LUÍSIA NE DE ÁVILA SANTANA

Tratamento de Úlceras Venosas por Ultra-Som de Baixa
Intensidade: Avaliação por Análise de Imagem e
Imunohistoquímica

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

Orientador: Prof. Dr. José Marcos Alves

São Carlos

2006

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

S232t Santana, Luísiane de Ávila
Tratamento de úlceras venosas por ultra-som de baixa
intensidade : avaliação por análise de imagem e
imunohistoquímica / Luísiane de Ávila Santana -- São
Carlos, 2006.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de
São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/
Instituto de Química de São Carlos-Universidade de São
Paulo, 2006.

Área: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. José Marcos Alves.

1. Úlcera. 2. Ultra-som. 3. Análise de imagem.
4. Sulfadiazina de prata. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:
aos meus maravilhosos pais **Jussara e José Luiz**;
à minha querida irmã **Josiane** e
ao meu namorado, minha grande companhia **Leandro**.

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo: Deus

Por sempre iluminar meu caminho, dando-me grandes oportunidades.

Aos pacientes

Pela satisfação de poder fazer o bem.

À minha família

Pai, mãe e irmã, pelo carinho e confiança que depositaram em mim, mas principalmente por serem estas pessoas tão maravilhosas e me tratarem infinitamente bem.

Ao meu amor Leandro

Pela paciência, compreensão e conselhos nos momentos difíceis e, principalmente, por sempre estar ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Marcos Alves da EESC-USP

Pela confiança em mim depositada, acreditando em mim para a realização deste trabalho.

À Prof.Dra. Norma Tiraboschi Foss da FMRP-USP

Por incentivar e disponibilizar a infraestrutura da Divisão de Dermatologia da FMRP-USP para a realização deste trabalho.

Ao Prof.Dr. Marco Andrey Cipriani Frade da FMRP-USP

Pela co-orientação, carinho, incentivo, amizade e ensinamentos diários sobre cicatrização que vieram a enriquecer muito meu conhecimento.

Ao Prof.Dr. João Kazuyuki Kajiwara da FMRP-USP

Pelos ensinamentos e infraestrutura de software sobre análise de imagem, atenção e disposição em sempre me atender.

Ao Prof.Dr. Sérgio Britto Garcia da FMRP-USP

Pela importante contribuição nas análises de imunohistoquímica e histopatologia.

Ao Prof.Dr. Fernando de Queiróz Cunha e Prof.Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa da FMRP-USP

Pela importante colaboração nos procedimentos de imunohistoquímica e microscopia.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Clínica Médica/Divisão de Dermatologia da FMRP-USP

Por sempre me receberem com muito carinho.

Aos funcionários do Centro Saúde Escola (CSE) da FMRP-USP

Em especial as enfermeiras Shirlei e Daniela pela atenção.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - USP

Pelo carinho e colaboração.

Ao pessoal do "Laboratório de Farmacologia" da FMRP-USP

Por sempre me receberem com muita atenção.

Ao pessoal do "Laboratório de Patologia" da FMRP-USP

Em especial a Rose pela ajuda e disposição em me atender sempre com muito carinho.

Aos funcionários da "Oficina de Precisão" da FMRP-USP

Pela colaboração na realização deste trabalho.

À família Sanchez dos Reis

João Alberto, Sueli, Danilo, Carol, Rodrigo, Gi e Idavina, por sempre me acolherem.

À amiga Fernanda

Pelos conselhos e ajudas em todos os momentos em que precisei, mas principalmente pelo seu carinho e amizade.

Ao amigo Thiago

Pela colaboração da realização dos trabalhos de histologia e imunohistoquímica, realizados sempre com muita dedicação.

Às minhas amigas de república

Mirian e Mariana pela amizade e o carinho.

"...desconfie do destino e acredite em você.

Gaste mais horas realizando que sonhando,

fazendo que planejando,

vivendo que esperando.

Porque, embora quem quase morreu esteja vivo,

quem quase vive já morreu."

Sarah Westphal Batista da Silva.

RESUMO

SANTANA, L. A. Tratamento de Úlceras Venosas por Ultra-Som de Baixa Intensidade: Avaliação por Análise de Imagem e Imunohistoquímica. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

Úlceras de perna acometem as extremidades dos membros inferiores e são causadas por alguma disfunção do sistema vascular. A cicatrização das úlceras é um processo dinâmico que envolve fenômenos biológicos, bioquímicos e imunológicos. A avaliação clínica da evolução das úlceras é difícil e se baseia nas modificações teciduais como granulação, fibrina/esfácelo e reepitelização. A avaliação clínico terapêutica adequada compreende da avaliação da área das úlceras e das áreas correspondentes aos diferentes tecidos presentes nas mesmas. Inúmeras são as opções terapêuticas objetivando a cicatrização das úlceras, envolvendo os mais variados estímulos imunobiológicos, sendo importante a avaliação imunohistoquímica da evolução do tratamento. Estudos anteriores demonstraram que o ultra-som de baixa intensidade (US) estimula a reparação tecidual de úlceras de perna. Com base nestes estudos esta investigação tem o objetivo de comparar a eficácia do ultra-som de baixa intensidade ($30\text{mW}/\text{cm}^2$) e de curativos diários á base de sulfadiazina de prata 1% na cicatrização de úlceras venosas, com as seguintes implementações: a) modificação da técnica de antisepsia para aplicação do ultra-som no tratamento das úlceras; b) padronização da técnica de captura da imagem das úlceras; c) utilização de nova técnica de quantificação do tratamento das úlceras e dos seus tecidos (granulação e fibrina/esfácelo) usando o software livre ImageJ[®] para quantificar a área da úlcera e dos seus tecidos; d) quantificação dos fatores de crescimento TGF- β e VEGF e da enzima iNOS nas biópsias iniciais e no 45° dia do tratamento das úlceras. Nesta investigação foram tratadas dezesseis úlceras de perna do tipo venosa no Ambulatório de Úlcera da Dermatologia do Centro Saúde Escola (CSE) – HCFMRP – USP. Elas foram divididas em dois grupos experimentais: Grupo 1 (7 úlceras) em que foi utilizado tratamento com curativos diários á base de sulfadiazina de prata 1%; Grupo 2 (9 úlceras) em que foi utilizado tratamento com US 3 vezes por semana seguido de curativos diários com gazes umedecidas com soro fisiológico ou

vaselina, conforme necessidade do paciente. Os pacientes tiveram um protocolo de 90 dias de tratamento e através de fotografias padronizadas as úlceras foram analisadas quantitativamente no início e a cada 15 dias de tratamento para o cálculo das áreas da úlcera, granulação e fibrina/esfácelo, através do ImageJ[®]. Uma película de látex (preservativo) e gel no cabeçote do transdutor causa pequena atenuação no ultra-som e melhora a assepsia do tratamento das úlceras. A técnica de quantificação da cicatrização de úlceras através de análise de imagem pelo software ImageJ[®] foi validada e comparada com técnicas convencionais de monitoramento do tratamento de úlceras. O cálculo da área das úlceras pelo ImageJ[®] tem um erro médio de 4,8% mas não há diferença estatística, por método não paramétrico, nos resultados de quantificação pelo software quando comparado às técnicas convencionais ou quando são utilizados métodos padronizados e não padronizados de captura das imagens. Não há influência da segmentação manual das imagens das úlceras por diferentes usuários nos resultados das análises realizadas pelo ImageJ[®]. Houve aumento, não estatisticamente significativo, na presença da enzima iNOS e dos fatores de crescimento TGF β e VEGF nas úlceras tratadas por ultra-som. Houve uma aceleração estatisticamente significativa na cicatrização das úlceras, na formação do tecido de granulação e na redução do tecido de fibrina/esfácelo do tratamento com ultra-som quando comparado ao tratamento com sulfadiazina de prata 1%.

Palavras chaves: úlcera, ultra-som, sulfadiazina de prata, análise de imagem

ABSTRACT

SANTANA, L. A. Treatment of venous ulcers by low intensity ultrasound: Assessment by Image Analysis and Immunohistochemistry. 2006. 126 f. Master Dissertation – Bioengineering Graduate Program, University of São Paulo at São Carlos, 2006.

Chronic venous ulcers affect inferior members due to some vascular system disorders. The healing process is dynamic and involves biological, biochemical and immunological phenomenon. The clinical follow up is difficult and based on tissue alterations like fibrin, granulation and new epithelization. The therapeutic and clinical follow up should take into account the ulcer area as well as the area of the ulcer tissues. A large number of therapeutic procedures are available to heal ulcers and they are based on immunological stimulus which makes important to investigate the immunohistochemistry response of the treatment. Previous studies shown that low intensity ultrasound (US) stimulates the tissue repair of leg ulcers. The aim of this investigation is to compare the effectiveness of the US treatment with respect to dressings of silver sulfadiazine 1% on the healing of venous ulcers using a different methodology for carrying out what follows: a) the improvement of US treatment asepsis; b) the capturing of the ulcers image with a standardized method; c) the image analysis with a freeware software (ImageJ®) to quantify the area of the ulcer and its tissues along the ulcer treatment. d) the quantification of the growth factors TGF- β e VEGF and the enzyme iNOS in biopsies taken on the first and 45th day of the treatment to assess the immunohistochemistry changes. In this investigation sixteen leg chronic venous ulcers were treated at the “Ulcer Outpatient Clinic of Dermatology”, Teaching Health Center, General Hospital, College of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo at Ribeirão Preto. The ulcers were randomly separated in two experimental groups: Group 1, 7 ulcers were treated with daily dressings of silver sulfadiazine 1%; Group 2, 9 ulcers were treated with low intensity ultrasound three times a week followed by daily dressings with humidified gauzes on physiologic sore or vaselin. The protocol last 90 days and photographs of the ulcers were taken every 15 days to quantify the area of the ulcer and its tissues (granulation and fibrin) through the ImageJ® software. A thin layer of latex (condom) and gel cause a small attenuation of the ultrasound energy and improves the asepsis of the

treatment. The image analysis technique using ImageJ[®] was validated and compared with conventional methods of monitoring ulcers treatment. The calculation of the ulcers area by the ImageJ[®] has an average error of 4,8%. There is no statistical difference in the results of monitoring ulcers treatment through this method and the conventional ones. The error of a standardized method for capturing the ulcers image did not show statistical difference when compared to a nonstandardized method. The manual segmentation of the ulcer image by different users do not influence the results of the image analysis by the ImageJ[®]. The increase in the enzyme iNOS and growth factors TGF β and VEGF in the ulcers treated by US is not statistically significant. There is a statistical significance in the treatment of ulcers by US when compared to dressings of silver sulfadiazine 1% with respect to area decrease and the formation of granulation and fibrin tissues. The low intensity ultrasound accelerates the healing process of the ulcers.

Key words: ulcer, ultrasound, silver sulfadiazine , image analysis

Lista de Tabelas

Tabela		Pág.
4.1	Influência da Película de Látex	75
4.2	Dados populacionais do grupo 1 (SDZ) e do grupo 2 (US)	76
4.3a	Razão r_1 das úlceras de perna do grupo 1 (SDZ)	81
4.3b	Razão r_1 das úlceras de perna do grupo 2 (US)	82
4.4	Evolução de r_1 com o tempo	83
4.5a	Razão r_2 das úlceras de perna do grupo 1(SDZ)	84
4.5b	Razão r_2 das úlceras do grupo 2 (US)	85
4.6a	Razão r_3 das úlceras do grupo 1(SDZ)	86
4.6b	Razão r_3 das úlceras do grupo 2 (US)	87
4.7	Análise imunohistoquímica das biópsias das úlceras segundo a área marcada de iNOS, TGF β e VEGF no 1 ^o dia e 45 ^o dia de tratamento nas úlceras dos pacientes do Grupo 1 (SDZ) e Grupo 2 (US)	88
4.8	Valor Médio da massa do papel com área padrão de 1cm ²	89
4.9	Validação da Medida da Área	90
4.10	Comparação entre Câmara Digital e Método Manual	91
4.11	Comparação entre Técnica Convencional e ImageJ [®]	91
4.12	Comparação entre método padronizado e não padronizado	92
4.13	Influência Humana no uso do Software ImageJ [®]	93
4.14	Resultados Estatísticos da Análise das Áreas das Úlceras	95
4.15	Resultados Estatísticos da Análise da Imunohistoquímica	96
4.16	Estudos 1 a 3 - Resultados Estatísticos	97
4.17	Estudo 4 - Resultados Estatísticos	98
4.18	Estudo 5 - Resultados Estatísticos	98

Lista de Tabelas (continuação)

Tabela		Pág.
8.1a	Evolução das áreas das úlceras de perna do grupo 1(SDZ)	124
8.1b	Evolução das áreas das úlceras de perna do grupo 2 (US)	124
8.2a	Evolução das áreas do tecido de granulação do grupo 1 (SDZ)	125
8.2b	Evolução das áreas do tecido de granulação do grupo 2 (US)	125
8.3a	Evolução das áreas do tecido de fibrina do grupo 1 (SDZ)	126
8.3b	Evolução das áreas do tecido de fibrina do grupo 2 (US)	126

Lista de Figuras

Figura		Pág.
2.1	Camadas da Pele	25
3.1	Tratamento de úlcera por ultra-som	59
3.2	Aparelho de ultra-som	59
3.3	Representação esquemática dos meios com impedância acústica	60
3.4a	Aparelho para câmera fotográfica	64
3.4b	Ilustração da utilização do aparelho	64
3.5	Foto padronizada para análise de imagem	64
3.6	Programa ImageJ®	65
3.7a	Ícone do <i>Plugin polygon</i>	66
3.7b	Ícone do <i>Plugin rectangular</i>	66
3.8	Úlcera segmentada	66
3.9	Imunohistoquímica segmentada	66
3.10a	<i>Plugin threshold_colour</i>	67
3.10b	Exemplo de uma imagem de úlcera com seleção de fibrina	67
3.11	Imagem real da ferida	67
3.12	Imagem com seleção de fibrina e imagem com seleção de granulação, respectivamente	67
3.13a	Imagem real da imunohistoquímica	68
3.13b	Imagem da imunohistoquímica em escala de cinza na cor verde	68
3.14	<i>Plugin threshold</i>	69
3.15	Imagem com seleção da cor cobre	69
3.16	Seleção de área de fibrina	69
3.17	Seleção de área da cor cobre	69

Lista de Figuras (continuação)

Figura		Pág.
4.1a	Seguimento clínico fotográfico dos pacientes do Grupo 1	77
4.1b	Seguimento clínico fotográfico dos pacientes do Grupo 1	78
4.2a	Seguimento clínico fotográfico dos pacientes do Grupo 2	79
4.2b	Seguimento clínico fotográfico dos pacientes do Grupo 2	80
8.1	Tissue Tek	120
8.2a	Frente do criostato	120
8.2b	Interior do criostato	120
8.3	Cortes das peças biopsiadas	121
8.4	Lâminas em PBS no agitador orbital	121
8.5	Cortes sendo pipetados	122
8.6	Hematoxilina de Harris	123
8.7	Bateria de álcoois e xilóis	123

Lista de Gráficos

Gráfico		Pág.
4.1a	Razão r_1 das úlceras de perna do grupo 1 (SDZ)	81
4.1b	Razão r_1 das úlceras de perna do grupo 2 (US)	82
4.2a	Razão r_2 das úlceras de perna do grupo 1(SDZ)	84
4.2b	Razão r_2 das úlceras do grupo 2 (US)	85
4.3a	Razão r_3 das úlceras do grupo 1(SDZ)	86
4.3b	Razão r_3 das úlceras do grupo 2 (US)	87

Sumário

	Pág.
	Resumo
	Abstract
	Lista de Tabelas
	Lista de Figuras
	Lista de Gráficos
1	Introdução 19
1.1	Objetivos 21
2	Revisão Bibliográfica 22
2.1	Anatomia da Pele 23
2.1.1	Epiderme 23
2.1.2	Derme 23
2.2	Fisiologia da Pele 25
2.2.1	Sistema Imune 25
2.2.1.1	Mecanismo efetores da resposta imune 28
2.3	Úlcera de Perna do Tipo Venosa 29
2.4	Cura e Reparo Tecidual 32
2.4.1	Regeneração 32
2.4.2	Cicatrização 33
2.5	Morfometria das Úlceras 37
2.6	Tipos de Tratamento 38
2.7	O Ultra-som 40
2.7.1	Bases Físicas do Ultra-som 41

Sumário (continuação)

	Pág.
2.7.1.1	Produção e Transmissão 41
2.7.2	Características das Ondas Ultra-sônicas 42
2.7.3	Modos de Propagação 43
2.8	Interação do Ultra-som com os Tecidos 43
2.8.1	Impedância Acústica 43
2.8.1.1	Reflexão e Refração 44
2.8.1.2	Atenuação 44
2.8.1.3	Campo Ultra-sônico 45
2.8.2	Efeitos Biológicos do Ultra-som 45
2.8.2.1	Efeito Térmico 45
2.8.2.2	Efeito não Térmico 46
2.8.2.3	Forças de Radiação 47
2.9	Ultra-som em Regeneração Óssea 47
2.10	Efeitos do Ultra-som em Tecido Mole 49
2.11	Sulfadiazina de prata 54
2.11.1	Sulfadiazina de prata 1% no Tratamento das Úlceras de Perna 55
3	Metodologia 56
3.1	Seleção dos Pacientes 57
3.2	Padronização dos Grupos 58
3.3	Técnica de Tratamento 58
3.3.1	Transdutor Ultra- Sônico 59
3.4	Assepsia da Úlcera 62

Sumário (continuação)

	Pág.
3.5	Avaliação Clínica 62
3.6	Avaliação Clínico Fotográfica 62
3.6.1	Captura da Imagem 63
3.7	Detalhamento da Análise de Imagem 64
3.8	Estudo Imunohistoquímico 69
3.9	Parâmetros Quantificados 70
3.10	Testes de Validação do ImageJ® 71
3.11	Análise Estatística 73
4	Resultados 74
4.1	Efeito da Camada de Látex na Transmissão do Ultra-som 75
4.2	Dados Populacionais 75
4.3	Quantificação das Áreas das Úlceras e das Razões r_1 , r_2 e r_3 76
4.4	Imunohistoquímica 88
4.5	Testes de Validação e Comparação do software ImageJ® 89
4.6	Resultados Estatísticos 93
5	Discussão 99
6	Conclusão 105
7	Referências Bibliográficas 107
8	Anexos 116

1. Introdução

A úlcera venosa é causada principalmente por uma insuficiência venosa crônica, termo descrito como síndrome dos membros inferiores e que representa a incapacidade de manutenção do equilíbrio entre o fluxo de sangue arterial que chega ao membro inferior e o fluxo venoso que retorna ao átrio direito, decorrente da incompetência do sistema venoso superficial e/ou profundo (BARROS, 2000; PITTA *et al.*, 2000).

Inúmeras são as formas de tratamento que ajudam na cicatrização, dentre elas a sulfadiazina de prata 1% que possui ação bactericida e bacteriostática, destruindo e impedindo a proliferação dos microorganismos (WARD; SAFLE, 1995). Diversos estudos demonstraram os benefícios da sulfadiazina de prata a 1% no tratamento tópico de lesões ulceradas de diversas etiologias, tais como úlceras venosas (BISHOP; COLS, 1992), e úlceras de decúbito (HINDRYCKX *et al.*, 1990; KUCAN *et al.*, 1981).

A estimulação ultra-sônica da regeneração óssea (EURO) é uma técnica não invasiva de tratamento de fratura (DUARTE, 1983) que motivou estudos em animais e clínicos no Brasil e no exterior sobre os efeitos do ultra-som de baixa intensidade na cicatrização de úlceras tróficas da pele (HILÁRIO, 1993; ANASTÁCIO *et al.*, 2000), na qualidade óssea (ARAI *et al.*, 1993;), na osseointegração de implantes (TANZER *et al.*, 1995), no reparo ósseo em artrodese de coluna (GLAZER *et al.*, 1998) e no tratamento de fraturas mandibulares (VICENTE *et al.*, 2000). O uso de ultra-som, como recurso terapêutico em úlceras tróficas, baseia-se em pesquisas com evidências consideráveis de que esse pode estimular a reparação tecidual e melhorar o desempenho mecânico do tecido cicatricial resultante. O real efeito do ultra-som sobre os tecidos ainda é pouco conhecido.

