

**PASCALE MUTTI TACANI**

**ULTRA-SOM COM FREQUENCIAS DE REPETIÇÃO  
DE PULSO DE 16 E 100 Hz NA VIABILIDADE E NA  
ANGIOGÊNESE DO RETALHO CUTÂNEO  
RANDÔMICO, EM RATOS *WISTAR*.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,  
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.**

**SÃO PAULO**

**2009**

**PASCALE MUTTI TACANI**

**ULTRA-SOM COM FREQUENCIAS DE REPETIÇÃO  
DE PULSO DE 16 E 100 Hz NA VIABILIDADE E NA  
ANGIOGÊNESE DO RETALHO CUTÂNEO  
RANDÔMICO, EM RATOS *WISTAR*.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,  
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. LYDIA MASA KO FERREIRA**

**CO-ORIENTADORES: Prof. HEITOR CARVALHO GOMES**

**Prof. RICHARD ELOIN LIEBANO**

**SÃO PAULO**

**2009**

Tacani, Pascale Mutti

**Ultra-som com frequências de repetição de pulso de 16 e 100 Hz na viabilidade e na angiogênese do retalho cutâneo randômico, em ratos *Wistar*.**  
Pascale Mutti Tacani. -- São Paulo, 2009.

XIII, 99f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Ultrasound with pulse repetition frequencies of 16 and 100 Hz on angiogenesis and viability of random-pattern skin flaps in Wistar rats.

1. Terapia por ultra-som. 2. Retalhos cirúrgicos. 3. Necrose. 4. Ratos. 5. Neovascularização fisiológica. 6. Isquemia. 7. Modalidades de fisioterapia.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIRURGIA PLÁSTICA**

**COORDENAÇÃO: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO e  
Profa. Dra. LYDIA MASA KO FERREIRA**

## DEDICATÓRIA

---

*Dedico esse trabalho a uma das pessoas maravilhosas que conheci ao trilhar o caminho do mestrado, ao querido Richard, por ter sido mais que um grande mestre, e se tornado um amigo, que nem mesmo distante deixou de me apoiar, incentivar, ajudar e compreender.*

---

## **AGRADECIMENTOS**

À **PROFA. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA UNIFESP, TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP E ORIENTADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, por sua capacidade ímpar de me estimular, ensinar, liderar e abrir meus horizontes;

Ao **PROF. HEITOR CARVALHO GOMES**, CO-ORIENTADOR E PROFESSOR AFILIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pela sua paciência, dedicação e alegria nos momentos mais difíceis;

Ao **PROF. RICHARD ELOIN LIEBANO**, CO-ORIENTADOR E PROFESSOR COLABORADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, por me ensinar a pesquisar com ética, respeito e indagações;

Aos grandes, eternos e maravilhosos amigos **TIAGO SILVEIRA** e **MAÍRA COSTA**, MESTRES PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pelas horas de trabalho árduo, dificuldades e alegrias compartilhadas;

Ao **PROF. BERNARDO HOCHMAN**, ORIENTADOR E PROFESSOR AFILIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

PLÁSTICA DA UNIFESP, por me mostrar o valor e a importância de ser docente;

Ao **PROF. CARLOS EDUARDO PINFILDI**, CO-ORIENTADOR E PROFESSOR ADJUNTO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pelas orientações, sugestões e questionamentos ao longo do desenvolvimento desta pesquisa;

À **MARTA DOS REIS** e **SANDRA DA SILVA**, SECRETÁRIAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA UNIFESP, pelas inúmeras ajudas e incentivos;

Aos demais colegas **PÓS-GRADUANDOS** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pelas sugestões e companheirismo nessa jornada;

À **ELENA DA SILVA**, TÉCNICA DE ENFERMAGEM DA CASA DA CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pelo auxílio prestado durante a execução do experimento;

