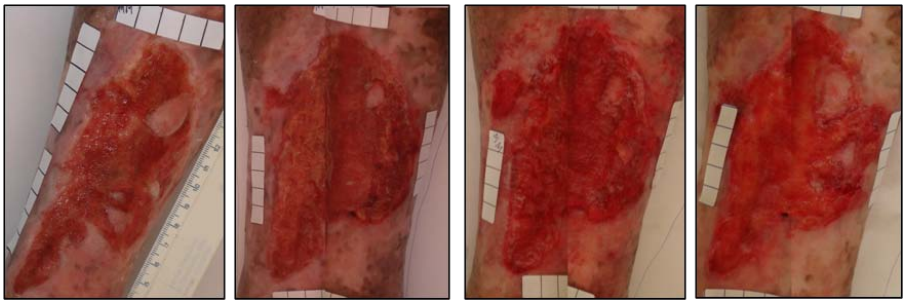


Figura 45 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 9

APÊNDICE D – Seguimento Clínico-Fotográfico das Úlceras do Grupo *Leito*

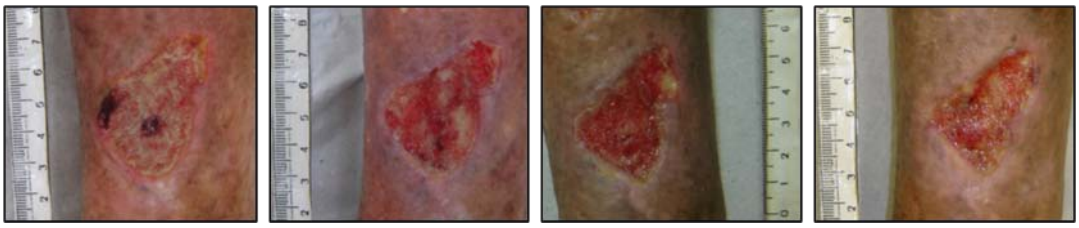


Figura 46 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 1

Figura 47 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 2

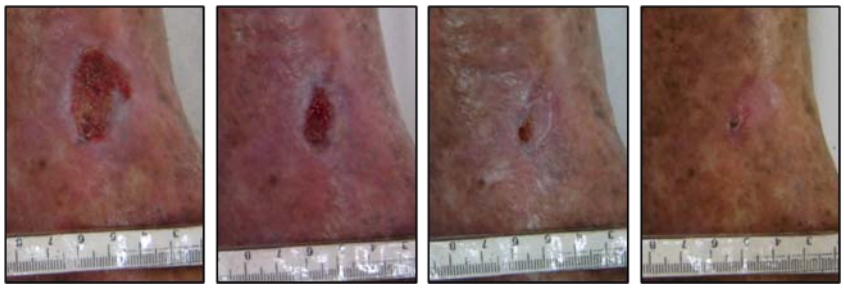


Figura 48 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 3

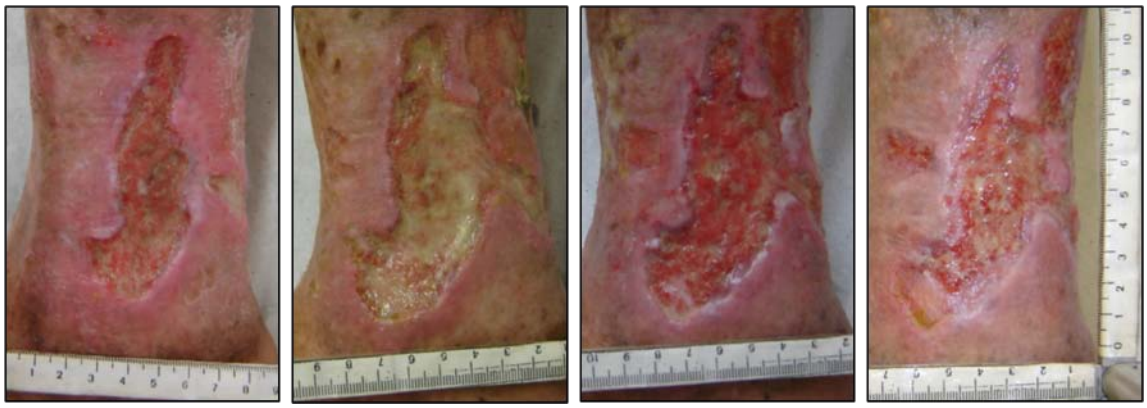


Figura 49 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 4

Figura 50 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 5

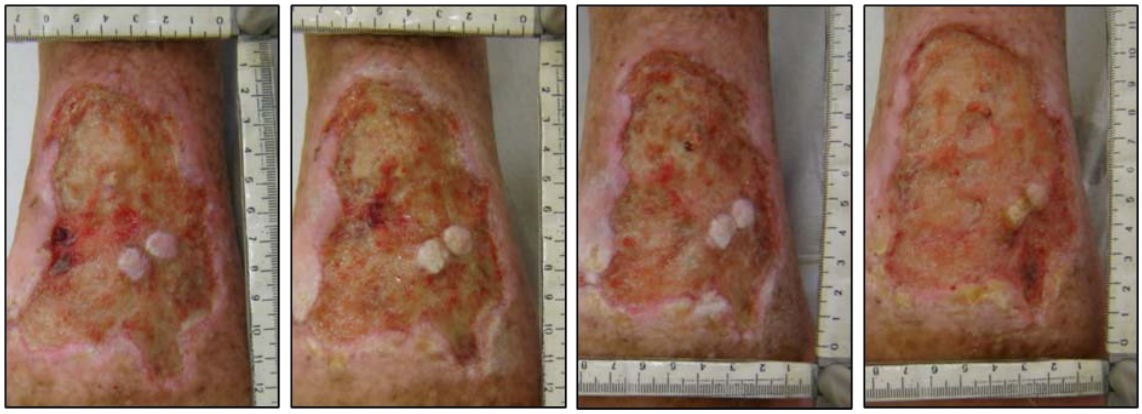