Os resultados satisfatórios relatados em pesquisa sobre o uso do ultra-som de baixa intensidade no tratamento de úlceras tróficas (HILÁRIO, 1993; ANASTÁCIO, 2000) estimularam a realização do estudo clínico dessa dissertação buscando-se avaliar quantitativamente os resultados terapêuticos através de análise de imagem e imunohistoquímica para um melhor entendimento do mecanismo de ação do ultra-som na cicatrização.

1.1 Objetivos

- Avaliação da eficácia do ultra-som pulsátil de baixa intensidade (US) na indução da cicatrização de úlceras venosas, comparando ao tratamento convencional de sulfadiazina de prata 1%.
- Avaliação do efeito do uso de uma película de látex (condon) no cabeçote do transdutor de US com relação à atenuação da energia ultra-sônica.
- Padronização da técnica de captura de imagem para o seguimento clínico terapêutico das úlceras de perna.
- Utilização de análise de imagem, através de um software de domínio público, para a quantificação da área das úlceras e das áreas correspondentes aos tecidos das mesmas (esfácelo/fibrina e granulação) nos períodos de pré e pós-tratamento.
- Quantificação por análise de imagem dos fatores de crescimento TGF- β e VEGF e da enzima iNOS por método imunohistoquímico nas biópsias das úlceras no início do tratamento e no 45º dia de tratamento.

2. Revisão Bibliográfica

2. 1 Anatomia da Pele

2.1.1 Epiderme

A epiderme é a parte mais externa da pele. Ela consiste em uma só camada de células colunares denominada de células basais. As células basais se dividem para formar queratinócitos, que correspondem à camada espinhosa. Os queratinócitos sintetizam proteínas insolúveis, que permanecem na célula e finalmente se tornam um componente importante (o estrato córneo) (figura 2.1). Há três tipos de células dentríticas na epiderme: o melanócito, que sintetiza pigmento (melanina); célula Langerhans, que serve como elemento da linha de frente nas reações imunes da pele e os corpúsculos de MerKel, cuja função não está claramente definida, mas parecem estarem relacionados à sensibilidade tátil (HABIF, 2005).

2.1.2 Derme

Segundo Zorn (2004), a derme é caracterizada pelo tecido conjuntivo, o qual envolve diversos tipos de células que se localizam num abundante material fibroso intercelular sintetizado pelas células e por suas funções de sustentações, preenchimento, defesa e nutrição. O tecido conjuntivo subdivide-se em tecidos conjuntivos frouxo, denso e especializado (figura 2.1).

As fibras elásticas que compõem o tecido conjuntivo são compostas principalmente de elastina, uma proteína capaz de distender-se em duas dimensões. Estas fibras cedem facilmente a trações mínimas, porém retornam

facilmente a sua forma original. O colágeno é uma proteína fibrosa estrutural, encontrada nos tendões, na pele, nos vasos sanguíneos, nos ossos e nas cartilagens. Na pele, no entanto, os feixes de colágeno dispõem-se na forma de uma rede tridimensional, com os feixes se entrecruzando de modo que uma força aplicada em qualquer direção da pele será transmitida sempre como uma força de tração aos feixes de fibras de colágeno (VIDAL; MELLO, 1987; ZORN, 2004).

Os fibroblastos são as células mais abundantes do tecido conjuntivo e os principais responsáveis pela síntese de fibras colágenas.

O tecido conjuntivo é constituído também pela substância fundamental amorfa, uma mistura complexa de proteínas que preenche o espaço entre as células e as fibras do tecido. As proteoglicanas são capazes de incrementar o depósito de colágeno e reconstituir a matriz extracelular. As glicosaminoglicanas têm a função de sustentação e transporte molecular e também atuam na produção do colágeno. As glicoproteínas desempenham um grande papel não somente na interação entre células vizinhas, como também ajudam as células a aderirem sobre seus substratos.

No tecido conjuntivo encontram-se diversos tipos de células de defesa importantes no processo inflamatório. Os macrófagos são células de defesa com grande capacidade de fagocitose, atuam como elemento de defesa fagocitando restos de células, bactéria e partículas inertes que penetram no organismo. Os mastócitos são representados por grânulos citoplasmáticos constituídos de histamina que tem a função de aumentar a permeabilidade vascular e heparina, uma substância anticoagulante. A superfície do mastócitos contém receptores específicos para o anticorpo. Os plasmócitos aparecem em grande quantidade na inflamação crônica e são os responsáveis pela produção de anticorpos. Os

leucócitos são células que circundam intimamente os vasos sanguíneos e quando necessário migram para o tecido conjuntivo. As células adiposas se tornam especializadas no armazenamento de energia. (ZORN, 2004; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Figura 2.1 - Camadas da pele (ROSS; REITH. Histologia Texto e Atlas. p. 354. 1993)

2.2 Fisiologia da Pele

2.2.1 Sistema Imune

Ao se mencionar a cicatrização torna-se importante descrever o sistema imune.

O Sistema imunitário é formado por estruturas individualizadas: linfónodos e baço; células livres, como os linfócitos e granulócitos; células do sistema mononuclear fagocitário, presentes no sangue, na linfa e no tecido conjuntivo. Outro componente importante deste sistema são as células apresentadoras de antígenos, encontradas em muitos locais, como a pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004a).

As organizações anatômicas das células e dos tecidos do sistema imune têm uma importância crítica para a geração das respostas imunes. Essa organização permite que o pequeno número de linfócitos específicos localize o antígeno específico e responda eficazmente, independente do local do corpo onde o antígeno tenha sido introduzido (ABBAS *et al.*, 2003).

A pele, graças aos componentes dérmicos participantes do SRE (sistema retículo endotelial), é um órgão de grande atividade imunológica, onde os componentes da imunidade humoral e celular atuam intensamente, motivo pelo qual, hoje, grande quantidade dos testes imunológicos, bem como práticas imunoterápicas, são estudadas na pele.

O sistema imunitário no seu conjunto é a segunda linha de defesa do organismo, cuja primeira barreira é constituída pela pele e mucosas, que tem um papel de defesa mecânica e química através da própria constituição do epitélio e das secreções (RIVITTI, 2001).

As células de Langerhans da epiderme são conhecidas como células apresentadoras de antígeno, elas apresentam os antígenos às células T e também são capazes de estimular células T que ainda não entraram em contato com qualquer antígeno.

Os antígenos que penetram na pele são captados por células de Langerhans e transportados, via vasos linfáticos, para o linfonódo da região ou para o baço, onde se inicia uma resposta imune contra o antígeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004b).

A resposta imunitária envolve, fundamentalmente, dois sistemas: a imunidade inata e a imunidade adquirida. O primeiro consiste de mecanismos que existem antes da inflamação. Ela proporciona as linhas iniciais de defesa contra os microorganismos. Os principais componentes da imunidade inata são as barreiras

físicas e químicas, tais como epitélios e substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais; as células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) e células matadoras naturais (NK); as proteínas do sangue, incluindo os membros do sistema complementar e outros mediadores da inflamação; as proteínas chamadas citocinas, que regulam e coordenam muitas das atividades das células da imunidade inata.

A imunidade adquirida consiste dos mecanismos de defesa mais altamente evoluídos, são estimulados pela exposição aos agentes infecciosos e aumenta em magnitude a capacidade defensiva em cada exposição sucessiva a um microorganismo em particular. Os principais componentes são os linfócitos, os quais expressam receptores de antígenos. Os linfócitos B fazem parte da imunidade humoral, eles podem se diferenciar em células que sintetizam e secretam anticorpos ativamente e os linfócitos T fazem parte da imunidade celular (RIVITTI, 2001; ABBAS *et al.*, 2003).

Os linfócitos B e T expressam receptores para antígenos altamente distintos e específicos, que são operacionalmente definidos por duas características fundamentais: a) capacidade de induzir a resposta imune; b) capacidade de reagir especificamente com os anticorpos ou linfócitos sensibilizados resultantes da imunização (BIER *et al.*, 1982).

Tanto os linfócitos B quanto os linfócitos T originam-se de um precursor comum na medula óssea. O desenvolvimento das células B processa-se na medula óssea, enquanto que os precursores das células T migram para o timo e lá amadurecem. Depois do amadurecimento, as células B e T deixam respectivamente a medula óssea e o timo, entram na circulação e vão povoar os órgãos linfóides periféricos (ABBAS *et al.*, 2003).

Os linfonodos ou gânglios linfáticos também fazem parte do sistema imune. Eles são encontrados na axila, virilha, ao longo dos grandes vasos do pescoço e em grande quantidade no tórax e no abdômen.

A circulação da linfa no linfonodos é unidirecional. Ela atravessa os linfonodos penetrando nos vasos linfáticos que desembocam no órgão (vasos aferentes) e saindo pelos linfáticos do hilo (vasos eferentes).

O linfonodo é dividido por três regiões, sendo duas as mais importantes, a cortical superficial que apresenta células como os linfócitos B, ocorrendo também alguns plasmócitos, macrófagos e células foliculares dentríticas e a região cortical profunda ou paracortical, nela predominam os linfócitos T, ao lado de células reticulares, e alguns plasmócitos e macrófagos.

Os linfonodos são filtros da linfa, removendo partículas estranhas antes que a linfa retorne ao sistema circulatório sanguíneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004a).

2. 2.1.1 Mecanismo Efetores da Resposta Imune

As citocinas constituem uma família de proteínas que medeiam muitas das respostas da imunidade inata e adquirida. As mesmas citocinas podem ser produzidas por muitos tipos celulares. As citocinas são sintetizadas em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos e em geral atuam localmente, de modo autócrino ou parácrino, pela ligação de receptores de alta afinidade nas células-alvo. Algumas citocinas podem ser produzidas em quantidade suficiente para circular e exercer ações endócrinas. Para muitos tipos celulares, as citocinas servem como fatores de crescimento.

As citocinas que medeiam a imunidade inata são produzidas principalmente pelos macrófagos ativados e incluem: citocinas TNF e IL-1 que são mediadores de reações inflamatórias agudas aos microrganismos; as quimiocinas recrutam os leucócitos para os sítios de inflamação; citocinas IL-12 estimulam a produção da citocina IFN- γ ativadora de macrófagos; os IFNs tipo I são citocinas antivirais e citocinas IL-10 são inibidores de macrófagos. Essas citocinas funcionam nas respostas imunes inatas a diferentes classes de microrganismos.

As citocinas que medeiam e regulam as fases de ativação e efectoras da imunidade adquirida são produzidas principalmente por linfócitos T antígeno-estimulados, e incluem: citocina IL-2 que é o principal fator de crescimento das células T; citocina IL-4 que estimula a produção de IgE e o desenvolvimento das células Th2 a partir das células T auxiliares virgens; citocina IL-5 que ativa os eosinófilos; citocina IFN- γ é um ativador dos macrófagos; citocina TGF- β que inibe a proliferação dos linfócitos T e ativação dos leucócitos.

Assim, as citocinas exercem muitas funções essenciais na defesa do hospedeiro contra patógenos e proporcionam ligações entre a imunidade inata e adquirida. A administração de citocinas ou de seus inibidores representa uma abordagem potencial para a modificação das respostas biológicas associadas a doenças imunes e inflamatórias (ABBAS *et al.*, 2003).

2.3 Úlcera de Perna do Tipo Venosa

As úlceras de perna podem ser classificadas de acordo com a sua etiologia em venosas, arteriais, neuropáticas dentre outras. Em um estudo clínico com uma

população de 124 de pacientes com úlcera de perna, 68% dos pacientes tinham úlcera venosa (FRADE *et al*, 2001).

A idade (idosos), sexo (feminino), raça, obesidade, número de gestações, profissão (ortostatismo prolongado), constipação intestinal, vulnerabilidade das pernas a traumas e infecções, aumento da pressão venosa, diminuição do fluxo arterial e história familiar, são desencadeantes das varizes primárias (MAFFEI, 2002).

As úlceras venosas são causadas principalmente por uma insuficiência venosa crônica, termo descrito como síndrome dos membros inferiores e que representa a incapacidade de manutenção do equilíbrio entre o fluxo de sangue arterial que chega ao membro inferior e o fluxo venoso que retorna ao átrio direito decorrente da incompetência do sistema venoso superficial e/ou profundo, com sintomas como edema, pigmentação, dor e incapacidades (BARROS, 2000; PITTA *et al.*, 2000). Em pessoas normais a pressão diminui durante os exercícios, já em pacientes com incompetência venosa a pressão permanece alta durante o esforço.

As úlceras venosas se caracterizam principalmente por edema, pigmentação escurecida, veias varicosas e lipodermatoesclerose (endurecimento e fibrose na derme e tecido subcutâneo) nos membros inferiores (PHILLIPS *et al.*, 1991).

Poucos são os trabalhos publicados sobre a prevalência de úlceras de perna no Brasil. Maffei *et al.* (1986) em um estudo na região de Botucatu (SP), encontraram alta frequência de úlcera venosa nos pacientes varicosos, freqüentemente desencadeadas por traumas. Os autores atribuíram esta alta frequência à ausência de tratamento e pouco cuidado com esses pacientes na população de nível socioeconômico baixo. Na região de Belo Horizonte (MG),

Cabral (2000) também encontrou alta prevalência (2,6%) de úlceras venosas cicatrizadas ou abertas. Frade *et al.* (2001) avaliaram 124 pacientes da cidade de Juiz de Fora (MG) com o objetivo de traçar um perfil clínico – epidemiológico dos pacientes com úlceras de perna, avaliando os tipos mais freqüentes de úlcera, doenças associadas e o perfil sócio-econômico. Verificaram que a média de idade era 62,6 anos predominando sexo feminino (65,3%) e renda menor que R\$540,00 (86,8%). Associavam-se às úlceras, insuficiência venosa (74,2%), hipertensão arterial sistêmica (HAS) (51,6) e diabetes melitus (20,2%). As úlceras foram classificadas como venosa (67,8%), hipertensivas (20,1%), mistas e outras (12,1 %). Elas acometiam preferencialmente o terço distal das pernas, 40% do tamanho médio (2 a 5 cm²) e 35,6% grande (>5cm²) e eram acompanhadas, principalmente, de hiperemia (92,5%), lipodermatoesclerose (68,8%) e varicosidades (67,7%), com duração média de 94, 2 meses e 50% recidivantes. Todos os pacientes avaliados faziam curativos comunitários (em casa ou nos centros de atendimento à saúde), sendo curativos demorados e dispendiosos.

Trabalhos como o de Maffei *et al.* (1986), Cabral (2000) e Frade *et al.* (2001) mostraram a cronicidade e a importância da doença úlcera de perna na sociedade atual, o que instiga novas investigações sobre novos tratamentos para as mesmas, principalmente as venosas, com o intuito de melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

2. 4 Cura e Reparo Tecidual

A reação do organismo frente a lesões que levam a uma solução de continuidade tecidual inicia-se precocemente com o processo inflamatório e ao final leva à regeneração ou à cicatrização dos tecidos lesados.

A reparação não pode ser considerada exclusivamente pela regeneração das células parênquimatosas, mesmo naqueles órgãos cujas células são capazes de regeneração. Assim, ocorrem tentativas de reparar a lesão tecidual mediante a substituição de células parênquimatosas não regeneradas por tecido conjuntivo, que com o tempo, produz fibrose e formação da cicatriz. Existem quatro componentes nesse processo: formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), migração e proliferação de fibroblastos, deposição de matriz extracelular, maturação e organização do tecido fibroso, também conhecido como remodelagem (MITCHELLI, 2005).

2.4.1 Regeneração

A regeneração corresponde à substituição das células parenquimais do mesmo tipo, com o propósito de recuperar a estrutura e a função do tecido original, deixando pouco ou nenhum vestígio da lesão inicial. Para que ocorra uma regeneração do tecido lesado, a arquitetura do tecido conjuntivo tem que estar intacta. Embora as células lábeis e estáveis sejam capazes de regeneração, o arcabouço ou estroma de apoio das células parenquimais deve estar presente para permitir uma reconstituição perfeita da estrutura tecidual.

No entanto, após o nascimento do ser humano, o organismo falha em seu objetivo final de neoformar (regenerar) o tecido lesado, ocorrendo então o chamado reparo tecidual ou cicatrização (MITCHELLI, 2005).

2.4.2 Cicatrização

Ao contrário da regeneração, a cicatrização ocorre se a estrutura da matriz extracelular estiver danificada, causando alterações na arquitetura tecidual.

As arquiteturas da matriz extracelular são essenciais à cicatrização da ferida, pois elas fornecem a estrutura para migração celular e mantêm a polaridade celular correta para a remontagem das estruturas de multicamadas. Além disso, as células na matriz extracelular (fibroblastos, macrófagos e outros tipos de células) são as fontes de agentes críticos à reparação tecidual.

A cicatrização consiste na reposição do tecido normal por tecido conjuntivo fibroso no local de um traumatismo. É representada por uma seqüência de eventos moleculares que objetivam restaurar o tecido que sofreu injúria (PICCINATO *et al.*, 2003).

No processo de cicatrização da ferida está envolvida uma série de fases, que ocorrem simultaneamente durante o reparo. Porém são divididas didaticamente como: injúria, coagulação, inflamação, formação tecidual e remodelagem tecidual (ARNOLD; WEST, 1991; KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993).

Injúria

A lesão tecidual promove dano vascular que cursa com extravasamento sanguíneo, preenchendo a área lesada com plasma, elementos celulares (plaquetas) e proteínas plasmáticas (fibrinogênio e fibronectina). As células lesadas

na injúria vão produzir citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e os fatores de transformação do crescimento beta e alfa (TGF β e TGF α) (KARUKONDA *et al.*, 2000).

Coagulação

Ocorre logo após a injúria. Os vasos lesionados contraem-se, para prevenir qualquer perda subsequente de sangue, neste mesmo instante, juntamente com a coagulação sanguínea, ocorre o fenômeno de agregação plaquetária no local, resultando na formação de um coágulo fibrinoso que ocupa os espaços causados pela injúria.

As plaquetas extravasadas aderem ao colágeno no espaço perivascular, onde a trombina (proteína) induz a degranulação das plaquetas liberando PDGF, TGF β , TGF α , fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGFs) e fator de crescimento “insulin-like” (ILGF-1) (CHETTIBI; FERGUSON, 1999; KARUKONDA *et al.*, 2000).

Os neutrófilos são as primeiras células migrantes que se dirigem para o leito da ferida. Sua função é fagocitar e eliminar qualquer bactéria presente na área.

Logo após os neutrófilos, os macrófagos derivados de monócitos começam a acumular-se no local da injúria. Seu papel é ser coadjuvante aos neutrófilos na fagocitose de microrganismos e debris teciduais, bem como na remoção de neutrófilos exauridos (CHETTIBI; FERGUSON, 1999; ARNOLD; WEST, 1991).

Inflamatória

Ocorre de 1 à 5 dias após a injúria. Durante a inflamação as células predominantes são: neutrófilos, macrófagos e linfócitos.

A inflamação é fundamentalmente uma resposta de proteção, mas pode ser potencialmente nociva.

Os neutrófilos iniciam o processo de destruição de antígenos e a cicatrização propriamente dita. São os primeiros produtores de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1 β) e também liberam o fator de crescimento TGF β .

Os macrófagos têm função antimicrobiana e de fagocitose, proporcionada pelo óxido nítrico e radicais de oxigênio, desbridamento da ferida (fagocitose, collagenase e elastase), regulação da síntese da matriz, liberando diversos fatores de crescimento como: PDGF, TGF β , FGF, ILGF-1, TGF α , interleucinas 1 (IL-1 β), EGF, fator de necrose tumoral (TNF α), além de recrutamento e ativação das células e angiogênese.

Esta fase estimula a enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) a produzir Óxido nítrico (NO), pois o iNOS é estimulado pelas citocinas pró-inflamatórias. Esta enzima é importante na cicatrização para ajudar no desbridamento da ferida. Porém, quando exagerado, pode levar a cronicidade da úlcera (CHILDRESS; STECHMILLER, 2002).

Os linfócitos também liberam o TGF β , além do interferon (IFN) e das interleucinas 2 (IL-2) (CHETTIBI; FERGUSON, 1999; ARNOLD; WEST, 1991; KARUKONDA *et al.*, 2000).

Formação Tecidual

Ocorre entre o 3° e 12° dia após a injúria. A reepitelização é iniciada pela migração de células epiteliais desde as margens da ferida. Os estímulos responsáveis por essa migração são os mesmos atuantes nos fibroblastos, principalmente o EGF (BURGESS, 1989). Além disso, a contração da ferida começa a fazer com que suas margens se aproximem mais (KARUKONDA *et al.*, 2000).