Ao **PROF. VITOR ARIAS**, PATOLOGISTA DA UNIFESP, pelas análises, orientações e sugestões durante o desenvolvimento dessa pesquisa;

Ao Sr. **ANTÔNIO BUCALON**, EMPRESA BIOSET, pelas orientações, elaboração e doação do equipamento de ultra-som para a realização desse estudo;

Ao Sr. **EUGÊNIO MACHADO DE ANDRADE**, EMPRESA CARBOGEL, pelas orientações e doação do gel para execução desse estudo;

Ao Sr. **ANTÔNIO RODRIGUES DOS SANTOS**, BIOTERISTA DO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIFESP, pelas orientações e auxílio prestado durante a execução do experimento.



## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA**, pela oportunidade de aprendizado, crescimento profissional e matrícula como aluna desse programa com bolsa de estudo da CAPES.

*“O vento e as ondas vão sempre a favor  
de quem sabe navegar”*

*Iglesias Janeiro*

*2009*

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
LISTAS.....	XI
RESUMO.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	02
2. OBJETIVO.....	07
3. LITERATURA.....	09
4. MÉTODOS.....	16
5. RESULTADOS.....	33
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÃO.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	65
NORMAS ADOTADAS.....	84
ABSTRACT.....	86
APÊNDICES.....	88
ANEXOS.....	93
FONTES CONSULTADAS.....	98

## Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição dos grupos e respectivos procedimentos.....	18
Figura 2. Animal epilado, com as demarcações do retalho cutâneo randômico de 10 x 4 cm.....	19
Figura 3. Elevação do retalho cutâneo dorsal de base cranial.....	20
Figura 4. Barreira plástica interposta entre o retalho e o leito doador.....	21
Figura 5. Retalho suturado com pontos simples.....	21
Figura 6. Região de aplicação do US, na base cranial do retalho, dividida em duas áreas de 6 cm <sup>2</sup> .....	25
Figura 7. Esquema da forma de aplicação do US, iniciando-se pelo círculo distal, central e proximal, depois voltando na ordem inversa.....	26
Figura 8. Análise da área de necrose pelo método do gabarito de papel....	27
Figura 9. Fragmento de pele referente às dimensões do retalho, demarcado a cada 5 mm para análise histológica.....	29
Figura 10. Gradeado com 100 pontos sobreposto às fotomicrografias, para contagem dos pontos que coincidem com os vasos sanguíneos (Hematoxilina – Eosina, 400x).....	30
Figura 11. Comparação estatística da área de necrose entre os grupos .....	35
Figura 12. Comparação estatística da densidade vascular entre os grupos.....	37
Figura 13. Evolução do pós-operatório do animal quatro do grupo simulado. (a) POI; (b) 2º PO com sinais de isquemia da região distal do retalho; (c) 7º PO com a necrose estabelecida na região distal do retalho, caracterizada pelo aspecto escurecido, rígido e sem pelos.....	38

Figura 14. Fotomicrografias do GC (a), GS (b) nas quais se identifica menor quantidade de vasos sanguíneos e do G16Hz (c) e G100Hz (d), nas quais se identifica maior quantidade de vasos sanguíneos, apontados pelas setas (Hematoxilina-Eosina, 400x).....39

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

AV1	Avaliador 1.
AV2	Avaliador 2.
<i>BNR</i>	<i>Beam Non-uniformity Ratio.</i>
<i>CGRP</i>	<i>Calcitonin Gene-Relacionated Peptide.</i>
DesvPad	Desvio Padrão.
<i>ERA</i>	<i>Effective Radiation Area.</i>
<i>et al.</i>	<i>Et alii.</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast Growth Factor.</i>
FRP	Frequência de Repetição de Pulso.
GC	Grupo Controle.
GS	Grupo Simulado.
G16Hz	Grupo 16 Hz.
G100Hz	Grupo 100 Hz.
IL	Interleucina.
N	Número.
<i>NO</i>	<i>Nitric Oxide.</i>
<i>NOS</i>	<i>Nitric Oxide Synthase.</i>
<i>PDGF</i>	<i>Platelet-Derived Growth Factor.</i>
PO	Pós-operatório.
POI	Pós-operatório Imediato.
PPG	Poli(óxido de Propileno/etileno) Glicol.
<i>SATA</i>	<i>Spatial Average Temporal Average.</i>
<i>SATP</i>	<i>Spatial Average Temporal Peak.</i>
TEA	Trietilamina.