Figura 51 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 6

Figura 52 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 7

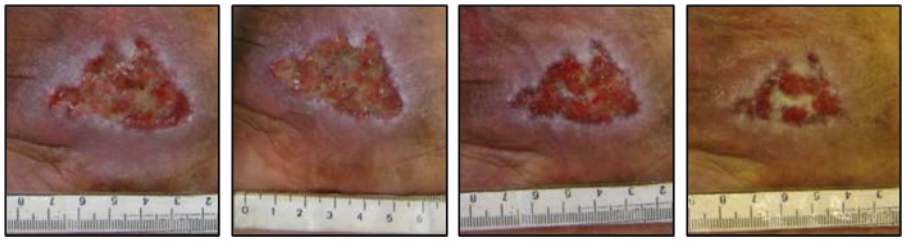


Figura 53 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 8

APÊNDICE E – Seguimento Clínico-Fotográfico das Úlceras do Grupo *Sulfadiazina*

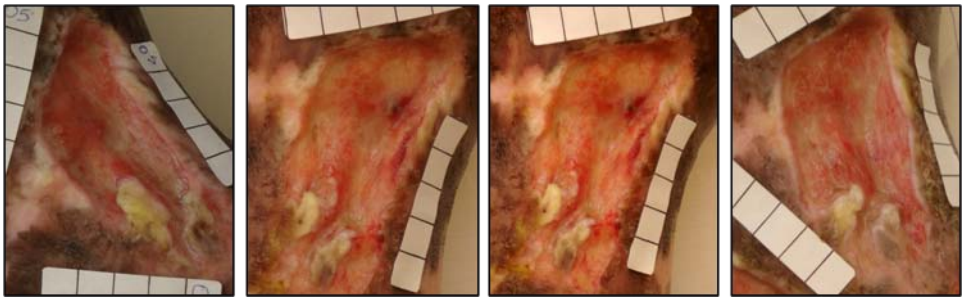


Figura 54 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 1

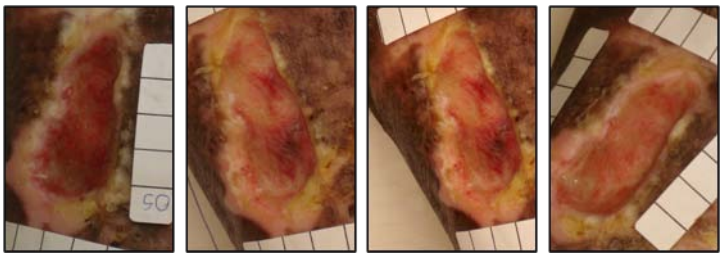


Figura 55 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 2

Figura 56 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 3

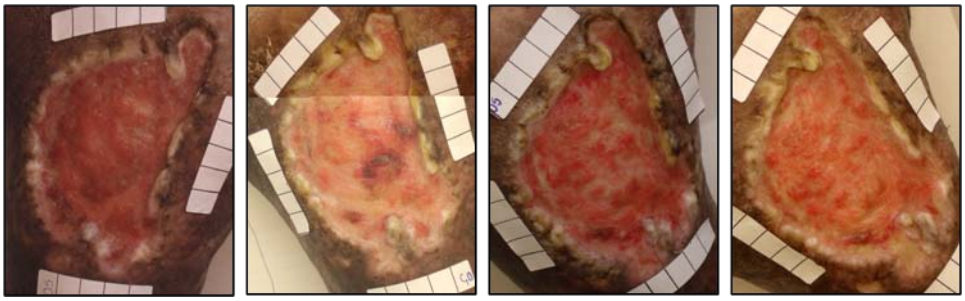


Figura 57 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 4