Com a ativação de macrófagos na ferida e com a elaboração de fatores de crescimento específicos, a matriz extracelular pode começar a ser substituída por

um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. O principal componente de uma cicatriz de tecido conjuntivo maduro é o colágeno, assim, na ferida em processo de cura, fibroblastos produtores de colágeno são recrutados das margens da ferida por estímulo de fatores de crescimento de fibroblasto (b FGF) e $TGF\beta$, e são induzidos a sintetizar o colágeno, num processo coletivo conhecido como fibroplasia.

A fibroplasia tem início pela formação de tecido de granulação no espaço do ferimento. Esse tecido consiste de uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina, e ácido hialurônico contendo macrófagos, fibroblastos, e vasos recém-formados e exsudativos, sendo o principal componente do tecido de granulação o grande número de vasos e os fibroblastos (WITTE; BARBUL, 1997).

A neovascularização (angiogênese) ocorre simultaneamente com o crescimento centrípeto dos fibroblastos a partir das margens da ferida. Vários fatores de crescimento e citocinas parecem estar envolvidos com a angiogênese, tais como FGF (α e β), EGF, $TGF\alpha$, PDGF, $TGF\beta$, VEGF, fatores de crescimento de células endoteliais derivados de plaquetas (PDEGF) e peptídeo regulador de afinidade da heparina (HARP) dentre outros (ARNOLD; WEST, 1991).

O acúmulo de colágeno final depende de uma disposição bem ordenada entre o aumento da síntese colagenosa e a diminuição da sua degradação, isto é, a harmonia entre a síntese do colágeno novo e a degradação do colágeno velho no local da lesão. Isso faz com que o tecido ricamente vascularizado se transforme em um tecido avascular e empalidecido (MITCHELLI, 2005).

Remodelagem Tecidual

Ocorre a partir do 3º dia com duração de meses ou anos. É durante essa fase que a cicatriz da ferida adquire sua máxima resistência, porém esse processo é lento, havendo necessidade de muitos meses e até mesmo anos. Ainda assim uma

cicatriz cutânea completamente madura tem apenas 70% da resistência da pele normal.

Nessa fase os colágenos tornam-se as proteínas predominantes da cicatriz, a qual tem como principal característica a deposição do mesmo na ferida.

A atividade das collagenases é controlada pelas citocinas. As principais citocinas envolvidas nessa fase são $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, PDGF, $TGF\beta$ produzidas pelos fibroblastos, além das produzidas pelas células epiteliais como EGF e $TGF\beta$. Portanto, a remodelagem da síntese da matriz depende de uma interação entre os fibroblastos ativados e os fibroblastos que migram e proliferam.

À medida que ocorre a remodelagem da cicatriz, as fibras de colágeno ficam orientadas paralelamente às forças direcionais aplicadas sobre elas (KARUKONDA *et al.*, 2000; WITTE; BARBUL, 1997).

2.5 Morfometria das Úlceras

A área de pesquisa que envolve o uso de ferramentas computacionais para auxílio ou acompanhamento do diagnóstico em lesões dermatológicas ainda é muito recente. A obtenção de imagem digitalizada das úlceras a partir de fotografias e scanner pode representar uma forma qualitativa de análise evolutiva das úlceras. Para uma análise quantitativa são necessários programas analisadores de imagem, porém, até recentemente isso se constituía em um obstáculo devido ao alto custo dos mesmos. O advento de câmeras digitais de preços acessíveis e de programas de análise de imagem disponíveis gratuitamente na rede facilitou o desenvolvimento de técnicas de análise morfométrica das úlceras de pele.

A literatura descreve técnicas para análise de evolução das úlceras (GOIHMAN-YAHR, 1997; SHAI; MAIBACH, 2005):

Medida do máximo comprimento e largura: Duas folhas plásticas superpostas são colocadas sobre a úlcera para delineamento da área. A folha inferior, em contato com a úlcera, é descartada. A partir do desenho da úlcera na folha superior são traçados segmentos entre os pontos de maior distância longitudinal e transversal da área. Cada segmento é medido com auxílio de uma régua e os valores são utilizados para calcular a área superficial da úlcera através de uma aproximação por uma área retangular ou elíptica..

Medida de área com papel milimetrado: Utiliza-se um procedimento idêntico ao da técnica anteriormente descrita para o delineamento da área. Um papel milimetrado é colocado sob a folha plástica superior para a medida da área da úlcera através da contagem de milímetros quadrados.

2.6 Tipos de Tratamento

No tratamento convencional é de extrema importância a conscientização do paciente na assepsia, higiene e assiduidade na troca de bandagens e curativos, pois o tratamento convencional consiste na aplicação de curativos hidrocolóides, bandagens, faixas de compressão elástica, aplicação de agentes tópicos no local e medicação por via oral (FISCHER, 1979).

A bandagem oclusiva traz benefícios na redução da dor, desbridamento suave e proteção das infecções, e pode também estimular a formação de tecido de granulação (FALANGA *et al.*, 1996).

Segundo Wiener *et al.* (1991), o tratamento por compressão é uma das importantes formas de terapia, indicado para reduzir o edema. No entanto, após 12 semanas, estudos controles não apresentam diferença entre curativos compressivos mais oclusão e curativos que utilizam apenas a compressão (CORDTS *et al.*, 1992).

As bandagens elásticas, por fazerem parte do tratamento conservador de úlceras de origem venosa, são mais comumente usadas nos grupos controles e experimentais associadas a outros métodos para análise da eficácia dos tratamentos (ORMISTON *et al.*, 1985).

As botas de Unna são bandagens semiflexíveis impregnadas com pasta de óxido de Zinco e protegem a úlcera de lesões externas e são trocadas semanalmente. Foi pesquisado em um trabalho o efeito do uso da bota de Unna em comparação com os efeitos dos curativos hidrocolóides, e os resultados foram significativos e favoráveis ao uso da Bota de Unna (RUBIN *et al.*, 1990).

O desenvolvimento de um novo material biocompatível, a base de látex natural extraído da seringueira *Havea brasiliensis* vem sendo pesquisado com sucesso desde 1994. Esse material foi desenvolvido pelo setor de Neuroquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo/Brasil (SOARES *et al.*, 2004)

A aplicação de agentes tópicos no local como curativos simples (vaselina, óleo mineral, sulfadiazina de prata e açúcar) e curativos mais complexos (hidrogel, filme transparente, carvão ativado, entre outros) tem vantagens, desvantagens,

indicações e contra-indicações. Existem opções terapêuticas muito sofisticadas, que apresentam bons resultados, no entanto, são curativos cuja maior desvantagem é o alto custo, estando distante da realidade sócio econômica da grande maioria da população com úlcera venosa.

Considerando a importância da multiplicidade de opções para a realização do tratamento, optou-se pela aplicação do ultra-som de baixa intensidade.

Os parâmetros clínicos ideais da eletroterapia ainda não foram definidos. Estudos em animais e humanos proporcionaram evidências de que a estimulação elétrica promove a cicatrização das feridas de uma maneira segura e efetiva. Pode também contribuir diminuindo o edema, estimular os fatores de crescimento, aumentar a circulação sanguínea, induzir a migração celular, inibir bactérias mostrando assim os benefícios para estimular a cicatrização das feridas (DAYTON *et al.*, 1989).

2.7 O Ultra-som

O som é uma forma de energia caracterizada pela vibração de moléculas de um meio. Propaga-se no ar, água, tecido, entre outros, através da transferência de energia vibracional de uma molécula para outra. Isto requer um meio deformável que pode ser gasoso, líquido ou sólido. Ainda que a molécula tenha deslocamento muito pequeno em relação à sua posição de repouso, o som é capaz de percorrer longas distâncias. O ouvido humano é capaz de perceber sons com frequências de até 20 KHz. O ultra-som é a energia sonora com frequência acima do limite de audição humana. A maioria das aplicações médicas utiliza frequências entre 1 e 10 Mhz (HAAR, 1978).

Na fisioterapia as variáveis do ultra-som são a frequência do campo, frequência de repetição e largura de pulso do sinal elétrico que excita o transdutor, a intensidade campo acústico e a duração do tratamento. A frequência, geralmente, varia de 1 a 3 MHz e a intensidade de 0,25 a 3 W/cm². Cada aplicação pode durar de 3 a 50 min (OKUNO *et al.*, 1986).

No passado verificou-se que o ultra-som produzia aumento da temperatura em tecidos biológicos e entre 1930 e 1940 ele foi introduzido na prática médica como um recurso terapêutico usado particularmente para produzir calor em tecidos profundos. De 1940 até os dias atuais o ultra-som tem sido usado em áreas médicas e industriais, e novos efeitos e aplicações pesquisados (OKUNO *et al.*, 1986)

2.7.1 Bases Físicas do Ultra-som

2.7.1.1 Produção e Transmissão

A técnica mais utilizada na construção de um dispositivo capaz de produzir ondas, o ultra-som (transdutor), baseia-se em um fenômeno estudado por Pierre e Marie Curie no final do século XIX denominado efeito piezoelétrico. Este pode ser observado em alguns materiais cristalinos, como o quartzo, que possui dipolos (regiões com cargas negativas e positivas) em suas moléculas. Em uma rede cristalina normal estes dipolos são aleatoriamente orientados e não podem migrar (HOOGLAND, 1986; KANH, 1991). Se o material é aquecido acima de uma temperatura denominada de temperatura de Curie, as moléculas podem mover-se livremente. Se um campo elétrico externo for aplicado ao material nessa

temperatura, a região negativa das moléculas orienta-se na direção do pólo positivo daquele campo e a região positiva em direção ao pólo negativo. Por razões térmicas os alinhamentos das moléculas não são paralelos ao campo. Quando o material é resfriado abaixo da temperatura de Curie, enquanto o campo elétrico é mantido, a orientação das moléculas não é alterada.

Com o novo arranjo das moléculas o material adquire uma nova propriedade denominada piezoeletricidade. As faces do cristal são metalizadas e quando uma tensão é aplicada nessas faces às moléculas movimentam-se de maneira que as cargas positivas são atraídas pelo eletrodo negativo e cargas negativas pelo eletrodo positivo. O cristal expande-se e contrai-se produzindo uma vibração mecânica que é o ultra-som (OKUNO *et al.*, 1986).

O ultra-som deve ser aplicado na pele através de um meio acoplador (géis, óleos e cremes) para evitar a reflexão da energia ultra-sônica na interface entre transdutor e a superfície de tratamento, eliminando assim o ar entre o transdutor e o tecido e transmitindo a energia ultra-sônica com eficiência (WILLIAMS, 1987; DYSON, 1990).

2.7.2 Características das Ondas Ultra-Sônicas

Segundo Dyson (1990) e Haar (1978), o *comprimento de onda* (λ) corresponde à distância entre regiões adjacentes de compressão ou de rarefação máxima, cujas partículas encontram-se em um mesmo estado de movimento, em um dado instante de tempo. A *amplitude* (A) do movimento oscilatório corresponde ao deslocamento máximo que uma partícula experimenta, a partir de sua posição de equilíbrio. O intervalo de tempo necessário para que uma partícula realize um ciclo

completo de movimento é definido como *período* (T). A *freqüência* (f) corresponde ao número de vezes que uma partícula realiza um ciclo oscilatório por unidade de tempo. A freqüência é o inverso do período da onda. A *velocidade* (C) de propagação da onda é à distância percorrida por uma partícula em uma unidade de tempo. Assim, a velocidade tem relação com o comprimento da onda segundo a equação $c = \lambda f$.

2.7.3 Modos de Propagação:

O modo de propagação da onda pode ser pulsado ou contínuo. Dependendo da duração de perturbação provocada no meio, pode-se produzir um pulso ou onda única, um trem de ondas ou uma sucessão contínua de ondas (OKUNO *et al.*, 1986).

No modo contínuo ocorre um depósito ininterrupto de energia sobre os tecidos irradiados. No modo pulsado, há interrupções freqüentes na propagação de energia, portanto há dois tipos de freqüência a serem consideradas: a freqüência da onda (f) citada anteriormente e a freqüência de repetição de pulsos (f_r) (KREMKAU, 1985).

2.8 Interação do Ultra-som com os Tecidos

2.8.1 Impedância Acústica

Impedância acústica (Z) é a capacidade que o meio tem de se opor à vibração de suas partículas, frente à passagem de ondas ultra-sônicas. É

considerada como constante, visto que, a velocidade do som no meio é basicamente constante dentro de uma larga faixa de frequências (WILLIANS, 1987).

Quando as impedâncias acústicas dos dois meios são similares, quase toda a intensidade incidente é transmitida. Por esse motivo para se obter um bom acoplamento as aplicações de ultra-som são feitas na água ou colocando-se gel entre o transdutor e a pele para obter um bom acoplamento (OKUNO *et al.*, 1986).

2.8.1.1 Reflexão e Refração

Quando uma onda sonora encontra uma interface entre dois meios diferentes, parte da energia é refletida e outra é refratada. A onda refletida retorna em sentido negativo através do meio incidente com a mesma velocidade de propagação, e a onda refratada continua em sentido positivo, mas sua velocidade é alterada em função das características do meio (OKUNO *et al.*, 1986).

2.8.1.2 Atenuação

Segundo Haar *et al.* (1978), à medida que as ondas ultra-sônicas atravessam os tecidos parte da energia é refletida pelas estruturas que se encontram em sua trajetória (espalhamento) e parte da energia é absorvida pelo próprio meio, levando a um aquecimento local (absorção). A atenuação (perda da energia pelo feixe) ocorre devido a estes dois mecanismos, sendo que a absorção representa 60-80% da perda de energia.

Na absorção a energia sonora é convertida em calor, e essa é a propriedade usada em fisioterapia (OKUNO *et al.*, 1986).

2.8.1.3 Campo Ultra-sônico:

A região próxima ao transdutor é conhecida como campo próximo ou Zona de Fresnel, onde a distribuição de energia é altamente variável. Na região mais distante do transdutor, as ondas começam a divergir e a distribuição da energia torna-se mais regular; esta região é chamada de campo distante ou Zona de Fraunhofer (DYSON, 1990).

2.8.2 Efeitos Biológicos do Ultra-som

O ultra-som quando atravessa um tecido, é absorvido e pode elevar a temperatura local. As mudanças biológicas que ocorrem no tecido devido à absorção seriam as mesmas caso a elevação de temperatura fosse provocada por qualquer outro agente. Quanto maior sua frequência, maior a taxa de absorção do ultra-som (OKUNO *et al.*, 1986).

A interação do ultra-som com os tecidos é à base das significantes mudanças fisiológicas, clínicas e terapêuticas, que estimulam a cicatrização tecidual e outras, potencialmente prejudiciais ao tecido (DYSON, 1990).

2.8.2.1 Efeito Térmico

Um estudo com 22 indivíduos saudáveis investigou as alterações de temperatura durante um período de 24 horas. A menor e a maior variação observada foi de 0,35 °C e 1°C o que permitiu concluir que elevações de

temperaturas menores que 1°C não acarretam nenhum efeito biológico. (MELETTE *et al.*, 1955)

Haar (1978) demonstrou que o ultra-som provoca aumento de temperatura (0,86°C por minuto) nos tecidos utilizando-se 1 W/cm² e 1MHz e a técnica estacionária. Isso inclui extensibilidade dos tecidos colágenos, diminuição de dor e espasmos musculares, apesar de nem todas as pesquisas apontarem nesse sentido.

A vantagem de se usar o ultra-som no aquecimento é que o terapeuta pode ter controle sobre a profundidade na qual ocorre o aquecimento (LEHMANN; GUY, 1972). Um dos efeitos fisiológicos do aquecimento induzido é o estímulo da cicatrização tecidual e o aumento a circulação sanguínea. Com o aumento na circulação a temperatura local eleva-se a 40 - 45°C, valores aceitáveis por promoverem a vascularização tecidual. Porém se a temperatura exceder esse limite, pode causar necrose tecidual, fato que deve ser extremamente evitado (DYSON, 1990).

2.8.2.2 Efeito não Térmico

Algumas das mudanças fisiológicas induzidas pela terapia ultra-sônica que pode afetar o processo cicatricial são primariamente não-térmicas. Os efeitos físicos produzidos incluem, cavitação, fluxo acústico e formação de ondas estacionárias (DYSON, 1990).

Na cavitação o ultra-som pode provocar a formação de bolhas ou cavidades micrométricas nos líquidos, contendo gás em tecidos biológicos como sangue, linfa e em qualquer outro local do corpo. O campo ultra-sônico, pelas quais essas bolhas

são expostas pode causar cavitação estável, isto é, uma vibração em resposta às mudanças cíclicas de pressão do ultra-som, ou cavitação transitória, que ocorre quando há alterações irregulares de pressão e altas temperaturas na região da bolha colapsada. A cavitação transitória produz dano local e causa formação de radicais livres. Em contraste, a cavitação estável pode ser induzida em tecidos moles *in vivo* com níveis baixos, e pode parcialmente ser responsável pela estimulação da reparação tecidual. Ao contrário do aquecimento, a cavitação ocorre mais facilmente em frequências baixas do que em altas frequências. Se a cavitação estável é requerida, então a baixa frequência (1MHz) pode ser selecionada (DYSON, 1990).

2.8.2.3 Força de Radiação

Pode ocorrer um efeito biológico devido a ação da força de radiação, levando à deformidade tecidual, podendo deslocar, distorcer e/ou reorientar partículas intercelulares, ou mesmo células, com relação às suas configurações normais. As novas posições podem não ser biologicamente desfavoráveis e, como consequência, podem produzir efeitos danosos (OKUNO *et al.*, 1986).

2.9 Ultra-som em Regeneração Óssea

A estimulação ultra-sônica da regeneração óssea é um tratamento não-invasivo de fraturas que utiliza ultra-som de baixa intensidade (30 mW/cm²). Duarte (1983), em estudos com animais, foi o primeiro a demonstrar que a terapia de pulsos por ultra-som de baixa intensidade poderia afetar a consolidação de fraturas,

provocando um aumento significativo do calo ósseo. A evidência de que o ultra-som pulsado de baixa intensidade não apenas aumenta a quantidade de calo, como também aumenta significativamente a resistência mecânica e rigidez do calo, foi demonstrada por (PILLA *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1994). Wang *et al.* (1994) demonstrou que o tratamento com ultra-som de baixa intensidade aumenta a resistência em um modelo de fratura femoral em ratos.

Estudos investigaram o mecanismo de ação do ultra-som de baixa intensidade (RYABY *et al.*, 1989, 1990, 1991, 1992; SATO *et al.*, 1999; KOKUBO *et al.*, 1999; ITO *et al.*, 2000). Rawool *et al.* (1998) demonstraram que o ultra-som de baixa intensidade aumenta o fluxo sanguíneo no sítio da fratura, e conseqüentemente contribui com a síntese de substâncias importantes como citocinas e fatores de crescimento para o processo de consolidação.

Azuma *et al.* (2001) investigaram quatro diferentes períodos de tratamento de fraturas com ultra-som de baixa intensidade e demonstraram que a consolidação foi acelerada em todos os grupos de estudo, independentemente do período ou duração do tratamento.

O uso clínico da terapia de ultra-som pulsado de baixa intensidade foi relatado pela primeira vez por Xavier e Duarte (1983). Diversos estudos clínicos comprovaram a eficiência dessa terapia no tratamento de fraturas recentes, retardos consolidação ou não-união (CHOFFIE *et al.*, 1994; HECKMAN *et al.*, 1994; DUARTE *et al.*, 1996; STRAUSS *et al.*, 1996; KRISTIANSEN *et al.*, 1997; MAYR *et al.*, 1997; MEANI E ROMANO, 1997; ROMANO *et al.*, 1999; GEBAUER *et al.*, 2000; WARDEN *et al.*, 2000; COOK *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2005; TANG *et al.*, 2006).

Hadjiargyrou *et al.* (1998) revisaram os estudos em animais e clínicos que utilizaram ultra-som de baixa intensidade na consolidação de fraturas e incluíram os estudos *in-vivo* e *in vitro*, que investigaram os mecanismos biológicos afetados pelo estímulo ultra-sônico.

Rubin *et al.* (2000) revisaram dados substanciais de ciência básica que demonstram uma influência positiva nos três estágios do processo de consolidação (inflamação, reparo e remodelamento), devido ao aumento da atividade angiogênica, condrogênica e osteogênica.

2.10 Efeitos do Ultra-som em Tecido Mole

As pesquisas realizadas com ultra-som de alta e baixa intensidades foram primeiramente investigadas em tecidos ósseos e posteriormente houve um interesse em investigar sua utilização em tecido epitelial.