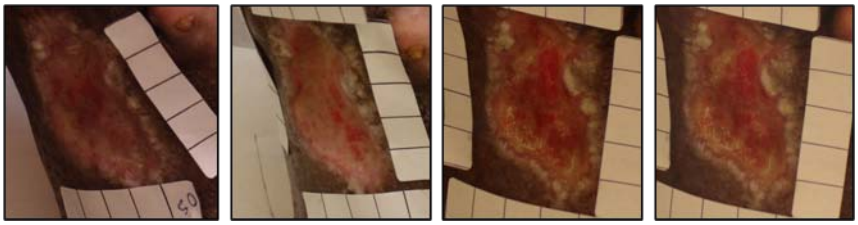


Figura 58 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 5

Figura 59 – 1º e 30º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 6

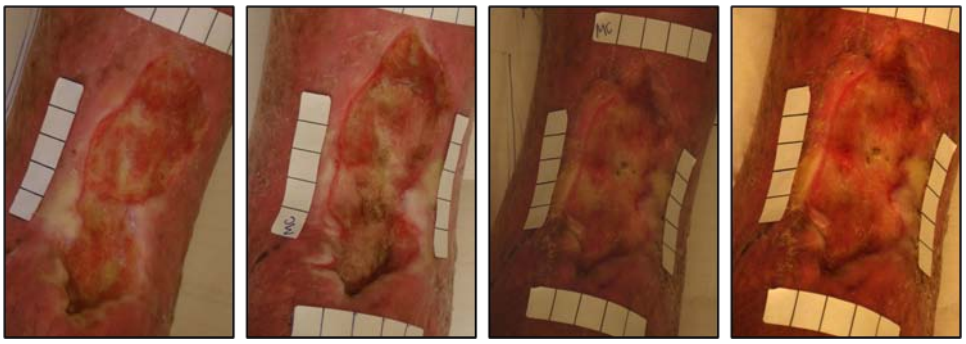


Figura 60 – 1º, 30º, 60º e 90º dias de seguimento clínico-fotográfico da Úlcera 7

ANEXOS

ANEXO A – Dosimetria do aparelho de US

LABORATÓRIO DE ELETRÔNICA SMM BIOENGENHARIA

Relatório de dosimetria

Data: 30/09/2008

Solicitante: Ana Elisa Serafim Jorge
Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade
Responsável pela Bioengenharia: Prof. Dr: João Manoel Domingos de Almeida Rollo
Responsável pelo Laboratório de Eletrônica: Mário Gazziro

Característica do dosímetro:
Ultrasound Power Meter
Model – UPM – DT – 1
Ohmic - Instruments CO
Patrimônio USP 018.012296 BIO

Características da máquina:
Ultrassom de Baixa Intensidade
Estimulador ultrassônico de regeneração óssea
Marca: feito pelo Laboratório de Ultrassom da Bioengenharia USP
Modelo: Bio
Nº Patrimônio: 018.025322 BIO
Transdutor Americano de 22mm
Valor obtido no dosímetro:
Potência: 114 mW
Intensidade: 30 mW/cm^2

Responsável pela dosimetria bimestral: Mário Gazziro
Observação: os valores obtidos nas dosimetrias estavam de acordo com o estabelecido (Intensidade SATA 30 mW/cm^2).

ANEXO B - Apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE SAÚDE ESCOLA

Rua Terezina, 690 – CEP: 14055-380
Ribeirão Preto – SP

Telefone PABX (0**16) 633-2331/4480
FAX (0**16) 6332331

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO DE SAÚDE ESCOLA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-CEP/CSE-FMRP-USP.

Ribeirão Preto, 14 de maio de 2008.

Of. Nº.101/08/COORD.CEP/CSE-FMRP-USP.

Senhor Professor,

Temos a grata satisfação de comunicar que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, analisou e apreciou o parecer do Relator, referente ao projeto de pesquisa intitulado: **"Avaliação Clínica e Imuno-Histopatológica do tratamento de Úlceras Venosas por Ultra-Som de Baixa Intensidade aplicada Sobre Superfície Ulcerada"**, protocolo nº.262/CEP-CSE-FMRP-USP, com a orientação de V. Sª e da pesquisadora principal: Fisioterapeuta Ana Elisa Serafim Jorge (mestranda do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia-USP/São Carlos).

Lembramos que em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado a este CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados.

No ensejo, renovamos os votos de estima e consideração, despedimo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Laércio Joel Franco
Coordenador do CEP/CSE-FMRP-USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade
Docente FAEPA/FMRP-USP.

ANEXO C – Tabela Descritiva para ICU e REG

Tabela 5 - Descritiva para as variáveis *ICU* e *REG* de acordo com os *Grupos* e *Tempos*