O uso do ultra-som em cicatrização de feridas vem sendo pesquisado por Dyson desde 1976. Dyson *et al.* (1976) utilizaram um aparelho de ultra-som com intensidade de $1\text{W}/\text{cm}^2$ e frequência de 3MHz, em uma amostra de 12 úlceras de origem venosa, com aplicações de 5 a 10 minutos, 3 vezes por semana, durante 4 semanas, sendo que a própria amostra serviu como controle nas 4 semanas seguintes. Obtiveram como resultado uma redução de 25,2% superior ao grupo controle. Posteriormente em um estudo realizado por Dyson e Suckling em 1978 foram utilizados 25 casos de úlcera venosa divididos em grupo tratado e grupo placebo (irradiação simulada). Utilizando um ultra-som de $1\text{w}/\text{cm}^2$ e 3MHz, verificaram redução significativa nas medidas das áreas das úlceras após o estímulo em relação ao placebo. Após alguns anos Dyson (1987) começou a

realizar uma análise histopatológica em seus experimentos e observou um aumento de fibroblastos e degranulação de macrófagos em tecidos estimulados com ultra-som. Em 1989 Young e Dyson realizaram um trabalho para verificar a ocorrência de angiogênese na injúria, onde 36 ratas wistar foram divididas em grupo tratado e grupo placebo (irradiação simulada). Observaram que ultra-som na frequência de 0,75MHz e intensidade de 0,1w/cm² em lesões cutâneas de ratos pode estimular o crescimento de capilares com 5 dias de tratamento. Os resultados obtidos mostraram que a terapia pelo ultra-som pode ser útil, acelerando a proliferação inflamatória e assim fazer com que a cicatrização ocorra mais cedo. Young e Dyson (1990) realizaram um experimento *in vitro* com cultura celular de macrófagos, utilizando 2 grupos experimentais. Os Grupo 1 e 2 foram observados 30 min 12 horas, respectivamente, após a irradiação por ultra-som. Verificaram aumento de fibroblastos após a estimulação por ultra-som de 0,75MHz no grupo 1, e de 0,75 e 3 MHz no grupo 2. A intensidade do ultra-som em ambos os grupos foi de 0,5 w/cm².

Lundenberg *et al.* (1990) realizaram um estudo experimental com ultra-som pulsado em 44 pacientes com úlceras venosas, divididos em dois grupos. Ambos os grupos foram tratados por 12 semanas (3 meses), sendo que no 1º mês o tratamento era de 3 vezes semanais, no 2º, 2 vezes semanais e no 3º, 1 vez semanal. O primeiro grupo foi estimulado com ultra-som pulsado de 1 MHz e intensidade de 0,5 w/cm² e o segundo grupo foi definido como controle (US placebo). Ambos os grupos usavam gases impregnadas de pasta e bandagem elástica. Os autores não encontraram diferenças significativas na proporção de cicatrização entre o grupo estimulado e o placebo. Alguns anos depois outros autores realizaram esta mesma investigação. Swist-Chmielewska *et al.* (2002) investigaram o uso do ultra-som de 1 w/cm² e o de 0,5 w/cm², comparando com o

grupo controle, o qual era tratado com métodos tradicionais. Tinham como objetivo verificar qual era a técnica mais eficaz na redução da área, volume e aumento de granulação. Observaram que o ultra-som de 0,5 w/cm² mostrou melhores resultados na diminuição da área e do volume de úlceras venosas, levando-as a uma cicatrização mais rápida. Porém, em termos de desenvolvimento da granulação, não houve diferença entre os grupos. Em outro estudo Franek *et al.* (2004) compararam o ultra-som de 0,5 w/cm² e de 1w/cm² com o tratamento convencional, em 65 pacientes portadores de úlcera venosa, com o objetivo de verificar qual o mais eficaz. Dividiram aleatoriamente a amostra em 3 grupos, sendo: a) grupo A: aplicação do ultra-som e 1 w/cm² e 1 MHz; b) grupo B: aplicação do ultra-som 0,5 w/cm² e 1 MHz; c) grupo C (grupo controle) com tratamento farmacológico. Observaram que o grupo tratado com ultra-som de 0,5 w/cm² e 1MHz foi o que apresentou maior redução da área e do volume total da úlcera.

Peschen *et al.* (1997) examinaram o efeito do ultra-som de baixa frequência em 24 pacientes portadores de úlceras venosas crônicas. Os pacientes foram aleatoriamente colocados em grupos paralelos. O grupo tratado consistia na aplicação tópica de curativos e hidrocolóides (terapia convencional) e tratamento adicional do ultra-som. O grupo placebo foi tratado somente com a terapia convencional. Ambos foram tratados por 12 semanas. O grupo tratado consistia na aplicação do ultra-som contínuo de 30 KHz (100 mw/cm²), com imersão da perna em uma banheira contendo água com temperatura de 32° a 34° C por 10 minutos, 3 vezes por semana. Os resultados mostraram redução das medidas diárias das úlceras tratadas com ultra-som, e que a aplicação do ultra-som de baixa intensidade e baixa frequência é uma opção de tratamento de grande ajuda no tratamento das

úlceras venosas crônicas, principalmente quando as mesmas não apresentam boas respostas ao tratamento convencional.

Hilário (1993) e Anastácio (2000) investigaram os efeitos do tratamento de úlceras tróficas pelo ultra-som de baixa intensidade ($25\text{mw}/\text{cm}^2$). Elas classificaram as úlceras em pequena, média e grande e utilizaram um tempo de aplicação de 20 ou 30 minutos, sendo o ultra-som aplicado de maneira estacionária ao longo da borda da ferida, 3 vezes por semana. Em uma análise macroscópica Hilário (1993) verificou que a porcentagem média de úlcera cicatrizada em doze semanas de tratamento foi de 66%. Anastácio verificou em uma análise histopatológica de alguns casos a neoformação de vasos e o aumento de fibroblastos nas úlceras em doze semanas de tratamento. Na análise macroscópica verificou a redução das áreas das úlceras. Tanto para Hilário (1993) quanto para Anastácio (2000) o ultra-som de baixa intensidade agiu significativamente na redução das úlceras, acelerando o processo de cicatrização das úlceras.

Santana (2003) usou o ultra-som de baixa intensidade ($30\text{mW}/\text{cm}^2$) com uma frequência de 1,5MHz em úlceras de pele de 2 pacientes. O tratamento foi realizado 5 vezes por semana durante 20 minutos diários. A forma de aplicação foi não estacionária, usando o ultra-som com movimento circular em volta da ferida. A análise foi feita através de fotos das lesões por um software analisador de imagens, constatando-se uma diminuição de até 5,2% da área da ferida.

Weichenthal *et al.* (1997) estudaram 38 pacientes portadores de úlcera venosa por mais de 3 meses e os pacientes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos. Um grupo foi tratado por ultra-som de baixa intensidade ($100\text{mw}/\text{cm}^2$), de 30KHz, por 10 minutos, com o membro do paciente imerso em água, e o transdutor a 5cm de distância do local da úlcera. Com o outro foi realizado tratamento

convencional, com aplicações de agentes fibrinolíticos, antibióticos e antissépticos. Ambos os grupos eram tratados 3 vezes por semana por 2 meses. Fotografias coloridas foram tiradas uma vez por semana e as imagens foram mensuradas por um software de medidas. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, pôde-se observar uma redução maior no grupo tratado por ultra-som com 3 e 8 semanas de tratamento. Na 8ª semana a diferença era de 87% de redução no grupo tratado com ultra-som, versus 57% do grupo com tratamento convencional.

Hsu e Huang em 2004 em estudo in-vitro utilizaram ultra-som de 1MHz, pulsado (1:4) nas intensidades de 0,5 W/cm², 1,0 W/cm², 1,6 W/cm² e 2,0 W/cm², durante 10 minutos por dia, visando à estimulação de células endoteliais. Verificaram que o ultra-som (1,6 e 2,0 w/cm²) após 6 dias de tratamento ressaltou o óxido nítrico (NO) e Ca²⁺ liberados da células endoteliais, mas não promoveu crescimento celular. Concluíram que a estimulação por ultra-som muda a morfologia e orientação celular, e aumenta a secreção da matriz extracelular de células endoteliais.

Reher *et al.* (1998) estudaram o efeito do ultra-som *in vitro* em células de monócitos, fibroblastos e osteoblastos. Verificaram uma estimulação do IL-1β, notado em todos os tipos celulares, com níveis mais altos nos monócitos estimulados com 45KHz e nos osteoblastos estimulados com 1MHz. O IL-8 teve aumento apenas nos osteoblastos e o nível mais alto foi notado com o ultra-som de 45KHz. O FGFβ, também teve aumento apenas nos osteoblastos, porém a produção esteve significativamente elevada com ambos os mecanismos de ultra-som. O VEGF alcançou o maior número de produção sendo observado nos 3 tipos de células, e por ambos mecanismos de ultra-som. Observaram que o IL-8 e FGFβ

são significativamente estimulados nos osteoblastos, e o VEGF em todos os tipos de células estudadas. Ambos os mecanismos de ultra-som produziram resultados significantes com intensidade entre 15 e 30mw/cm² e 45KHz e com intensidades de 0,1 W/ cm² e 0,4 W/cm² e 1MHz.

2.11 Sulfadiazina de prata

A sulfadiazina de prata é composta de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio e encontra-se no mercado na forma de creme branco a 1%. Ela possui uma atividade antimicrobiana bastante ampla. É bactericida para uma grande variedade de bactéria Gram-positivas e Gram-negativas, bem como algumas espécies de fungos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, algumas espécie de *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Candida albicans* (WARD; SAFLE, 1995). A atividade antimicrobiana da sulfadiazina de prata é mediada pela reação do íon prata com o DNA microbiano, o que impede a replicação bacteriana. Além disto, age sobre a membrana e parede celular, promovendo o enfraquecimento destas e segundo alguns estudo tem capacidade de inibir o DNA (DRUG INFORMATION; 2002).

A sulfadiazina de prata é indicada na prevenção e tratamento de feridas como: queimaduras, úlceras venosas, úlceras de decúbito e feridas cirúrgicas infectadas. Deve ser aplicada 2 vezes ao dia, seguindo sempre orientação médica (DRUG INFORMATION; 2002).

2.11.1 Sulfadiazina de prata 1% no Tratamento das Úlceras de Perna

Primeiramente a Sulfadiazina de prata 1% era utilizada no tratamento de queimaduras, sendo recomendada em queimaduras de segundo e terceiro graus. (WARD; SAFLLLE, 1995). Posteriormente ela começou a ser usada na terapia tópica de úlceras venosas. Bishop *et al.* em 1992 realizaram um estudo prospectivo duplo-cego em pacientes com úlceras venosas com níveis bacterianos comparáveis e demonstraram que a Sulfadiazina de prata 1% reduziu de forma estatisticamente significativamente o tamanho das úlceras (44% em relação a 22,5% dos que utilizaram placebo). Tais autores associaram a eficácia desta droga a um favorecimento da replicação de queratinócitos e a propriedades antiinflamatórias da substância.

3. Metodologia

3.1 Seleção dos Pacientes

Foram selecionados pacientes do “Ambulatório da Dermatologia de Úlceras Neurovasculares” (ADUN) do HCFMRP – USP e do “Centro Saúde Escola” (CSE) do HCFMRP – USP. Após a seleção, os pacientes foram esclarecidos sobre as características do estudo e assinaram o termo de consentimento (ANEXO A).

- Critérios de Inclusão

Pacientes com úlcera de perna que:

- Apresentavam sinais clínicos clássicos de insuficiência venosa como varicosidades, edema, eczema, lipodermatoesclerose, e elefantíase.
- Apresentavam úlceras de qualquer tamanho.
- Possuíam HAS (Hipertensão Arterial Sistêmica) controlada, ou seja, PAD (Pressão Arterial Diastólica) < 95 mmHg.

- Critérios de Exclusão

Pacientes que não apresentavam os critérios de inclusão e/ou apresentavam:

- Transtornos psíquicos intelectuais.
- Co-morbidades como neoplasias, diabetes mellitus, entre outras.
- HAS descontrolada.
- Condições precárias de higiene pessoal.
- Úlceras Infectadas.
- Úlceras agudas

3.2 Padronização dos Grupos

Os pacientes selecionados foram distribuídos aleatoriamente, por ordem de chegada, e alternadamente, independente de sexo, idade, cor e religião, nos grupos experimentais.

3.3 Técnica de Tratamento

Grupo 1 (n=7 úlceras): neste grupo, os pacientes tiveram suas úlceras tratadas com curativos diários à base de creme sulfadiazina de prata 1% (SDZ) e cobertura com gazes e ataduras, realizados no domicílio.

Grupo 2 (n=9 úlceras): os pacientes tiveram suas úlceras tratadas com ultra-som de baixa intensidade (US) em dias alternados (segundas, quartas e sextas-feiras). O tempo diário de tratamento dependia da extensão da úlcera. O tratamento foi feito na periferia da lesão ficando o transdutor ultra-sônico estacionário. A distância entre dois locais adjacentes de tratamento foi de 2 cm. Em cada local o tempo de tratamento foi de 3 minutos. Toda a periferia da lesão foi tratada e o tempo total de tratamento nunca foi inferior a 20 minutos.

Em ambos os grupos as úlceras foram tratadas por 90 dias.

A figura 3.1 mostra uma das úlceras tratada com ultra-som de baixa intensidade.

Figura 3.1 - Tratamento de úlcera por ultra-som

3.3.1 Transdutor Ultra-Sônico

Foi utilizado um aparelho de ultra-som com as seguintes características (figura 3.2): intensidade de 30 mW/cm^2 , modo pulsado com *burst* de 1,5 MHz; largura de pulso de $200\mu\text{s}$ e frequência de repetição de pulso de 1KHz. Estes parâmetros foram utilizados em estudos anteriores envolvendo úlceras, queimadura e tendão.

Figura 3.2 - Aparelho de ultra-som

O transdutor foi submetido à anti-sepsia antes e após cada sessão com gases embebidas em álcool 70%. Para uma melhor prevenção séptica foi utilizada uma película de látex (condom) no cabeçote do ultra-som a cada sessão. Uma camada de gel foi utilizada entre a superfície do transdutor e a superfície interna da película bem como entre a superfície externa da película e a borda da lesão. O cálculo da atenuação causada pela película é pequeno devido à sua espessura.

Esse resultado teórico foi comprovado experimentalmente através da medida da intensidade acústica, com e sem a presença da película de látex, em uma “Balança de Radiação Acústica”. Dosimetrias periódicas foram realizadas no laboratório do “Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – USP” (São Carlos, SP) para monitoramento da energia transmitida.

Os cálculos a seguir demonstram que o uso do preservativo de látex entre a superfície do transdutor ultra-sônico e a periferia das úlceras causa pouca atenuação da energia ultra-sônica

Na figura 3.3 estão esquematizados três meios com impedâncias acústicas r_1 , r_2 e r_3 , respectivamente. Os meios 1 e 3 representam o gel ultra-sônico e o meio 2 a camada de látex de pequena espessura (preservativo). A constante $k=w/c=2\pi f/c$ é denominada número de onda, sendo c a velocidade do ultra-som no meio.

Figura 3.3 - Representação esquemática dos meios com impedância acústica (Kinsler L.E. et al, Fundamentals of Acoustics, pg. 127, 1982)

A porcentagem de transmissão da energia ultra-sônica propagando-se do meio 1 em direção ao meio 3 é determinada pela equação abaixo (Kinsler, 1982):

$$T_{\text{total}} = \frac{4}{2 + \frac{r_3}{r_1} + \frac{r_1}{r_3} \cos^2 k_2 L + \frac{r_2^2}{r_1 r_3} + \frac{r_1 r_3}{r_2^2} \sin^2 k_2 L} \quad (3.1)$$

Considerando-se que o meio 1 e 3 são iguais obtém-se:

$$T_{\text{total}} = \frac{4}{2 + 2\cos^2 k_2 L + \frac{r_2^2}{r_1^2} + \frac{r_1^2}{r_2^2} \sin^2 k_2 L}$$

No entanto $\frac{r_2^2}{r_1^2} + \frac{r_1^2}{r_2^2} = 2 + \frac{r_2}{r_1} \frac{r_1}{r_2}^2$ e a equação (3.1) pode ser reescrita:

$$T_{\text{total}} = \frac{4}{2 + 2\cos^2 k_2 L + 2 + \frac{r_2}{r_1} \frac{r_1}{r_2}^2 \sin^2 k_2 L} =$$

$$T_{\text{total}} = \frac{4}{2 + 2\cos^2 k_2 L + \frac{r_2}{r_1} \frac{r_1}{r_2}^2 \sin^2 k_2 L + 2\sin^2 k_2 L} =$$

$$T_{\text{total}} = \frac{4}{4 + \frac{r_2}{r_1} \frac{r_1}{r_2}^2 \sin^2 k_2 L} \quad (3.2)$$

Na equação 3.2 se $L \rightarrow 0$, isto é, se a espessura do preservativo for pequena, então $\sin^2 k_2 L \rightarrow 0$ e, portanto, $T_{\text{total}} \rightarrow 1$. Isto pode ser comprovado substituindo-se na equação (3.2) os valores de $r_1 = r_{\text{látex}} = 1,74$ Mrayls, $r_2 = r_{\text{gel}} = r_{\text{água}} = 1,48$ Mrayls, $K_2 = 2\pi f / c_2 = 6,08 \times 10^3$ e admitindo-se que $\sin K_2 L = 0,1$ (isto é, $K_2 L = 6$ e $L \approx 1$ mm):

$$T_{\text{total}} = \frac{1}{1 + \frac{1}{4} \frac{1,74}{1,48} \frac{1,48}{1,74}^2 \cdot 0,01} = 0,9997$$

Portanto, a transmissão da energia ultra-sônica não é afetada pela espessura da película de látex (preservativo) se a espessura da mesma for pequena.

3.4 Assepsia da Úlcera

Antes de começar o tratamento, as feridas foram lavadas cuidadosamente com soro fisiológico 0,9% e gaze. Após a limpeza, o leito da úlcera foi mantido seco com auxílio das gaze.

3.5 Avaliação Clínica

Os pacientes foram submetidos a um protocolo de avaliação médico-clínica sob responsabilidade do Prof^o. Dr^o. Marco Andrey Cipriani Frade (ANEXO B) constando de:

- Identificação
- Doenças Associadas
- Medicamentos em uso
- Exame da ferida (medidas, fundo, borda, características teciduais, recidivas ou não).
- Pulso e Artérias

3.6 Avaliação Clínico Fotográfica

A documentação fotográfica das úlceras nos 2 grupos de estudo foi obtida a cada 15 dias por um período máximo de 90 dias. Essas imagens foram analisadas pelo software de análise de imagens ImageJ[®] para quantificação da área da úlcera e avaliação das características dos tecidos.

A análise de imagem foi realizada no “Laboratório de Biologia Celular” da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP com o auxílio do Prof. Dr. João Kajiwarra.

3.6.1 Captura da Imagem

As figuras 3.4a e 3.4b mostram um dispositivo projetado com o objetivo de padronizar a captura das imagens das úlceras contendo as seguintes características:

- a) suporte de alumínio na forma de arco para uma máquina fotográfica digital (SonyDSC P93). O suporte tem 80cm de altura, diâmetro de 70cm e uma base de acrílico de 50cmx70cm;
- b) iluminação com uma lâmpada tipo farol de milha apontada para o teto com o intuito de diminuir o reflexo. A lâmpada foi acoplada ao suporte de alumínio e constituiu a única iluminação do ambiente. As demais lâmpadas foram desligadas e a iluminação natural bloqueada com o uso de cortinas;
- c) Roldanas permitem o movimento da máquina fotográfica e da lâmpada;
- d) Uso de etiquetas auto colantes, com marcação em centímetros, para uso na borda da úlcera, com o intuito de ajustar as angulações da úlcera durante a análise de imagem. As etiquetas também foram utilizadas como régua durante o procedimento de quantificação da imagem da úlcera, utilizando-as para padronização da escala.
- e) Uso de papel tamanho ofício abaixo do membro do paciente para delimitar a borda do mesmo, o qual foi usado sempre que a úlcera foi fotografada com o intuito de manter o membro sempre na mesma posição.

Figura 3.4a - Aparelho para câmera fotográfica

Figura 3.4b - Ilustração da utilização do aparelho

A figura 3.5 mostra os materiais usados para a padronização das fotos.