Grupo	Tempo	Variáveis	N	Média	DP	IC (95%)		Mínimo	Mediana	Máximo
						LI	LS			
GB	1	ICU	9	0,00	0,00	.	.	0,00	0,00	0,00
		REG	9	1,42	2,63	-0,60	3,45	0,07	0,71	8,33
	15	ICU	9	-0,24	0,33	-0,49	0,01	-0,91	-0,28	0,10
		REG	9	0,68	0,44	0,34	1,02	0,10	0,69	1,30
	30	ICU	9	-0,21	0,43	-0,54	0,12	-0,83	-0,04	0,32
		REG	9	0,61	0,58	0,16	1,05	0,04	0,52	1,64
	45	ICU	9	-0,08	0,54	-0,49	0,33	-0,80	0,12	0,61
		REG	9	0,55	0,55	0,13	0,97	0,07	0,27	1,75
	60	ICU	9	-0,04	0,68	-0,56	0,48	-0,91	-0,11	0,99
		REG	8	0,40	0,33	0,13	0,68	0,02	0,37	1,05
	75	ICU	9	0,13	0,57	-0,31	0,56	-0,53	0,03	1,00
		REG	7	0,22	0,24	0,00	0,44	0,00	0,17	0,69
	90	ICU	9	0,25	0,53	-0,16	0,65	-0,52	0,29	1,00
		REG	7	0,10	0,09	0,02	0,18	0,00	0,12	0,25
GL	1	ICU	8	0,00	0,00	.	.	0,00	0,00	0,00
		REG	8	1,66	2,63	-0,54	3,85	0,04	0,44	7,51
	15	ICU	8	-0,06	0,12	-0,16	0,04	-0,30	-0,05	0,14
		REG	8	1,46	1,91	-0,14	3,06	0,02	0,52	5,19
	30	ICU	8	-0,01	0,34	-0,29	0,27	-0,57	0,02	0,62
		REG	8	0,88	1,04	0,01	1,76	0,08	0,42	2,80
	45	ICU	8	-0,02	0,44	-0,39	0,35	-0,63	-0,01	0,88
		REG	8	0,72	0,70	0,14	1,31	0,13	0,49	2,24
	60	ICU	8	0,09	0,39	-0,24	0,42	-0,39	0,07	0,94
		REG	8	0,56	0,62	0,04	1,08	0,02	0,30	1,91
	75	ICU	8	0,10	0,43	-0,26	0,46	-0,30	0,05	0,99
		REG	8	0,51	0,60	0,01	1,02	0,10	0,38	1,97
	90	ICU	8	0,19	0,40	-0,14	0,52	-0,20	0,11	1,00
		REG	7	0,96	1,17	-0,12	2,04	0,07	0,42	3,01
GS	1	ICU	7	0,00	0,00	.	.	0,00	0,00	0,00
		REG	7	0,75	0,67	0,14	1,37	0,03	0,57	1,85
	15	ICU	7	-0,02	0,13	-0,14	0,11	-0,30	0,03	0,08
		REG	7	0,69	0,70	0,04	1,34	0,20	0,45	2,19
	30	ICU	7	-0,13	0,47	-0,57	0,31	-0,66	-0,21	0,87
		REG	7	2,23	2,26	0,14	4,32	0,00	1,71	5,37
	45	ICU	7	-0,04	0,49	-0,49	0,41	-0,46	-0,16	1,00
		REG	6	2,99	1,61	1,30	4,68	0,83	2,82	5,80
	60	ICU	7	0,03	0,45	-0,39	0,44	-0,41	-0,06	1,00
		REG	6	1,67	0,98	0,64	2,69	0,74	1,45	2,86
	75	ICU	7	-0,05	0,51	-0,52	0,42	-0,54	-0,05	1,00
		REG	6	1,75	0,63	1,09	2,41	0,93	1,82	2,63
	90	ICU	7	-0,03	0,49	-0,48	0,42	-0,52	-0,11	1,00
		REG	6	1,28	0,29	0,98	1,59	1,02	1,17	1,66

ANEXO D – Tabela Descritiva para Análise Histológica

Tabela 6 - Descritiva para as variáveis *Fibroblasto, Células Inflamatórias, Vasos Sanguíneos* e *Colágeno* de acordo com os *Locais* e *Tempos*

Local	Tempo	Variáveis	N	Média	DP	IC (95%)		Mínimo	Mediana	Máximo
						LI	LS			
1	1	Fibroblasto	80	76,06	38,00	67,61	84,52	5,00	70,00	210,00
		Cel. Inflamatória	80	60,65	61,09	47,06	74,24	0,00	37,00	275,00
		Vasos	80	3,03	3,47	2,25	3,80	0,00	2,00	19,00
		Colágeno	80	59,45	9,53	57,33	61,57	39,77	60,99	74,70
	2	Fibroblasto	68	88,96	52,71	76,20	101,71	14,00	72,00	202,00
		Cel. Inflamatória	68	80,94	73,15	63,23	98,65	0,00	71,50	262,00
		Vasos	68	4,49	4,89	3,30	5,67	0,00	2,00	21,00
		Colágeno	70	54,79	10,23	52,35	57,23	37,74	53,72	73,70
2	1	Fibroblasto	70	75,53	42,44	65,41	85,65	4,00	72,00	206,00
		Cel. Inflamatória	70	100,79	76,91	82,45	119,12	0,00	86,50	426,00
		Vasos	70	3,27	3,00	2,56	3,99	0,00	3,00	12,00
		Colágeno	70	59,40	11,28	56,71	62,09	37,00	61,38	82,16
	2	Fibroblasto	80	94,60	49,27	83,63	105,57	1,00	93,00	223,00
		Cel. Inflamatória	80	57,38	44,98	47,36	67,39	0,00	55,00	162,00
		Vasos	80	3,30	2,85	2,67	3,93	0,00	3,00	13,00
		Colágeno	80	55,76	9,56	53,63	57,88	38,30	55,30	73,63

Sendo: Local 1 = Borda; Local 2 = Centro; Tempo 1 = 1º dia; Tempo 2 = 45º dia.

ANEXO E – Tabela dos resultados da análise pelo modelo de regressão linear com efeitos mistos para ICU

Tabela 7 - Comparações dos *tempos* e *grupos* para a variável *ICU*

Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Tempo 1 (Grupo 1 - Grupo 2)	0,00	0,99	-0,32	0,32
Tempo 1 (Grupo 1 - Grupo 3)	0,00	0,99	-0,33	0,33
Tempo 1 (Grupo 2 - Grupo 3)	0,00	0,99	-0,36	0,36
Tempo 15 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,23	0,15	-0,55	0,08
Tempo 15 (Grupo 1 - Grupo 3)	-0,22	0,18	-0,55	0,10
Tempo 15 (Grupo 2 - Grupo 3)	0,01	0,95	-0,35	0,37
Tempo 30 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,40	0,01	-0,72	-0,08
Tempo 30 (Grupo 1 - Grupo 3)	-0,37	0,02	-0,70	-0,04
Tempo 30 (Grupo 2 - Grupo 3)	0,03	0,86	-0,33	0,39
Tempo 45 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,34	0,03	-0,67	-0,02
Tempo 45 (Grupo 1 - Grupo 3)	-0,33	0,05	-0,66	0,002
Tempo 45 (Grupo 2 - Grupo 3)	0,01	0,92	-0,34	0,37
Tempo 60 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,38	0,01	-0,70	-0,06
Tempo 60 (Grupo 1 - Grupo 3)	-0,33	0,05	-0,66	0,002
Tempo 60 (Grupo 2 - Grupo 3)	0,05	0,75	-0,30	0,41
Tempo 75 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,21	0,18	-0,54	0,10
Tempo 75 (Grupo 1 - Grupo 3)	-0,03	0,81	-0,37	0,29
Tempo 75 (Grupo 2 - Grupo 3)	0,17	0,32	-0,18	0,54
Tempo 90 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,12	0,46	-0,44	0,20
Tempo 90 (Grupo 1 - Grupo 3)	0,07	0,66	-0,25	0,40
Tempo 90 (Grupo 2 - Grupo 3)	0,19	0,28	-0,16	0,55

Sendo: Grupo 1 = GB; Grupo 2 = GL; Grupo 3 = GS.

ANEXO F – Tabela dos resultados da análise pelo modelo de regressão linear com efeitos mistos para REG

Tabela 8 - Comparações dos *tempos* e *grupos* para a variável *REG*

Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Tempo 1 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,27	0,68	-1,62	1,06
Tempo 1 (Grupo 1 - Grupo 3)	0,77	0,27	-0,61	2,16
Tempo 1 (Grupo 2 - Grupo 3)	1,05	0,15	-0,41	2,52
Tempo 15 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,58	0,39	-1,92	0,76
Tempo 15 (Grupo 1 - Grupo 3)	0,30	0,65	-1,08	1,70
Tempo 15 (Grupo 2 - Grupo 3)	0,89	0,23	-0,57	2,35
Tempo 30 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,10	0,87	-1,45	1,23
Tempo 30 (Grupo 1 - Grupo 3)	-1,28	0,06	-2,67	0,10
Tempo 30 (Grupo 2 - Grupo 3)	-1,17	0,11	-2,64	0,28
Tempo 45 (Grupo 1 - Grupo 2)	0,02	0,97	-1,32	1,37
Tempo 45 (Grupo 1 - Grupo 3)	-1,93	0,01	-3,46	-0,40
Tempo 45 (Grupo 2 - Grupo 3)	-1,95	0,01	-3,51	-0,39
Tempo 60 (Grupo 1 - Grupo 2)	0,15	0,81	-1,20	1,52
Tempo 60 (Grupo 1 - Grupo 3)	-0,52	0,49	-2,05	1,00
Tempo 60 (Grupo 2 - Grupo 3)	-0,68	0,38	-2,24	0,87
Tempo 75 (Grupo 1 - Grupo 2)	0,17	0,79	-1,20	1,56
Tempo 75 (Grupo 1 - Grupo 3)	-0,74	0,33	-2,28	0,79
Tempo 75 (Grupo 2 - Grupo 3)	-0,92	0,24	-2,49	0,64
Tempo 90 (Grupo 1 - Grupo 2)	-0,21	0,77	-1,68	1,26
Tempo 90 (Grupo 1 - Grupo 3)	-0,32	0,67	-1,88	1,23
Tempo 90 (Grupo 2 - Grupo 3)	-0,11	0,88	-1,70	1,47