Figura 3.5 - Foto padronizada para análise de imagem

3.7 Detalhamento da Análise de Imagem

O analisador de imagem foi utilizado no monitoramento das úlceras e na análise da imunohistoquímica, segundo o procedimento descrito a seguir:

Etapla 1: Fotografia das úlceras com uma câmera digital Sony DSC P93, com resolução de 5.0 megapixels, foram transferidas para o disco rígido de um microcomputador (Pentium IV, 2.2 GHz, 256 Mbytes de memória RAM) para a realização dos procedimentos de quantificação. As imagens da imunohistoquímica foram registradas por uma câmera digital Nikon E995 acoplada a um microscópio Zeiss com uma objetiva de 40x e transferidas para o mesmo microcomputador.

Características do software de análise de imagens

O ImageJ®, desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health (Bethesda, Maryland, EUA), é um software processador e analisador de imagens em Java de domínio público, inspirado no NIH ImageJ para o Apple Macintosh (figura 3.6). Dessa forma pode ser executado em diversos ambientes operacionais desde que os mesmos possuam uma máquina virtual Java apropriada. Além disso, o repertório de funções deste software pode ser expandido através de diversos *plugins* prontos, disponíveis na Internet, ou desenvolvendo-se novos *plugins*.

Figura 3.6 - Programa ImageJ®

Etapla 2: Seleção da imagem desejada para quantificação da área da úlcera e dos seus respectivos tecidos ou para a quantificação das áreas da cor cobre, anteriormente citadas.

Foi selecionado o *plugin polygon* e *rectangular* (figura 3.7a e 3.7b) para segmentação das áreas das imagens das úlceras ou da imunohistoquímica,

respectivamente. Este procedimento é manual e utiliza o mouse (figura 3.8 e 3.9).

Figura 3.7a - Ícone do *Plugin polygon*

Figura 3.7b - Ícone do *Plugin rectangular*

Figura 3.8 - Úlcera segmentada

Figura 3.9 - Imunohistoquímica segmentada

Etapa 3: Segmentação da área da úlcera (figura 3.8) e cálculo da área através do comando <Ctrl M> do teclado, após ajuste apropriado da escala. As escalas das imagens foram calibradas utilizando etiquetas auto-colantes.

Etapa 4: Seleção das áreas de granulação (área vermelha) e de fibrina (área amarela) na imagem da úlcera. Foram utilizadas as características de matiz, brilho e saturação da luz refletida e não somente o brilho, como é mais usual. A seleção é realizada pelo *plugin threshold_colour* bastando definir o intervalo da cor de interesse (figura 3.10a e 3.10b). O software torna brancas as áreas de interesse e pretas as demais áreas. A figura 3.11 mostra a imagem real de uma úlcera e a figura 3.12 mostra duas imagens sendo uma com seleção de área tecidual amarela e outra com seleção de área tecidual vermelha, já convertida em preto e branco.

(a) (b)
 Figura 3.10 - (a) *Plugin threshold_colour*, (b) exemplo de uma imagem de úlcera com seleção de fibrina

Figura 3.11 - Imagem real da ferida

Figura 3.12 - Imagem com seleção de fibrina e imagem com seleção de granulação, respectivamente

Na análise imunohistoquímica, para a seleção da área de cor cobre, foi

utilizado o Gimp[®], software empregado na formatação de imagens, semelhante ao Photoshop[®], porém disponível na Internet. Optou-se pelo Gimp[®] para a seleção da área de cor cobre por ser mais preciso que o ImageJ[®] quando as imagens mostram problemas de background, isto é, restos de enzimas ou fatores de crescimento espalhados sobre a amostra, decorrentes do processo de imunohistoquímica. Este background não faz parte da área de interesse. A imagem foi decomposta em RGB, que é a abreviatura do sistema de cores aditivas formado por vermelho (Red), verde (Green) e azul (Blue). A escala de RGB varia de 0 (mais escuro) a 255 (mais claro). O RGB converte a imagem em escalas de cinza, nos 3 sistemas de cores. Foi utilizada a imagem em escala de cinza na cor verde, já que esta representou melhor a cor cobre e violeta da amostra. A figura 3.13a ilustra a imagem real de uma amostra de imunohistoquímica, comparada à imagem convertida em escala de cinza na cor verde pelo Gimp[®] (figura 3.13b). Observa-se que a área de interesse, ou seja, células marcadas com cobre, está na cor preta de tonalidade mais forte; já o background está em tons de preto desbotado, cinza ou branco.

3.13a - Imagem real da imunohistoquímica

3.13b - Imagem da imunohistoquímica em escala de cinza na cor verde

Em seguida, a imagem em escala de cinza na cor verde foi analisada no ImageJ[®], através do *plugin threshold* (figura 3.14). O software torna, por exemplo, vermelha a área de interesse. A figura 3.15 mostra a imagem com seleção da cor cobre, já convertida em vermelha.

Figura 3.14 - *Plugin threshold*

Figura 3.15 - Imagem com seleção da cor cobre

Etapas 5: Após ter sido definida a área de interesse, isto é, branco na análise da área da úlcera, e vermelho na análise histoquímica (figura 3.16 e 3.17), ela é quantificada pelo software ImageJ®. No caso da imunohistoquímica, a área avaliada foi todo o campo fotografado e o cálculo da área de interesse é também realizado pelo comando <Ctrl M>, após ajuste apropriado da escala. As escalas das imagens foram calibradas utilizando as etiquetas auto-colantes. A escala da imunohistoquímica foi calibrada utilizando uma régua micrométrica fotografada nos mesmos padrões das amostras.

Figura 3.16 – Seleção de área de fibrina

Figura 3.17 – Seleção de área da cor cobre

3.8 Estudo Imunohistoquímico

Para o estudo imunohistoquímico foram obtidas biópsias das úlceras realizadas no início do tratamento (pré-tratamento) e após 45 dias para a verificação das modificações teciduais (pós-tratamento) produzidas pelo tratamento convencional e por ultra-som.

Foi realizada anestesia local e incisão com punch de 4mm na borda da úlcera com a intenção de se retirar o mínimo de fragmento necessário sem causar dano significativo ao paciente, sob responsabilidade do Profº. Drº. Marco Andrey Cipriani Frade.

As peças biopsiadas foram colocadas em soro fisiológico (0,9% de NaCl), em seguida acondicionadas em “Tissue Tek®” e congeladas à temperatura de – 70°C.

Os exames imunohistoquímicos foram realizados no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP.

OBS: As informações colhidas e observações clínicas constatadas pelo exame estão arquivadas. Esses dados serão utilizados exclusivamente para fins técnico-científicos.

Alguns fragmentos foram submetidos ao estudo imunohistoquímico para quantificação de TGF- β , VEGF e iNOS, utilizando o Método HRP-Streptavidina (Santa Cruz Biotechnology) (ANEXO C). A quantificação dos fatores de crescimento e da enzima foi realizada através do software ImageJ[®].

O Método HRP-Streptavidina marca as células que contém TGF- β , VEGF e iNOS com a cor cobre e as demais com a cor violeta.

3.9 Parâmetros Quantificados

Foram quantificados os seguintes parâmetros

- a) área das úlceras e dos tecidos de granulação e fibrina.
- b) razão (r_1) entre a área inicial da úlcera menos a área no dia da avaliação dividido pela área inicial com a seguinte interpretação: área fechada se $r_1=1$, área inalterada se $r_1=0$, diminuição da área se $r_1>1$ e aumento da área se $r_1<1$.
- c) razão (r_2) entre a área do tecido de granulação e a área da úlcera no mesmo dia da avaliação.
- d) razão (r_3) entre a área do tecido de fibrina e a área superficial da úlcera no mesmo dia da avaliação.
- e) área das células marcadas pela presença da enzima iNOS e pelos fatores de crescimento TGF β e VEGF com aumento de 400X. A medida foi realizada em 5 campos de um mesmo corte histológico para obtenção de uma média.

3.10 Testes de Validação do ImageJ[®]

Cinco estudos foram realizados no “Ambulatório de Úlceras” do “Centro de Saúde Escola” da FMRP-USP com os seguintes objetivos:

Estudo 1: validação da medida da área das úlceras através do software ImageJ®:

Estudo 2: comparação de análises de imagem realizadas pelo software ImageJ® captadas com câmara digital e com o uso de folha plástica.

Estudo 3: comparação entre técnica convencional de análise de imagem e a realizada pelo ImageJ®.

Estudo 4: influência da captura de imagem através de método não padronizado e padronizado na análise de imagem.

Estudo 5: influência da segmentação manual da borda da úlcera do tecido de granulação e fibrina realizada através de mouse na análise de imagem.

Estudo 1

Procedimento:

- a) corte de um papel milimetrado para se obter uma área S com formato regular ou irregular.
- b) medida da massa média do mesmo papel em amostras com área de 1cm^2 (área padrão).
- c) medida da massa do papel contendo a área S em uma balança de precisão.
- d) cálculo da área S através da razão entre a medida da massa do papel com área regular e irregular e a medida da média da massa do papel com a área padrão.
- e) fotografia da área regular ou irregular para medida da área através de análise de imagem pelo software ImageJ®.

Foram utilizadas 4 áreas regulares (quadrados com lado de 2, 3, 4 e 5 cm) e 5 áreas irregulares e calculado o erro entre o valor da área medida pelo software e a área medida através do peso.

Estudo 2

Procedimento: Um total de 25 úlceras foram fotografadas com câmera digital e desenhadas em dupla folha plástica transparente colocadas simultaneamente sobre a úlcera (método manual). A folha em contato com a úlcera foi descartada. Para os desenhos foram usados pincéis marcadores de cor vermelha para o delineamento da área ulcerada e pintura de toda área de tecido de granulação e de cor azul para fibrina. Os desenhos de cada úlcera foram também fotografados para análise pelo ImageJ®.

Estudo 3

Procedimento: As áreas das úlceras fotografadas e analisadas pelo ImageJ® no estudo 2 foram comparadas com as úlceras desenhadas no estudo 2 e analisadas com os seguintes métodos tradicionais de análise de imagem:

- aproximação da área da úlcera por um retângulo com lados iguais aos diâmetros maiores no sentido longitudinal e transversal.
- aproximação da área da úlcera por uma elipse com área $S=\pi ab$, sendo a o eixo maior e b o eixo menor.
- medida da área com o uso de papel centimetrado.

Estudo 4

Procedimento: Um total de 30 úlceras foram utilizadas para medida da área e dos tecidos de granulação e de fibrina utilizando uma captura de imagem padronizada (ver 3.4.1) e não padronizada (iluminação ambiente e sem o dispositivo fotográfico).

Estudo 5

Procedimento: Um total de 15 úlceras foram utilizadas para determinação da área da úlcera e dos tecidos de granulação e fibrina utilizando-se o software ImageJ®. As medidas, segundo o procedimento do item 3.5 , foram realizadas por dois pesquisadores diferentes para se avaliar a influência humana nos resultados da análise de imagem.

3.11 Análise Estatística

As análises estatísticas dessa investigação foi realizada com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

4. Resultados

4.1 Efeito da Camada de Látex na Transmissão do Ultra-som

A influência da película foi quantificada através da medida da energia transmitida, com e sem a presença da mesma. A atenuação média causada pela película foi de 11%, conforme descrito na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Influência da Película de Látex

Medida	Potência (mW) (sem a película)	Potência (mW) (com a película)	Diferença (mW)
1	0,192	0,166	-0,026
2	0,19	0,16	-0,03
3	0,172	0,162	-0,01
4	0,182	0,16	-0,022
5	0,176	0,158	-0,018
6	0,18	0,16	-0,02
7	0,178	0,162	-0,016
8	0,18	0,162	-0,018
Média	0,181	0,161	-0,020

Obs: Atenuação média = $0,020/0,181=0,11=11\%$

Considerando-se uma atenuação média de 11% produzida pela película de látex, a energia transmitida pelo transdutor foi regulada para transmitir uma intensidade de 30 mW/cm² com a presença da película.

4.2 Dados Populacionais

Os dados populacionais como idade, sexo, cor, profissão, doenças associadas e recorrências, relativos às duas amostras que constituíram os grupos 1 e 2, respectivamente, estão apresentados na tabela 4.2

Tabela 4.2 – Dados populacionais do grupo 1 (SDZ) e do grupo 2 (US)

Características Clínicas		Grupo 1(n=7)	Grupo 2 (n=9)
Idade	Média	75,7	62,9
	Mínima	59	36
	Máxima	81	78
Sexo	Masculino	85,7%	66,7%
	Feminino	14,3%	33,3%
Cor	Branca	28,6%	66,7%
	Não Branca	71,4%	33,3%
Profissão	Inativa	85,8%	66,7%
	Ativa	14,2%	33,3%
Doenças Associadas	IVC	X	22,2%
	IVC+Artrite	X	11,1%
	IVC+Diabetes	X	11,1%
	IVC+HAS	100%	55,6%
Recorrência	Sim	85,7%	66,7%
	Não	14,3%	33,3%

4.3 Quantificação das Áreas das Úlceras e das Razões r_1 , r_2 e r_3

O seguimento clínico dos pacientes conforme protocolo de 90 dias foi realizado através de fotografias padronizadas a cada 15 dias, conforme as figuras 4.1a, 4.1b, 4.2a e 4.2b . No grupo 1 não houve desistência de nenhum paciente sendo que 7 pacientes completaram o protocolo. No grupo 2 houve duas desistências e 9 pacientes completaram o protocolo.

Caso 1

1º dia

45º dia

90º dia

Caso 2

1º dia

45º dia

90º dia

Caso 3

1º dia

45º dia

90º dia

Figura 4.1a - Seguimento clínico fotográfico dos pacientes do Grupo 1

Figura 4.1b - Seguimento clínico fotográfico dos pacientes do Grupo 1

Caso 1

1° dia

45° dia

90° dia

Caso 2

1° dia

45° dia

90° dia

105° dia

Caso3

1° dia

45° dia

90° dia

Caso 4

1° dia

45° dia

90° dia

Figura 4.2a - Seguimento clínico fotográfico dos pacientes do Grupo 2

Caso 5

1° dia

45° dia

90° dia

Caso 6

1° dia

45° dia

90° dia

Caso 7

1° dia

45° dia

90° dia

Caso 8

1° dia

45° dia

90° dia

Caso 9

1° dia

45° dia

90° dia

Figura 4.2b - Seguimento clínico fotográfico dos pacientes do Grupo 2

A evolução das áreas das úlceras de perna do grupo 1 (SDZ) e do grupo 2 (US) e dos respectivos tecidos de granulação e fibrina estão descritas no Anexo D.

A razão r_1 está descrita nas tabelas 4.3a e 4.3b e nos gráficos 4.1a e 4.1b. A evolução de r_1 com o tempo é descrita na tabela 4.4.

Tabela 4.3a – Razão r_1 das úlceras de perna do grupo 1 (SDZ)

Úlcera \ Dia	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°
1	0,00	0,00	-0,88	-0,98	-0,44	-0,50	-0,54
2	0,00	0,05	-0,51	-0,16	-0,04	-0,22	-0,15
3	0,00	-0,02	-0,19	-0,33	-0,04	0,02	-0,22
4	0,00	-0,01	0,02	0,02	0,23	0,17	-0,12
5	0,00	0,02	0,04	0,17	-0,24	-0,22	-0,15
6	0,00	0,10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
7	0,00	0,07	-0,03	0,00	-0,01	-0,02	-0,02
Média	-	0,03	-0,08	-0,04	0,07	0,03	0,00
Desvio Padrão	-	0,04	0,58	0,59	0,46	0,48	0,48

Gráfico 4.1a – Razão r_1 das úlceras de perna do grupo 1 (SDZ)

Tabela 4.3b – Razão r_1 das úlceras de perna do grupo 2 (US)

Úlcera \ Dia	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°	105°
1	0,00	-0,41	0,00	0,66	1,00	1,00	1,00	-
2	0,00	-0,35	-0,47	-0,55	-0,10	0,25	0,67	1,00
3	0,00	0,14	-0,07	0,06	0,23	0,27	0,27	-
4	0,00	-0,19	-0,08	0,04	0,07	0,16	0,00	-
5	0,00	-0,40	-0,51	-0,54	-0,36	-0,65	-0,21	-
6	0,00	-0,06	0,30	0,48	1,00	1,00	1,00	-
7	0,00	0,19	-0,05	-0,19	-0,10	0,00	0,13	-
8	0,00	0,20	0,38	0,32	0,32	0,33	0,38	-
9	0,00	-0,03	0,00	0,27	0,07	0,39	0,43	-
Média	-	-0,10	-0,06	0,06	0,24	0,31	0,41	-
Desvio Padrão	-	0,25	0,30	0,42	0,48	0,50	0,42	-

Gráfico 4.1b – Razão r_1 das úlceras de perna do grupo 2 (US)

Na tabela 4.4 as úlceras foram distribuídas conforme a razão r_1 considerando-se evolução satisfatória se $r_1 > 0$, estável se $r_1 = 0$ e insatisfatória $r_1 < 0$.

Tabela 4.4 – Evolução de r_1 com o tempo

Tempo	Classificação	Número de úlceras Grupo1 (n=7)	Número de úlceras Grupo2 (n=9)
15°	Satisfatória	4	3
	Estável	1	0
	Insatisfatória	2	6
30°	Satisfatória	3	2
	Estável	0	2
	Insatisfatória	4	5
45°	Satisfatória	3	6
	Estável	1	0
	Insatisfatória	3	3
60°	Satisfatória	2	6
	Estável	0	0
	Insatisfatória	5	3
75°	Satisfatória	3	7
	Estável	0	1
	Insatisfatória	4	1
90°	Satisfatória	1	7
	Estável	0	1
	Insatisfatória	6	1

As razões r_2 e r_3 estão descritas nas tabelas 4.5a e 4.5b e nos gráficos 4.2a e 4.2b e nas tabelas 4.6a e 4.6b e gráficos 4.3a e 4.3b, respectivamente.

Tabela 4.5a – Razão r_2 das úlceras de perna do grupo 1(SDZ)

Dia Úlcera	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°
1	0,3	0,51	0,26	0,54	0,53	0,71	0,57
2	0,67	0,74	0,40	0,69	0,69	0,46	0,55
3	0,55	0,48	0,53	0,50	0,56	0,59	0,67
4	0,89	0,81	0,24	0,50	0,75	0,40	0,39
5	0,75	0,32	0,42	0,54	0,54	0,66	0,72
6	0,94	0,86	0,00	-	-	-	-
7	0,67	0,79	0,71	0,58	0,73	0,72	0,80
Média	0,70	0,64	0,37	0,56	0,63	0,59	0,62
Desvio Padrão	0,18	0,21	0,23	0,07	0,10	0,13	0,15

Gráfico 4.2a - Razão r_2 das úlceras de perna do grupo 1(SDZ)

Tabela 4.5b – Razão r_2 das úlceras do grupo 2 (US)

Dia Úlcera	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°	105°
1	0,84	0,78	0,91	1,00	0,00	-	-	-
2	0,80	0,80	0,81	0,81	0,94	0,84	0,87	0,00
3	0,52	0,66	0,89	1,00	1,00	1,00	1,00	-
4	0,59	0,62	0,74	0,71	0,68	0,77	0,73	-
5	0,34	0,47	0,50	0,86	0,65	0,73	0,67	-
6	0,84	0,53	0,65	0,70	0,00	-	-	-
7	0,80	0,83	0,81	0,90	0,89	0,84	1,00	-
8	0,83	0,59	0,69	0,67	0,61	0,78	0,88	-
9	0,84	0,79	0,91	1,00	0,85	1,00	1,00	-
Média	0,71	0,67	0,77	0,85	0,62	0,85	0,88	-
Desvio Padrão	0,18	0,13	0,14	0,14	0,38	0,11	0,14	-

Gráfico 4.2b – Razão r_2 das úlceras do grupo 2 (US)

Tabela 4.6a – Razão r_3 das úlceras do grupo 1(SDZ)

Úlcera \ Dia	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°
1	0,54	0,49	0,74	0,46	0,45	0,30	0,43
2	0,31	0,26	0,59	0,31	0,32	0,54	0,45
3	0,44	0,50	0,47	0,50	0,44	0,40	0,30
4	0,11	0,12	0,76	0,51	0,25	0,59	0,62
5	0,25	0,69	0,59	0,46	0,46	0,33	0,28
6	0,00	0,14	0,00	-	-	-	-
7	0,34	0,21	0,28	0,42	0,26	0,23	0,19
Média± Desvio Padrão	0,28 0,19	0,34 0,22	0,49 0,27	0,44 0,07	0,36 0,10	0,40 0,14	0,38 0,15

Gráfico 4.3a – Razão r_3 das úlceras do grupo 1(SDZ)

Tabela 4.6b – Razão r_3 das úlceras do grupo 2 (US)

Úlcera \ Dia	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°	105°
1	0,41	0,00	0,34	0,00	0,00	-	-	-
2	0,21	0,13	0,13	0,06	0,03	0,15	0,08	0,00
3	0,40	0,37	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	-
4	0,32	0,38	0,26	0,29	0,22	0,23	0,25	-
5	0,64	0,53	0,50	0,14	0,30	0,26	0,34	-
6	0,18	0,52	0,38	0,40	0,00	-	-	-
7	0,16	0,17	0,20	0,09	0,06	0,15	0,00	-
8	0,12	0,33	0,25	0,32	0,31	0,16	0,12	-
9	0,16	0,18	0,05	0,00	0,12	0,00	0,00	-
Média	0,29	0,29	0,25	0,14	0,12	0,14	0,11	-
Desvio Padrão	0,17	0,18	0,14	0,15	0,13	0,10	0,14	-

Gráfico 4.3b – Razão r_3 das úlceras do grupo 2 (US)

4.4 Imunohistoquímica

Foram extraídas biópsias em 5 pacientes do Grupo 1 e em 7 pacientes do Grupo 2. Uma das biópsias do Grupo 2 não foi analisada por problemas relacionados à coleta. Dois pacientes não autorizaram a coleta da biópsia e a dimensão pequena da úlcera de três pacientes não permitiu a coleta da biópsia.