Sendo: Grupo 1 = GB; Grupo 2 = GL; Grupo 3 = GS.

ANEXO G – Tabela dos resultados da análise pelo modelo de regressão linear com efeitos mistos para Colágeno

Tabela 9 - Comparações dos *tempos* e *locais* para a variável *Colágeno*

Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Local 1 (Tempo 1 - Tempo 2)	4,47	<0,01	1,53	7,42
Local 2 (Tempo 1 - Tempo 2)	3,49	0,02	0,54	6,43
Tempo 1 (Local 1 - Local 2)	0,19	0,89	-2,74	3,14
Tempo 2 (Local 1 - Local 2)	-0,78	0,59	-3,72	2,15

Sendo: Local 1 = Borda; Local 2 = Centro; Tempo 1 = 1º dia; Tempo 2 = 45º dia.

ANEXO H – Tabela dos resultados da análise pelo teste de *Poisson* para Fibroblastos

Tabela 10 - Comparações dos *tempos* e *locais* para a variável *Fibroblastos*

Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Tempo 1 (Local 1 - Local 2)	-4,52	0,01	-7,98	-1,05
Tempo 2 (Local 1 - Local 2)	-3,10	0,10	-7,01	0,81
Local 1 (Tempo 1 - Tempo 2)	-15,46	<0,01	-20,62	-10,30
Local 2 (Tempo 1 - Tempo 2)	-23,08	<0,01	-29,52	-16,65

Sendo: Local 1 = Borda; Local 2 = Centro; Tempo 1 = 1º dia; Tempo 2 = 45º dia.

ANEXO I – Tabela dos resultados da análise pelo teste de *Poisson* para Células Inflamatórias

Tabela 11 - Comparações dos *tempos* e *locais* para a variável *Células Inflamatórias*

Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Tempo 1 (Local 1 - Local 2)	44,67	<0,01	27,93	61,42
Tempo 2 (Local 1 - Local 2)	24,41	<0,01	14,87	33,94
Local 1 (Tempo 1 - Tempo 2)	-21,09	<0,01	-29,51	-12,66
Local 2 (Tempo 1 - Tempo 2)	48,00	<0,01	30,07	65,92

Sendo: Local 1 = Borda; Local 2 = Centro; Tempo 1 = 1º dia; Tempo 2 = 45º dia.

ANEXO J – Tabela dos resultados da análise pelo teste de *Poisson* para Vasos Sanguíneos

Tabela 12 - Comparações dos *tempos* e *locais* para a variável *Vasos Sanguíneos*

Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Tempo 1 (Local 1 - Local 2)	0,31	0,32	-0,39	1,03
Tempo 2 (Local 1 - Local 2)	1,25	0,01	0,37	2,14
Local 1 (Tempo 1 - Tempo 2)	-1,53	<0,01	-2,44	-0,61
Local 2 (Tempo 1 - Tempo 2)	0,04	0,89	-0,68	0,76

Sendo: Local 1 = Borda; Local 2 = Centro; Tempo 1 = 1º dia; Tempo 2 = 45º dia.