A tabela 4.7 descreve o resultado da análise imunohistoquímica.

Tabela 4.7 – Análise imunohistoquímica das biópsias das úlceras segundo a área marcada de iNOS, TGF β e VEGF no 1^o dia e 45^o dia de tratamento nas úlceras dos pacientes do Grupo 1 (SDZ) e Grupo 2 (US).

	Úlcera	iNOS (cm ²)			TGF β (cm ²)			VEGF (cm ²)		
		1 ^o dia	45 ^o dia	≠	1 ^o dia	45 ^o dia	≠	1 ^o dia	45 ^o dia	≠
SULFADIAZINA	1	3,33	2,04	-1,29	1,86	1,81	-0,05	1,00	1,51	0,51
	2	2,94	2,04	-0,90	1,64	2,43	0,79	1,25	1,68	0,43
	3	1,65	3,03	1,38	1,61	1,22	-0,39	1,34	1,72	0,38
	4	1,49	3,07	1,58	1,25	1,28	-0,03	1,29	2,36	1,07
	5	4,05	3,52	-0,53	2,02	1,93	-0,09	2,22	2,04	-0,18
	Média	2,69	2,74	0,05	1,68	1,73	0,05	1,42	1,86	0,44
ULTRA-SOM	2	3,04	5,68	2,64	1,34	2,42	1,08	0,92	3,34	2,42
	3	4,47	4,29	-0,18	4,06	5,18	1,12	1,82	3,71	1,89
	4	1,72	2,26	0,54	2,15	2,07	-0,08	1,23	1,46	0,23
	5	3,15	1,55	-1,60	1,34	1,47	0,13	1,35	1,88	0,53
	8	1,53	3,66	2,13	2,22	3,56	1,34	2,15	1,95	-0,20
	9	3,44	3,67	0,23	2,53	3,59	-1,06	1,47	3,56	2,09
	Média	2,89	3,52	0,63	2,27	3,05	0,78	1,49	2,65	1,16

4.5 Testes de Validação e Comparação do software ImageJ®

Estudo 1: validação da medida da área das úlceras através do software ImageJ®.

A tabela 4.8 descreve os valores da massa de 10 amostras do papel milimetrado com área de 1 cm².

Tabela 4.8 – Valor Médio da massa do papel com área padrão de 1cm²

Amostra	Massa (g)
1	0,0063
2	0,0058
3	0,0056
4	0,0060
5	0,0063
6	0,0060
7	0,0062
8	0,0061
9	0,0062
10	0,0060
Média	0,0061
Desvio Padrão	0,00023

A tabela 4.9 descreve: a) o valor medido da massa do papel milimetrado de amostras com área regular ou irregular; b) a área das amostras medida através da razão entre a medida da massa do papel com área regular ou irregular e a medida da média da massa do papel com área padrão; c) a área das amostras medida pelo software ImageJ®.

Tabela 4.9 – Validação da Medida da Área

Amostra	Massa (g)	Área da amostra (cm²) (balança)	Área da amostra (cm²) (ImageJ[®])	Erro (%)
Irregular 1	0,0891	14,73	14,13	4,06
Irregular 2	0,0674	11,14	10,92	1,98
Irregular 3	0,1107	18,30	17,91	2,12
Irregular 4	0,2080	34,38	32,45	5,61
Irregular 5	0,2399	39,65	37,25	6,06
quadrado de lado 2 cm	0,0257	4,25	3,9	8,19
quadrado de lado 3 cm	0,0579	9,57	9,1	4,91
quadrado de lado 4 cm	0,1024	16,93	16,25	3,99
quadrado de lado 5 cm	0,1598	26,41	24,70	6,49
Média	-	-	-	4,82
Desvio Padrão	-	-	-	2,03

Estudo 2: comparação de análises de imagem realizadas pelo software ImageJ[®] captadas com câmara digital e com o uso de folha plástica.

A tabela 4.10 descreve os valores medidos das áreas das úlceras e dos tecidos de granulação e fibrina através do ImageJ[®] e do uso da folha plástica.

Estudo 3: comparação entre técnica convencional de análise de imagem e a realizada pelo ImageJ[®].

A tabela 4.11 descreve os valores medidos das áreas das úlceras utilizando o software ImageJ[®] e técnicas convencionais (aproximação por uma elipse ou por um retângulo).

Tabela 4.10 – Comparação entre Câmara Digital e Método Manual

Úlcera	S3 (cm2) Úlcera (desenho)	S4 (cm2) Úlcera (foto)	S4-S3 (cm2)	S5 (cm2) Granulação (desenho)	S6 (cm2) Granulação foto	S6-S5 (cm2)	S7 (cm2) Fibrina (desenho)	S8 (cm2) Fibrina (foto)	S8-S7 (cm2)
1	0,7	1,1	0,4	0,6	1,1	0,5	0,1	0	0,1
2	2,3	3,1	0,8	2,3	3,1	0,8	0	0	0
3	5,4	6	0,6	4,3	5,7	1,4	0,9	0,3	-0,6
4	0,4	0,8	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2
5	11,9	13,3	1,4	10,4	10,6	0,2	0,9	2	1,1
6	7,1	6,8	-0,3	5,2	4,8	-0,4	1,6	0,6	-1
7	14,6	13	-1,6	14,6	13	-1,6	0	0	0
8	103,9	136,7	32,8	103,9	112,7	8,8	0	15,6	15,6
9	40,2	43,7	3,5	40,2	37,4	-2,8	0	3,5	3,5
10	9,6	9	-0,6	6,7	7,9	1,2	2,4	0,5	-1,9
11	0,9	1,3	0,4	0,9	1,3	0,4	0	0	0
12	18,8	26,2	7,4	18,4	24,4	6	0	1,7	1,7
13	8,5	10,4	1,9	8,5	9,1	0,6	0	1,1	1,1
14	43,5	34,4	-9,1	43,5	34,4	-9,1	0	0	0
15	3,2	2,1	-1,1	3,1	2,1	-1	0	0	0
16	0,8	0,7	-0,1	0,6	0,7	1	0,1	0	-0,1
17	0,6	0,6	0	0,6	0,4	-0,2	0	0,2	0,2
18	33,6	31,6	-2	32,6	31,1	-1,5	0,4	0,5	0,1
19	20,7	19,8	-0,9	16,3	17,1	0,8	3,9	2,7	-1,2
20	18,8	23,2	4,4	15,8	16,5	0,7	2	4,1	2,1
21	1,6	1,6	0	0,5	1	0,5	0,9	0,3	-0,6
22	5,8	7,1	1,3	4	4,5	0,5	1,3	2	0,7
23	1,1	1,3	0,2	0,4	0,5	0,1	0,5	0,4	-0,1
24	23	25,8	2,8	18,2	19,7	1,5	3,8	5,9	2,1
25	13,7	12,9	-0,8	13,7	12,9	-0,8	0	0	0
Média	15,63	17,30	1,67	14,62	14,90	0,31	0,76	1,67	0,9

Tabela 4.11 – Comparação entre Técnica Convencional e ImageJ®

Úlcera	Área (cm2) da Úlcera (ImageJ)	Área (cm2) Papel centimetrado	Úlcera Eixo transversal da Úlcera (cm)	Úlcera Eixo longitudinal da Úlcera (cm)	Área (cm2) da Úlcera (Elipse)	Área (cm2) da Úlcera (Retângulo)
1	1,1	1	1,1	0,8	0,7	0,9
2	3,1	3	1,7	1,5	2,0	2,6
3	6	7	2,4	2,6	4,9	6,2
4	0,8	0,5	0,5	0,7	0,3	0,4
5	13,3	15	2,9	5,1	11,6	14,8
6	6,8	6	2,7	3,2	6,8	8,6
7	13	11	5,7	4,2	18,8	23,9
8	136,7	48	15,2	9,5	113,4	144,4
9	43,7	30	7,7	5,8	35,1	44,7
10	9	7	4,4	2,7	9,3	11,9
11	1,3	1	1	0,9	0,7	0,9
12	26,2	15	4	4,6	14,5	18,4
13	10,4	7	4,5	2,4	8,5	10,8
14	34,4	33	10,6	6,2	51,6	65,7
15	2,1	4	2	1,9	3,0	3,8
16	0,7	1	0,8	1,1	0,7	0,9
17	0,6	1	0,9	0,8	0,6	0,7
18	31,6	43	7,4	6,1	35,5	45,1
19	19,8	25	5,7	6,1	27,3	34,8
20	23,2	23	7,4	3,2	18,6	23,7
21	1,6	2	1,1	1,9	1,6	2,1
22	7,1	7	2,1	4,6	7,6	9,7
23	1,3	1	0,9	1,2	0,8	1,1
24	25,8	18	7,7	3,8	23,0	29,3
25	12,9	10	4,7	3,5	12,9	16,5
Média	17,3	12,78	17,3	17,3	16,4	20,9

Estudo 4: influência da captura de imagem através de método não padronizado e padronizado na análise de imagem.

A tabela 4.12 descreve as medidas de área das úlceras, do tecido de granulação e de fibrina utilizando os métodos não padronizado e padronizado de captura da imagem.

Tabela 4.12 – Comparação entre método padronizado e não padronizado

Úlcera	Padronizada			Não Padronizada		
	Área (cm2) Úlcera	Área (cm2) Tecido de Granulação	Área (cm2) Tecido de Fibrina	Área (cm2) Úlcera	Área (cm2) Tecido de Granulação	Área (cm2) Tecido de Fibrina
1	15,7	8,2	0,8	12,9	10,4	0,6
2	18,2	8,6	2,4	15,1	13	1,9
3	66,5	56,5	7,8	44,8	27,6	16
4	13,6	10,7	2,5	9,6	6,9	2,3
5	14,2	7,6	6,6	10,2	3,9	5,1
6	63,1	43,6	19,4	71,5	29,5	29,9
7	30,5	20,1	6,9	35,4	12	23,4
8	31,9	18,9	10,1	37,4	5,2	30,3
9	16,6	5,8	7,5	20,2	4,9	12,6
10	30	23,5	4,2	25,1	15	6,6
11	20	12,6	5,7	12,7	5,4	7,3
12	12,7	10,1	1,5	13,4	10,9	1,5
13	9,8	8	1,3	8,2	5,6	1
14	6	0	6	5,3	0	5,3
15	8,5	5,1	3	10,5	5,4	4,9
16	10,5	8,2	2,3	9,1	5,3	1,6
17	8,8	6,6	0,7	7	4,8	0,8
18	9,3	0	9,3	5,7	0	5,7
19	7	0	7	7	0	7
20	7	4,9	2,1	7,9	5,1	2,7
21	9,7	7,8	1,9	10,6	6,1	2
22	8	3,8	4,1	8,5	3,9	4,2
23	2,4	1,4	0,8	4,1	2,3	2
24	1,1	1,1	0	1,3	1,3	0
25	0,3	0,3	0	0,4	0,4	0
26	1,5	0,7	0,5	1,8	0,7	0,9
27	1,1	1	0,1	1,1	0,9	0,1
28	2,6	2	0,6	2,3	1,3	0,6
29	3,4	2,1	1,3	2,9	1,1	1,8
30	2,2	1,8	0,4	1,9	1,3	0,6
Média	14,41	9,37	3,89	13,46	6,34	5,96

Estudo 5: influência humana na segmentação manual da borda da úlcera e dos tecidos de granulação e fibrina realizada através de mouse na análise de imagem.

A tabela 4.13 descreve a influência humana no uso do software ImageJ®.

Tabela 4.13 - Influência Humana no uso do Software ImageJ®

Úlcera	Usuário 1			Usuário 2		
	Área (cm2) Úlcera	Área (cm2) Granulação	Área (cm2) Fibrina	Área (cm2) Úlcera	Área (cm2) Granulação	Área (cm2) Fibrina
1	17,00	12,20	3,50	18,10	13,30	3,60
2	19,90	9,80	9,30	15,70	7,80	6,80
3	18,60	13,70	4,30	16,20	10,40	5,80
4	16,00	12,10	2,40	14,50	12,30	1,30
5	15,10	13,10	2,00	15,00	12,70	2,30
6	14,10	12,20	1,50	13,20	13,20	0,00
7	14,30	13,60	0,70	12,90	12,90	0,00
8	31,70	24,70	6,90	31,90	18,90	10,10
9	32,40	25,70	6,40	38,00	23,40	14,60
10	34,10	25,50	8,00	34,60	25,60	9,00
11	14,30	14,30	0,00	15,10	12,50	2,60
12	16,00	16,00	0,00	17,60	12,80	3,90
13	1,60	0,90	0,60	1,20	0,60	0,60
14	1,40	0,80	0,50	0,80	0,50	0,30
15	0,70	0,50	0,20	0,60	0,40	0,20
Média	16,48	13,01	3,09	16,36	11,82	4,07

4.6 Resultados Estatísticos

A análise estatística dos resultados experimentais foi realizada com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas incluindo e não incluindo as úlceras com área menor que 1,5 cm².

A tabela 4.14 descreve os resultados estatísticos da comparação entre as úlceras dos grupos experimentais para os seguintes parâmetros:

- Áreas das úlceras do grupo 1 e do grupo 2 no 30° e 60° dia
- Razão r_1 das úlceras de perna no 90° dia
- Razão entre tecido de granulação e área total das úlceras no 1°, 15°, 30°, 45°, 60°, 75° e 90° dias.
- Razão entre tecido de fibrina e área total das úlceras no 1°, 15°, 30°, 45°, 60°, 75° e 90° dias.

A homogeneidade entre os grupos experimentais foi avaliada através da análise estatística dos seguintes parâmetros:

- área das úlceras de perna no 1° dia
- razão entre tecido de granulação e área total no 1° dia
- razão entre tecido de fibrina e área total no 1° dia

A tabela 4.14 mostra que esses parâmetros não são estatisticamente diferentes e que, portanto, os grupos eram homogêneos.

Houve diferença estatística nas seguintes comparações:

- razão r_1 das úlceras de perna no 90° dia
- razão entre tecido de granulação e área total no 30°, 45°, 60°, 75°, 90° dias não incluindo as úlceras com área menor que 1,5 cm².
- razão entre tecido de fibrina e área total no 30°, 45°, 75°, 90° dias não incluindo as úlceras com área menor que 1,5 cm².

A tabela 4.15 descreve os resultados estatísticos da comparação entre as úlceras dos grupos experimentais para os seguintes parâmetros:

- célula marcada pela enzima iNOS no 1° e 45° dia.
- célula marcada pelos fatores de crescimento TGFB e VEGF no 1° e 45° dia.

Não houve diferença estatística nas quantificações dos parâmetros acima descritos.

Tabela 4.14 - Resultado Estatístico da Análise das Áreas das Úlceras

Teste Mann-Whitney ($\alpha=0,05$)

Teste A: incluindo as úlceras com área $<1,5\text{cm}^2$ ($n_1=7$, $n_2=9$, $U_{\text{critico}}=51$)

Teste B: não incluindo as úlceras com área $<1,5\text{cm}^2$ ($n_1=6$, $n_2=7$, $U_{\text{critico}}=36$)

	Teste A			Teste B		
	Média Grupo 1 Grupo 2	U calculado	rejeição	Média Grupo 1 Grupo 2	U calculado	rejeição
Áreas das úlceras no 1º dia	28,23 10,03	39	não	32,78 13,75	25	não
Áreas das úlceras no 30º dia	33,05 18,83	37	não	38,56 24,05	25	não
Áreas das úlceras no 60º dia	28,38 16,87	39	não	33,11 21,69	22	não
Razão r_1 das úlceras no 90º dia	-0,03 0,41	51	sim	-0,20 0,24	38	sim
Razão r_2 das úlceras no 1º dia	0,70 0,71	39	não	0,66 0,67	25	não
Razão r_2 das úlceras no 15º dia	0,64 0,67	34	não	0,61 0,68	25	não
Razão r_2 das úlceras no 30º dia	0,37 0,77	50	não	0,43 0,76	40	sim
Razão r_2 das úlceras no 45º dia	0,48 0,85	34	não	0,56 0,85	41	sim
Razão r_2 das úlceras no 60º dia	0,54 0,62	50	não	0,63 0,80	38	sim
Razão r_2 das úlceras no 75º dia	0,51 0,66	51	sim	0,59 0,85	40,5	sim
Razão r_2 das úlceras no 90º dia	0,53 0,68	50	não	0,62 0,88	38	sim
Razão r_3 das úlceras no 1o dia	0,28 0,29	31	não	0,33 0,29	23	não
Razão r_3 das úlceras no 15º dia	0,34 0,29	32,5	não	0,38 0,30	25,5	não
Razão r_3 das úlceras no 30º dia	0,49 0,25	59	sim	0,57 0,22	39	sim
Razão r_3 das úlceras no 45º dia	0,38 0,14	70	sim	0,44 0,13	42	sim
Razão r_3 das úlceras no 60º dia	0,31 0,12	54	sim	0,36 0,15	33	não
Razão r_3 das úlceras no 75º dia	0,34 0,11	60	sim	0,40 0,14	42	sim
Razão r_3 das úlceras no 90º dia	0,32 0,09	58,5	sim	0,38 0,11	38,5	sim

Tabela 4.15 - Resultados Estatísticos da Análise da Imunohistoquímica
 Teste Mann-Whitney ($\alpha=0,05$, $n_1=5$, $n_2=6$, $U_{critico}=27$)

	Média Grupo 1 Grupo 2	U calculado	rejeição
iNOS_1 ^o dia	2,69	18	não
iNOS_45 ^o dia	2,89 2,74 3,52	24	não
TGFB_1 ^o dia	1,68	22	não
TGFB_45 ^o dia	2,27 1,73 3,05	25	não
VEGF_1 ^o dia	1,42	17	não
VEGF_45 ^o dia	1,49 1,86 2,65	21	não

As tabelas 4.16 a 4.18 descrevem os resultados estatísticos dos estudos de 1 a 5 sobre validação e comparação do software ImageJ[®].

Tabela 4.16 – Estudos 1 a 3
Resultados Estatísticos - Teste Mann-Whitney ($\alpha=0,05$)

Estudo	Média das Áreas (cm²)	Ucritico n1=5,n2=5	Umedido	Zcritico n1=25,n2=25	Zmedido	rejeição
1 Área da Úlcera (massa) Área da Úlcera (ImageJ®)	19,48 18,51	64	36	-	-	não
2 Área da Úlcera (desenho) Área da Úlcera (foto)	15,63 17,30	-	-	1,96	0,27	não
2 Área de Granulação (desenho) Área de Granulação (foto)	14,62 14,90	-	-	1,96	0,21	não
2 Área de Fibrina (desenho) Área de Fibrina (foto)	0,76 1,67	-	-	1,96	2,94	sim
3 Área da Úlcera (ImageJ®) Área da Úlcera (papel)	17,30 12,78	-	-	1,96	0,28	não
3 Área da Úlcera (ImageJ®) Área da Úlcera (elipse)	17,30 16,39	-	-	1,96	0,27	não
3 Área da Úlcera (ImageJ®) Área da Úlcera (retângulo)	17,30 20,88	-	-	1,96	0,36	não

Tabela 4.17 – Estudo 4
Resultados Estatísticos - Teste Mann-Whitney ($\alpha=0,05$)

Estudo	Média das Áreas (cm²)	U_{crítico} n1=5,n2=5	U_{medido}	Z_{crítico} n1=30,n2=30	Z_{medido}	Rejeição
Área da Úlcera (padronizada)	14,41	-	-	1,96	0,30	não
Área da Úlcera (não padronizada)	13,46					
Área de Granulação (padronizada)	9,37	-	-	1,96	0,67	não
Área de Granulação (não padronizada)	6,34					
Área de Fibrina (padronizada)	3,89	-	-	1,96	1,06	não
Área de Fibrina (não padronizada)	5,96					

Tabela 4.18 - Estudo 5
Resultados Estatísticos
Teste Mann-Whitney ($\alpha=0,05$, $n_1=15$, $n_2=15$, $U_{crítico}=161$)

Área (cm²)	Média Pesquisador 1 Pesquisador 2	U calculado	rejeição
Úlcera	16,48 16,36	119,5	não
Granulação	13,01 11,82	127,5	não
Fibrina	3,09 4,07	125	não

5. Discussão

Foi observado que o uso de uma película de látex (preservativo) envolvendo o cabeçote do transdutor de ultra-som para evitar a transmissão de inúmeros patógenos promoveu uma atenuação de 11% da potência, necessitando assim uma calibração prévia do aparelho objetivando uma potência de 30mw/cm².

O monitoramento fotográfico é usado no acompanhamento e ilustração dos diferentes graus de gravidade das lesões de pele. Fotografias digitais têm sido um método padrão para documentação dos resultados em práticas cirúrgicas dermatológicas (COENRAADS, *et al* 2005; RATNER, 2000).

Benson *et al* (2005) utilizaram imagens fotográficas para o acompanhamento de tratamento dentário com a utilização do software Image Pro-Plus. Nesse estudo os autores se preocuparam em diminuir o reflexo produzido na fotografia com o auxílio de aparatos específicos, demonstrando que ele influencia nos resultados da análise de imagem e que, portanto, há necessidade de padronização na captura de imagem.

O processo de medida da área de uma úlcera é ainda predominantemente visual (qualitativo) e subjetivo devido às dificuldades em mensurar suas áreas e modificações teciduais. O monitoramento evolutivo de úlceras de pele apresenta desafios (MEDEIROS, 2001).

O uso do software ImageJ[®] tem sido citado para a mensuração de imagens (SHIRATORI, *et al.* 2005) mas não há relatos do seu uso para a medida de áreas de úlceras de pele e nem mesmo dos seus diferentes tecidos. O monitoramento da úlcera pode ser baseado na área ulcerada e na profundidade, sendo este um parâmetro de difícil quantificação por envolver 3 dimensões. A profundidade não foi avaliada nesse estudo. Adicionalmente, de acordo com o dinamismo do processo de cicatrização, a evolução das úlceras pode ser acompanhada através das

modificações teciduais de granulação e fibrina (BERRIS, 2000).

Na validação de medida de área através do software ImageJ[®], utilizando áreas com formato irregular e regulares, foi constatado um erro médio não significativo estatisticamente de 4,82%. A causa desse erro é desconhecida, mas não afetou a comparação da eficiência do tratamento de úlceras com SDZ e US, pois o software foi utilizado na análise das imagens das úlceras de ambos os grupos experimentais. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes na comparação entre o uso do ImageJ[®] e técnicas manuais de monitoramento do tratamento de úlceras, bem como entre procedimento padronizado e não padronizado de captura das imagens. O procedimento manual de segmentação das imagens das úlceras através de mouse não é afetado pelo usuário do software. O monitoramento do tratamento de úlceras através de software de processamento de imagem facilita a determinação dos vários parâmetros que caracterizam a cicatrização e permite um registro visual e computadorizado dos mesmos.

Não houve diferença estatística entre as áreas das úlceras de perna, entre as áreas de fibrina e de granulação do grupo 1 (SDZ) e do grupo 2 (US) no 1^o dia de tratamento, caracterizando que havia homogeneidade entre os grupos experimentais no início do tratamento.

Observando as áreas das úlceras nas tabelas 4.3a e 4.3b, pode-se notar que no grupo 1 a maioria das úlceras tiveram diminuição da razão r_1 de cicatrização seguido por um aumento, chegando ao fim do tratamento com as dimensões maiores quando comparadas ao 1^o dia. No grupo 2, em algumas úlceras, ocorreu inicialmente uma diminuição da razão r_1 de cicatrização mas após o 30^o dia houve um aumento das mesmas. Os resultados mostraram que tanto o tratamento com SDZ quanto com US, em um primeiro momento, proporcionaram um aumento das

áreas ulceradas, o que sugere uma ativação da fase inflamatória e conseqüente desbridamento das úlceras. Young e Dyson em 1989 já haviam observado aumento do crescimento capilar em úlceras induzidas experimentalmente em ratas que foram tratadas com ultra-som na frequência de 0,75MHz e intensidade de 0,1 W/cm². O estudo utilizou um grupo placebo (irradiação simulada). O resultado sugere que ocorra a aceleração da proliferação inflamatória e uma cicatrização mais rápida das úlceras.

No final do tratamento, conforme tabela 4.3b, o grupo 2 apresentou um aumento médio da razão r_1 de cicatrização de 0,41cm², isto é, houve um aumento de 41% de reepitelização. No grupo 1 a média foi nula. Houve diferença estatística na razão r_1 de cicatrização entre os grupos, o que caracteriza uma ação benéfica do US na formação tecidual e remodelagem. Outros estudos também demonstraram diminuição da área da úlcera com a utilização do ultra-som (DYSON, *et al.*, 1976; PESCHEN, *et al.*, 1997; FRANEK, *et al.*, 2004).

O tecido de granulação é importante para a reepitelização e é caracterizado pela neovascularização. A fibrina é caracterizada pelas células mortas e é considerada um tecido maléfico para a cicatrização da úlcera. Analisando-se as tabelas 4.5a, 4.5b, 4.6a e 4.6b verificou-se que no grupo 1 ocorreu uma diminuição da granulação e um aumento da fibrina nos dias de tratamento em comparação ao 1º dia. No grupo 2 observou-se um aumento da granulação e uma diminuição da fibrina em quase todos os dias de tratamento. Este fato não foi observado apenas no 15º e 60º dia. Em ambos os grupos, houve um aumento da fibrina no 75º de tratamento, quando comparado ao 60º dia, provavelmente relacionada ao aparecimento natural de fibrina no final da reepitelização, devido à lise do colágeno velho e a síntese do colágeno novo, que é caracterizada por uma fibrina mais

esbranquiçada que a anterior (MITCHELLI, 2005). Verificou-se que no grupo 2 de acordo com as tabelas 4.3b e 4.6b simultaneamente ao aumento da fibrina, houve uma diminuição do diâmetro da úlcera, enquanto no grupo 1, tabelas 4.3a e 4.6^a, não houve redução da úlcera, porém correu aumento de fibrina.

Observou-se diferença estatística entre os grupos experimentais na comparação da área de granulação no 30°, 45°, 60°, 75° e 90° dias de tratamento, quando não incluídas as úlceras com área menor que 1,5 cm². Quando as áreas menores que 1,5 cm² foram incluídas na análise estatística houve diferença apenas no 75° dia. A área de fibrina foi estatisticamente diferente no 30°, 45°, 75° e 90° dia com ou sem a inclusão das áreas menores que 1,5cm². No 60° dia de tratamento houve diferença estatística somente quando as áreas menores que 1,5cm² foram incluídas. Observou-se que o US aumentou o tecido de granulação quando comparado ao tratamento com sulfadiazina 1%, sugerindo com isso um aumento na neovascularização. Swist-Chmielewska *et al.* em 2002 observaram que não houve diferença estatística entre as úlceras tratadas com US (1w/cm² e 0,5w/cm²) e as tratadas por métodos convencionais no desenvolvimento da granulação, durante 12 semanas (3meses) de tratamento. Os tratamentos foram administrados 3, 2 e 1 vez por semana no 1°, 2° e 3° mês de tratamento, respectivamente. As úlceras tratadas com US mostraram melhores resultados na diminuição da área e do volume das úlceras venosas resultando em uma cicatrização mais rápida.

Não houve diferença estatística na análise imunohistoquímica, mas pode-se observar na tabela 4.7 que as úlceras do grupo 2 em 45 dias tiveram um aumento 23% maior de iNOS do que no grupo 1. Isto sugere uma possível estimulação da fase inflamatória pois esta enzima faz parte desta etapa da cicatrização. Este aumento da enzima iNOS nos primeiros 45 dias de tratamento pode justificar o

aumento da área superficial no 45º dia de tratamento. Neste mesmo dia houve também um aumento dos fatores de crescimento TGF β e VEGF em 44% e 31%, respectivamente, em relação ao aumento dos mesmos fatores no grupo 1. Isto sugere que no grupo 2 ocorreu aumento de fibroblastos e de vasos sanguíneos, levando as úlceras a uma cicatrização mais rápida. Um estudo investigou o efeito do ultra-som (15 e 30mW/cm²) na produção de IL-8, FGF e VEGF *in vitro* em células de monócitos, fibroblastos e osteoblastos, concluindo que o VEGF alcançou o maior número de produção nos 3 tipos de células independentemente da intensidade (REHER *et al.*,1999).

6. Conclusão

O uso de uma película de látex (condon) no cabeçote de um transdutor ultrassônico não significou perda de energia transmitida podendo ser usada na estomatoterapia como uma forma de prevenção da transmissão de doenças infecto-contagiosas.

Não houve diferença estatística significativa nos resultados da análise de imagem de úlceras pelo software ImageJ[®] utilizando métodos padronizados e não padronizados de captura das mesmas.

O processamento das imagens de úlceras constitui uma ferramenta que deve ser implantada na rotina clínica de tratamento de úlceras para que os profissionais da área da saúde possam ter um registro quantitativo, visual e computadorizado da área da lesão, visando o aperfeiçoamento dos serviços de estomatoterapia.

O processamento das imagens de imunohistoquímica é uma técnica que deve ser implementada na análise da imunohistopatologia.

O US acelera todas as fases da cicatrização quando comparado ao tratamento com curativos diários à base de creme sulfadiazina de prata 1% (SDZ). Na fase inflamatória houve aumento da enzima iNOS proporcionando o desbridamento da ferida. Houve aumento dos fatores de crescimento TGF β e VEGF que atuam na neovascularização e na remodelagem. No decorrer do tratamento o US mostrou ser mais eficiente no aumento da granulação e diminuição da fibrina, ocasionando uma reepitelização mais rápida das úlceras.

7. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; POBER, J.S. (2003). **Imunologia celular e molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter.

ANASTÁCIO, M.A.D.J. (2000). **Reparação epitelial em úlceras vasculares após estimulação do ultra-som pulsado de baixa intensidade**. 89p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Interunidades em Bioengenharia - EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

ARAI, T. et al. (1993). The effect of ultrasound stimulation on disuse osteoporosis. In: **13th Annual Meeting of Bioelectrical Repair and Growth Society**, Dana Point, CA, USA.

ARNOLD, F.; WEST, D. (1991). Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology and Therapeutic**, New York, v.52, n.3, p.407-422, Dec.

AZUMA, Y. et al. (2001). Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on various cellular reactions involved in fracture repair. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.16, n.4, p.671-680.

BARROS, J.R. (2000). Insuficiência venosa crônica. In: PITTA, G.B.B.; CASTRO, A.A.; BURIHAN, E. **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**. Maceio: UNISAL/ECMAL.

BENSON, P.E. et al. (2005). Measurement of White Lesions Surrounding Orthodontic Brackets: Captured Slides Vs Digital Camera Images. **Angle Orthodontic**, v.75, n.2, p. 226-300.

BERRIS, P.W. (2000) **Acquisition of wound images and measurement of wound healing rate and status using color image processing**. PhD Thesis - Department of Engineering, University of Reading Department of Engineering. September, 2000.

BIER, O. et al. (1982). **Imunologia básica e aplicada**. São Paulo: Guanabara.

BISHOP, J.B.; COLS (1992). A prospective randomized evaluator-blinded trial of two potential wound healing agents for the treatment of venous stasis ulcers. **J. Vasc. Surg**, v.16, p. 251-7.

BOECKX, W.; BLONDEEL, N.; VANDERSTEEN, K.; WOLF-PEETERS, C.; SCHMITZ, A. (1992). Effect of cerium nitrate-silver sulphadiazine on deep dermal burns: a histological hypothesis. **Burns**, v. 18, n. 6, p. 456-62.

BURGESS, A.W. (1989). Epidermal growth factor and transforming growth factor alfa. **British Medical Bulletin**, Australia, v.45, n.2, p.401-424.

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

CHETTIBI, S.; FERGUSON, M.W.J. (1999). Wound repair: an overview. In: GALLIN, j.i.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical**

correlates. 3rded. Philadelphia: edited by John I. Gallin and Ralph Snyderman p.865-88.

CHOFFIE, M.; DUARTE, L.R. (1994). Low-intensity ultrasound and effects on ununited fractures. **In: Read at the Orthopaedic Health Conference**, June 15, São Paulo: University Hospital, Brazil.

CHILDRESS, B.B.; STECHMILLER, K.J. (2002). Role of nitric oxide in wound healing. **Biological Research for Nursing**, Canada, v.4, n.1, p.5-15, July.

COENRAADS, P.J., et al. (2005) Construction and validation of a photographic guide for assessing severity of chronic hand dermatitis. **British Association of Dermatology**, v.152, p. 296-301.

CORDTS, P.R. et al. (1992). A prospective, randomized, trial of unna's boot versus duoderm CGF hydroactive dressing plus compression in the management of venous leg ulcers. **Journal of Vascular Surgery**, St.Louis, v.15, n.3, p.80.

COOK, S. D; et. al. (2001). Improved Cartilage Repair after Treatment with Low-Intensity Pulsed Ultrasound. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.391, p. 231-243.

DAYTON, P.D.; PALLADINO, S.J. (1989). Electrical stimulation of cutaneous ulcerations. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v.79, n.7, p.318-321, july.

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

DUARTE, L.R.; XAVIER, C.A.; CHOFFIE, M. McCABE, J.M (1996). Review of nonunions treated by pulsed low-intensity ultrasound. **Société Internationale de Chirurgie Orthopedique et de Traumatologie (SICOT)**, Amsterdam, p. 110.

Drug Information (2002), American Society of Health-System Pharmacist, 44th Edition, Bethesda – United States

DYSON, M. (1987). Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, London, v.73, n.3, p.116-122.

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

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

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

FALANGA, V.; EAGLSTEIN, W.H. (1996). **Úlceras dos membros inferiores: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Revinter.

FISCHER, R. (1979). **Progressos em cirurgias de varizes**. São Paulo: Manole.
FOX, C.L.; MONAFO, W.W.; AYVAZIAN, *et al.* (1977). Topical chemotherapy for burns using cerium salts and silver sulfadiazine. **Surg . Gynecol. Obstet.**, v. 144, p. 668.

FRADE, M.A.C. et al. (2001). Estudo clínico-epidemiológico de úlceras de perna em Juiz de Fora. In: Reunião Anual de Dermatologistas do Cone Sul. **Anais da XXI RADLA**, Foz do Iguaçu, p.84.

FRANEK, A. et al. (2004). Application of various power densities of ultrasound in the treatment of leg ulcers. **Journal of Dermatology Treatment**, v.15, n.6, p.379-386, Dec.

FRANKEL, V.H.; KOVAL, K.J.; KUMMER, F.J. (1999). Ultrasound treatment of tibial nonunions. **American Academy of Orthopaedic Surgeons 66th Annual Meeting**, Anaheim: p.4-8, Feb.

GEBAUER, D. et al. (2000). Nonunions treated by pulsed low-intensity ultrasound. **Journal of Orthopedic Trauma**, Hagerstown, v.14, n.2, p.154, Feb.

GLAZER, P.A. et al. (1998). Use of ultrasound in spinal arthodesis: a rabbit model. **Spine**, Philadelphia, v.23, n.10, p.1142–1148, May.

GOIHMAN-YAHR, M. (1997). Correspondence. **International Journal of Dermatology**, New York, v.36, p.399-400.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. (2002) **Fisioterapia Dermato Funcional**. 3. ed. São Paulo: Manoli. p. 13-22.

HAAR, G.T. (1978). Basic physics of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, London, v.4, n.4, p.100-103, april.

HABIF, P.T. (2005). **Guia colorido para diagnóstico e tratamento: dermatologia clínica**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. p.15-36.

HADJIARGYROU, M. et al. (1998). Enhancement of fracture healing by low-intensity ultrasound. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.355S, p.216-229, Oct. Suppl.

HECKMAN, J. D.; RYABY, J.P.; MCCABE, J.; FREY, J.J.; KILCOYNE, R.F. (1994) Acceleration of Tibial Fracture Healing by Non-Invasive, Low-Intensity Pulsed Ultrasound, **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.76,n.1, p.26-34.

HILÁRIO, M.L. (1993). **Radiação ultra-sônica de baixa intensidade na reparação tecidual de úlceras tróficas de perna**. 153p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa Interunidades em Bioengenharia - ESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

HINDRYCKX, P.H.; CUYPER, C.; HENDRICKX, B.; MULLIE, A. (1990) The treatment of infected decubitus ulcers with 1% silver sulfadiazine cream. **Curr. Ther. Res.**, v.48, n.3, p. 535-9.

HOOGLAND, R. (1986). **Terapia ultrasônica**. Holanda: Enraf-Nonius. p.5-35.

HSU, S.; HUANG, T. (2004). Bioeffect of ultrasound on endothelial cells in vitro. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v.2, n.3/5, p.99-104, Nov.

ITO, M. et al. (2000). Effects of ultrasound and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. **Ultrasound in Medicine & Biology**, Elmsford, v.26, n.1, p.161-166, Jan.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (2004a). Sistema imunitário e órgãos linfáticos. In: _____. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

_____. (2004b). Tecido epitelial. In: _____. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

KANH, J. (1991). **Ultrasound in principles and practice of electrotherapy**. New York: Churchill Livingstone. Cap.4, p.51-70.

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

KINSLER, L.E.; FREY, A.R.; COPPENS, A.B; SANDERS, J.V. (1982) In: Transmission Phenomena. **Fundamentals of Acoustics**, John Wiley & Sons.

KIRSNER, R.S.; EAGLSTEIN, W.H. (1993). The wound healing process. **Dermatology Clinics**. Florida, v.11, n.4, p.629-640, Oct.

KOKUBO, T. et al. (1999). Low-intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.256, n.2, p.285-287, Mar.

KREMKAU, F.W. (1985). Physical considerations. In: NYBORG, L.N.; ZISKIN, M.C. **Biological effects of ultrasound**. New York: Churchill Livingstone. Cap.2, p.9-21.

KRISTIANSEN, T.K.; RYABY, J.P.; MCCABE J.; FREY, J.J.; ROE, L.R. (1997) Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.79, n.7, p.961-973.

KUCAN, J.O.; ROBSON, M.C.; HEGGERS, J.P.; KO, F. (1981). Comparison of silver sulfadiazine, povidone-iodine and physiologic saline in the treatment of chronic pressure ulcers. **J. Am. Ger. Soc**, v.29, n.5, p. 232-5.

LEHMANN, J.F.; GUY, A.W. (1972). Ultrasound therapy. In: REID, J.; KIKOV, M. **Interaction, of ultrasound and biological tissues**. Washington: USA Government Printing Office. (Dhew Publication, (FDA) nº 73-8008). p.141-152.

LUNDENBERG, T. et al. (1990). Pulsed ultrasound does not improve healing of venous ulcer. **Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine**, Stockholm, v.22T, n.4, p.195-197.

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.

MAYR, E.; WAGNER, S.; RÜTER, A. (1997). Treatment of nonunions by means of low intensity ultrasound. **Der Unfallchirurg**, Berlim, v.268, p.958-962.

MEANI, E.; ROMANO, C.L. (1997). Low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of septic nonunion. In: **Third Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology**, Barcelona.

MEDEIROS, G.C.F. (2001) **Uso de texturas para o acompanhamento da evolução do tratamento de úlceras dermatológicas**. Dissertação de Mestrado - Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

MELETTE, H. C.; HUTT, B. K.; ASKOVITZ, S.I.; HOVARTH, S. M. (1955). Diurnal Variations in body temperatures. **J. Appl. Physiol.** 3ª ed. p. 665-675.

MITCHELLI, N.R. (2005). Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Interamericana. v.29, p. 91-124.

OKUNO, E.; CALDAS, I.L.; CHOW, C. (1986). **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harba.

ORMISTON, M.C. et al. (1985). Contolled trial of iodosorbin chronic venous ulcers. **British Medical Journal**, London, v.291, n.6491, p.308-310, Aug.

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

PHILLIPS, T.J.; DOVER, J.S. (1991). Leg ulcers. **Journal of the American Academy Dermatology**, St.Louis, v.25, n.6, p.965-987, Dec.

PICCINATO, C.E.; COUTINHO-NETTO, J.; CHERRI, J. (2003). Cicatrização. In: CAMPOS, C.A.H.; COSTA, H.O.O. (Ed.). **Tratado do otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca. Cap.12, p.189-200.

PITTA, G.B.B.; CASTRO, A.A.; BURIHAN, E. (2000). **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**. Maceió: UNISAL/ECMAL.

PILLA, A.A., MONT, M.A., NASSER P.R., KHAN A.S., FIGUEIREDO M., KAUFMAN J.J., SIFFERT R.S (1990). Non-Invasive Low-Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Bone Healing in the Rabbit, **Journal of Orthopaedic Trauma**, v.4,n.3, p.246-253.

RAWOOL, D. et al. (2003). Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. **Journal of ultrasound in medicine**, Pennsylvania, v.22, n.2, p.145-53, Feb.

RATNER, D. (2000). Real photographic prints from digital images. **Dermatology surgery**, v. 26, p. 799-800.

REHER, P. et al. (1999). Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. **Cytokine**, Amsterdam, v.1, n.6, p.416-423, June.

RIVITTI, S. (2001). **Dermatologia**. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas.

ROMANO, C.; MESSINA, J.; MEANI, E. (1999). Low-intensity ultrasound for the treatment of infected nonunions. In: AGAZZI, M. et al. **Guarderni di infezione osteoarticolari**. Milan: Masson Periodical Division. p.83-93.

ROSS, M. H.; REITH, E. J. (1993) Histologia Texto e Atlas. 2.ed. São Paulo: Médica Pam Americana. p. 354

RUBIN, C. et al. (2000). The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v.83-A, n.2, p.259-270, Feb.

RUBIN, J.R. et al. (1990). Unnas boot poyuretane foan dressings for the tratmente of venous ulcerations: a randomized propesctive study. **Archives of Sugery**, Chicago, v.125, n.4, p.489-490, Apr.

RYABY, J.T.; DUARTE-ALVES, P.; PILLA, A.A. (1989). Clinically effective ultrasound affects second messenger activity in bone cell cultures. Trans. BRAGS, v.9, p.42.

_____. (1990). Ultrasound and static mechanical force affect second messenger activity in bone cell cultures. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v.15, p.131.

RYABY, J.T.; MATTHEW, J.; DUARTE-ALVES, P. (1992). Low-intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase and TGF- β synthesis in osteoblastic cells. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v.17, p.590.

RYABY, J.T. et al. (1991). Low-intensity pulsed ultrasound modulates adenylate cyclase activity and transforming growth factor beta synthesis. In: BRIGHTON, C.T.; POLLOCK, S.R. **Electromagnetics in biology and medicine**. San Francisco: San Francisco Press. p.95-100.

SANTANA, L. A. (2003). **O uso do ultra-som de baixa intensidade em Úlcera de pele**. Monografia (Graduação em Fisioterapia) - Universidade de Cruz Alta, Cruz Alta, 2003.

SATO, W.; TAJASHI, M.; NAKAMURA, K. (1999). Acceleration of increase in bone mineral content by low-intensity ultrasound energy in leg lengthening. **Journal of Ultrasound in Medicine**, Philadelphia, v.18, n.10, p.699-702, Oct.

SHAI, A; MAIBACH, H.I. (2005). **Wound healing and ulcers of the skin**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 91-92.

SHIRATORI, C.A. et al. (2005). Avaliações das dimensões orbitárias de coelhos após enucleação e evisceração. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 68, n.2, p. 235-239.

STRAUSS, E.; OPPENHEIM, W.; PETRUCCELLI, R.C. (1996). **Accelerated fracture healing with pulsed low-intensity ultrasound**. Société Internationale de Chirurgie Orthopedique et de Traumatologie (SICOT), P2.111: PDS30.

SOARES, S.C. et al. (2004). Úlcera de perna tratamento e cicatrização. **HU Revista**, Juiz de Fora, v.30, n.2/3, maio.

SWIST-CHMIELEWSKA, D. et al. (2002). Experimental selection of best physical and application parameters of ultrasound in the treatment of venous crural ulceration. **Polski Merkurusz Lekarski**, Katowicach, v.12, n.72, p.500-505, June.

TANG, C., et. al. (2006). Ultrasound Stimulates Cyclooxygenase-2 Expression and Increases Bone Formation through Integrin, Focal Adhesion Kinase, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Akt Pathway in Osteoblasts. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 2046-2056.

TANZER, M. et al. (1995). The effect of non-invasive low intensity ultrasound on bone growth into porous coated implants. In: **Annual Meeting**, Orlando: Orthopaedic Research Society, v.41

VICENTE, M.F.R. et al. (2000). **Efeitos da estimulação ultra-sônica de baixa intensidade em osteotomias de mandíbula – estudo experimental em coelhos**. 193p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Interunidades em Bioengenharia - EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. (1987). **Biologia celular**. Rio de Janeiro: Atheneu.

XAVIER, C.A.M.; DUARTE, L.R. (1983). Ultrasonic stimulation of bone callus: clinical application. **Rev. Brazil Orthop**, v.18, p.73-80.

ZORN, T.M.T. (2004). Tecido conjuntivo. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. p. 92-124.

YANG, R. et. al. (2005). Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. **Bone** v. 36, p. 276-283.

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

YOUNG, S.R.; DYSON, M. (1989). The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. **Ultrasound in Medicine & Biology**, Elmsford, v.16, n.3, p.261-269, Oct.

WANG, S.J. et al. (1994) Low-intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v.12, n.1, p.40-47, Jan.

WARD, R.S.; SAFLE J.R. (1995) Topical agents in burn and wound care. **Phys Ther**, v.75, n.6, p.526-38.

WARDEN, S.J. (2000). Acceleration of fresh fracture repair using the sonic accelerated fracture healing system: a review. **Calcified Tissue International**, New York, v.66, n.2, p.157-163, Feb.

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

WIENER, W. et.al. (1991). Leg ulcers due venous insufficiency. In: WESTERHOF, W. (Ed.). **Leg ulcers diagnosis and treatment**. Amsterdam: Elsevier. Cap.7.

WILLIAMS, R. (1987) **Production and Transmission of Ultrasound**. Vol.73, n°3.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. (1997). General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, Oxford, v.77, n.3, p.509-528.

8. Anexos

Anexo A

Termo de Consentimento

(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: “**Avaliação imunohistopatológica do tratamento de úlceras perna por ultra-som de baixa intensidade**”

Introdução: O uso de ultra-som para o tratamento das feridas de perna estimula a cicatrização, podendo fechar mais rapidamente as feridas.

Objetivo: Avaliar o uso do ultra-som no tratamento das feridas de perna 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 ultra-som de baixa intensidade no tratamento das feridas de perna, isolado ou associado a outras formas de tratamento/curativos como a biomembrana de látex natural.

Procedimento: O paciente voluntário deverá ler o termo de consentimento abaixo, responder a um protocolo (anexo), além de permitir um exame dermatológico geral. Deverá concordar com a realização das biópsias para avaliar as características dos tecidos das feridas, do tratamento com ultra-som que será aplicado em torno da ferida por aproximadamente 20 minutos, através de um transdutor de ultra-som, sem perfuração ou penetração da pele, além dos curativos com biomembrana de látex que deverão ser trocados 3 vezes por semana, após lavagem da ferida com soro fisiológico e cobertura com gazes e crepom.

Eu, _____ DN ____/____/____
 Identidade ou certidão de nascimento nº _____ Sexo: () M () F
 Residente à _____ nº _____ Bairro _____
 Cidade: _____ Estado _____ Tel: _____

Declaro que recebi por escrito, li e compreendi o resumo do trabalho de pesquisa “**Avaliação imunohistopatológica do tratamento de úlceras perna por ultra-som de baixa intensidade**” HC -FMRP - USP e estou disposto a participar voluntariamente neste trabalho como paciente com 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 para os seguintes estudos:
- Preencher uma ficha que me identifica e permitir que me examine a pele em busca de lesões cutâneas. Isto será feito sobre orientação de um dos participantes, sem risco para minha pele ou qualquer parte do meu corpo;
- Aceitarei que os pesquisadores fotografem minha ferida e sua evolução.
- Aceitarei que os pesquisadores colem amostra de meu sangue (15ml), semelhante ao exame de sangue normal (se necessário), além da realização de biópsias em minha pele e do conhecimento dos resultados desses exames;
- Estas informações que darei serão sigilosas (guardadas em segredo) sendo que não terei meu nome citado em momento algum tendo minha imagem protegida sempre;
- Não permitirei nenhum tipo de atitude que não queira, os exames serão feitos de forma que eu concorde, respeitando-me inteiramente;

- Serão respeitadas quaisquer vontades minhas como religião, cultura e valores pessoais que não me façam aceitar qualquer um desses exames ou questionário;
- Sei também que desta forma ajudarei no estudo científico do tratamento das úlceras.
- Para qualquer esclarecimento, acompanhamento ou tratamento dermatológico, terei acesso aos serviços dos médicos desta pesquisa, que me forneceram seu endereço e contatos caso eu queira.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____

Assinatura do Paciente _____

Examinador _____

Anexo B

Avaliação imunohistopatológica do tratamento de úlceras de perna por ultra-som de baixa intensidade (ADUN-HCFMRP-USP)

Identificação: Caso:.....Início do acompanhamento.....
 Nome:.....Sexo.....Idade.....Est. Civil.....
 Residência.....Naturalidade.....
 Profissão.....Cor.....

Exame Geral:

Doença de Base: () Arteriosclerose () Insuf. Arterial () Insuf. Venosa () Diabetes tipo I
 () Diabetes tipo II () AVC () TVE () HAS () Epilepsia () Alcoolismo () Outras
 doenças associadas:
 Medicamentos em uso: () ATB () Anti hipertensivo () Hipoglicemiantes () Vitaminas ()
 Insulina
 () Anticoagulante () Quimioterápicos () Imunossupresor () Hemotransfusões ()
 Outros

Exames Laboratoriais:

Hemoglobina.....g% Glicemia.....g% Albumina g/dl

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 () Sero Sanguinolenta () Sanguinolenta () Puro lento
 Volume: () Ausente () Pouco (1 pct. gaze) () Moderado (3 pct. gazes)
 () Acentuado (mais de 3 pct. gazes)
 Sinais de Infecção:() Não () Sim Quais
 Odor: () Ausente () Discreto () Acentuado
 Dor/Escore: () Ausente () leve () Moderada () Intensa
 Tempo de Existência:.....Já cicatrizou anteriormente? () Sim () Não

Exame Histopatológico:

Inicial:	45d:
-----------------	-------------

Exame Fotográfico:

Inicial:	15d:	30d:	45d:	60d:	75d:	90d:

Avaliação Terapêutica:

Resposta ao tto	Ferida		
Aspecto clínico observado	Sim	Não	Data
Evidência de granulação			
Evidência de reepitelização			
Reepitelização total			
Aumento da úlcera			
Controle da Cor			
Suspensão do tto			
Abandono do tto			

Causas da Suspensão:.....
 Causas do Abandono:

Anexo C

Detalhamento da realização do procedimento imunohistoquímico

Etapa 1 – As peças biopsiadas foram colocadas em soro fisiológico 0,9%, em seguida acondicionadas em “Tissue Tek®” e congeladas à temperatura de -70°C .

Figura 8.1 - Tissue Tek

Etapa 2 – As mostram foram levadas ao criostato na temperatura de -21°C para realização dos cortes medindo $10\mu\text{m}$ de espessura.

(a)

(b)

Figura 8.2 - (a) Frente do criostato; (b) Interior do criostato

Etapa 3 – Os cortes foram realizados em duplicatas e distribuídos paralelamente nas lâminas de microscopia.

Figura 8.3 - Cortes das peças biopsiadas

Etapa 4 – As lâminas foram colocadas na acetona por 5 minutos no freezer à -20°C

Etapa 5 – As lâminas foram submetidas ao descongelamento em temperatura ambiente por 5 minutos, lavagens em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01M por 3 vezes de 5 minutos.

Figura 8.4 - Lâminas em PBS no agitador orbital

Etapa 6 - Para o bloqueio da peroxidase endógena os cortes foram submetidos ao peróxido de hidrogênio por 40 minutos (H_2O_2 30 vol.) a 3%, diluído em PBS 0,01M, sempre pipetando 50 μ l em cada corte.

Figura 8.5 - Cortes sendo pipetados

Etapa 7 - As lâminas foram lavadas em PBS 0,01M por 3 vezes de 5 minutos sob agitação orbital (figura 8.4).

Etapa 8 - As ligações protéicas inespecíficas foram bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) diluído em PBS 0,01M por 40 minutos de incubação (figura 8.5).

Etapa 9 - As lâminas foram escorridas e acrescentados os anticorpos primários específicos diluídos em solução de PBS e albumina sérica bovina a 1% (PBSA 1%) na concentração de 1:100 para VEGF (A-20) rabbit IgG anti-human sc-152 (Santa Cruz Biotechnology), 1:200 para iNOS (N-20) rabbit IgG anti-human sc-651 (Santa Cruz Biotechnology) e 1:300 para TGF- β_1 (V) rabbit IgG anti-human sc-146 (Santa Cruz Biotechnology). Cinquenta microlitros de anticorpo foram pipetados sobre o fragmento fixado na lâmina (Figura 8.5). As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas overnight à 4°C.

Etapa 10 – As lâminas foram lavadas com PBS 0,01M por 3 vezes de 5 minutos sob agitação orbital (figura 8.4).

Etapa 11 – Os cortes foram incubados por 30 minutos com o anticorpo secundário biotilado anti-rabbit IgG (H+L) made in goat BA-1000 VECTOR (1:200) diluídos em PBSA 1% (figura 8.5).

Etapa 12 - As lâminas foram lavadas em PBS 0,01M por 3 vezes de 5 minutos sob agitação orbital (figura 8.4).

Etapa 13 – Os cortes foram incubados com HRP-Streptavidina (Santa Cruz Biotechnology) por 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz (figura 8.5).

Etapa 14 - As lâminas foram lavadas em PBS 0,01M por 3 vezes de 5 minutos sob (figura 8.4).

Etapa 15 - Para revelação da ação da peroxidase, os cortes foram incubadas pela solução constituída de 2 comprimidos de DAB (3,3'-Diaminiobenzidina SIGMA) 12µL de H₂O₂ 30% e 15mL de PBS 0,01M, pipetados 50µl em cada corte (figura 8.5), mantendo pelo período máximo de 1 minuto, controlando a intensidade da cor. Em seguir, a reação foi interrompida, lavando-se as mesmas com água destilada.

Etapa 16 - A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram colocadas na solução por 20 segundos (figura 8.6) e posteriormente lavadas com água corrente e água destilada.

Etapa 17 – As lâminas foram desidratadas através da bateria de alcóois e xilóis (figura 8.7).

Figura 8.6 - Hematoxilina de Harris

Figura 8.7 - Bateria de álcoois e xilóis

Etapa 18 - Montagem com Entellan[®] da lâmínula na lâmina.

Anexo D

Evolução das áreas das úlceras de perna do grupo 1 (SDZ) e do grupo 2 (US) e dos respectivos tecidos de granulação e fibrina

Tabela 8.1a – Evolução das áreas das úlceras de perna do grupo 1(SDZ)

Úlcera \ Dia	Áreas (cm ²)						
	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°
1	13,82	13,83	25,92	27,32	19,87	20,73	21,35
2	7,14	6,79	10,81	8,29	7,45	8,72	8,18
3	102,54	104,64	122,23	136,73	106,36	100,45	125,30
4	43,70	44,05	42,59	42,87	33,58	36,44	49,02
5	7,54	7,38	7,27	6,27	9,34	9,19	8,66
6	0,97	0,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	21,92	20,36	22,56	21,85	22,03	22,43	22,36

Tabela 8.1b – Evolução das áreas das úlceras de perna do grupo 2 (US)

Úlcera \ Dia	Áreas (cm ²)							
	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°	105°
1	0,32	0,45	0,32	0,11	0,00	0,00	0,00	-
2	9,93	13,44	14,61	15,42	10,58	7,46	3,23	0,00
3	2,36	2,04	2,53	2,21	1,82	1,72	1,73	-
4	31,90	38,01	34,64	30,62	29,53	26,73	32,01	-
5	16,72	23,44	25,23	25,72	22,70	27,51	20,22	-
6	1,15	1,22	0,81	0,60	0,00	0,00	0,00	-
7	7,82	6,36	8,22	9,31	8,63	8,04	6,82	-
8	17,82	14,33	11,10	12,12	12,04	11,89	11,04	-
9	71,77	74,13	72,01	52,56	66,51	43,78	40,82	-

Tabela 8.2a – Evolução das áreas do tecido de granulação do grupo 1 (SDZ)

Úlcera \ Dia	Áreas (cm ²)						
	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°
1	5,93	7,11	6,72	14,76	10,62	14,63	12,15
2	4,76	5,01	4,32	5,73	5,14	4,00	4,50
3	56,82	50,39	64,62	67,94	59,58	59,61	83,72
4	38,84	35,82	10,08	21,25	25,21	14,66	18,94
5	5,67	2,34	3,02	3,41	5,07	6,10	6,22
6	0,91	0,75	0,00	-	-	-	-
7	14,58	16,02	16,13	12,59	16,06	16,24	17,81

Tabela 8.2b – Evolução das áreas do tecido de granulação do grupo 2 (US)

Úlcera \ Dia	Áreas (cm ²)							
	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°	105°
1	0,27	0,35	0,29	0,11	0,00	-	-	-
2	7,96	10,78	11,87	12,55	9,96	6,24	2,82	0,00
3	1,23	1,34	2,26	2,21	1,82	1,72	1,73	-
4	18,93	23,46	25,69	21,77	20,18	20,68	23,36	-
5	5,73	11,12	12,54	22,11	14,69	19,98	13,47	-
6	0,97	0,65	0,53	0,42	0,00	-	-	-
7	6,24	5,29	6,68	8,37	7,65	6,78	6,82	-
8	14,73	8,47	7,62	8,07	7,39	9,25	9,74	-
9	60,33	58,68	65,74	52,56	56,58	43,78	40,82	-

Tabela 8.3a – Evolução das áreas do tecido de fibrina do grupo 1 (SDZ)

Úlcera \ Dia	Áreas (cm²)						
	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°
1	7,53	6,79	19,14	12,64	8,87	6,13	9,25
2	2,24	1,79	6,43	2,57	2,36	4,72	3,66
3	45,01	52,21	57,68	68,86	46,82	40,54	37,68
4	4,90	5,36	32,52	21,65	8,34	21,34	30,16
5	1,92	5,06	4,25	2,88	4,33	3,06	2,45
6	0,00	0,12	0,00	-	-	-	-
7	7,42	4,37	6,27	9,21	5,74	5,26	4,17

Tabela 8.3b – Evolução das áreas do tecido de fibrina do grupo 2 (US)

Úlcera \ Dia	Áreas (cm²)							
	1°	15°	30°	45°	60°	75°	90°	105°
1	0,13	0,00	0,11	0,00	0,00	-	-	-
2	2,04	1,71	1,92	0,85	0,34	1,12	0,26	0,00
3	0,95	0,76	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	-
4	10,10	14,62	9,01	8,93	6,42	6,12	8,14	-
5	10,65	12,31	12,72	3,67	6,81	7,22	6,83	-
6	0,21	0,64	0,32	0,20	0,00	-	-	-
7	1,23	1,11	1,62	0,83	0,55	1,22	0,00	-
8	2,12	4,80	2,73	3,93	3,71	1,92	1,36	-
9	11,47	13,72	3,56	0,00	7,82	0,00	0,00	-