<i>TENS</i>	<i>Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation .</i>
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	<i>Transforming Growth Factor.</i>
<i>TRAM</i>	<i>Transverse Rectus Abdominis Myocutaneous.</i>
<i>US</i>	<i>Ultra-som.</i>
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor.</i>

## RESUMO

**Introdução:** Os retalhos cutâneos têm fundamental importância na Cirurgia Plástica e uma das complicações de difícil solução é a necrose, levando ao crescimento de pesquisas com agentes farmacológicos e físicos na tentativa de melhorar as respostas vasculares desses retalhos. **Objetivo:** Avaliar o ultra-som com frequências de repetição de pulso de 16 e 100 Hz na viabilidade e na angiogênese do retalho cutâneo randômico, em ratos. **Métodos:** Em 60 ratos *Wistar* EPM-1 foi elevado retalho cutâneo dorsal de base cranial (10 x 4 cm) e foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, a saber: Controle – apenas retalho cutâneo, Simulado – simulação da aplicação ultrasônica com o equipamento desligado, Grupo 16 Hz – ultra-som 3 MHz, pulsado a 20%, 0,2 W/cm<sup>2</sup> (SATA) e Frequência de Repetição de Pulso (FRP) de 16 Hz, e Grupo 100 Hz – ultra-som com os mesmos parâmetros e FRP de 100 Hz, tratados por 3 dias consecutivos. A porcentagem de necrose foi avaliada no 7º dia e quatro amostras de pele foram coletadas de cada retalho para determinar a densidade vascular. **Resultados:** A porcentagem de necrose foi de 42,18±13,5% GC, 18,58±13,1% GS, 13,47±10,6% G16Hz e 15,42±7,6% G100Hz com diferença significativa entre o controle e os demais grupos (p < 0,001). A densidade vascular foi de 5,56±5,81% Controle, 6,72±5,9% Simulado, 22,11±10,96% G16Hz e 25,18±13,32% G100Hz com diferença significativa entre os grupos tratados em relação ao controle e simulado (p<0,001). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos tratados. **Conclusão:** Ambas as frequências de repetição de pulso (16 e 100 Hz) do ultra-som aumentaram a angiogênese e, tanto o ultra-som como a sua simulação, aumentaram a viabilidade do retalho cutâneo randômico, em ratos *Wistar*.



## **INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

No campo da Cirurgia Plástica, a aplicabilidade dos retalhos é fato inconcusso frente à sua fundamental importância na maioria dos procedimentos reparadores (FERREIRA *et al.*, 1986; FERREIRA, ANDREWS, LAREDO FILHO, 1987; FERREIRA *et al.*, 1988; IM, LEE, HOOPEES, 1990; FERREIRA, ANDREWS, LAREDO FILHO, 1995; GOMES *et al.*, 2004). Esses retalhos se apresentam como recurso primordial em perdas cutâneas advindas de alterações congênitas, traumas, queimaduras e ressecções tumorais (IM, LEE, HOOPEES, 1990; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; DAVIS *et al.*, 1999; GHERARDINI *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2005).

Entretanto, podem apresentar complicações no pós-operatório, levando ao insucesso do tratamento e ao requerimento de nova intervenção cirúrgica, aumentando o tempo de internação e de retorno do paciente às suas atividades diárias (DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; DAVIS *et al.*, 1999; CYMROT, PERCÁRIO, FERREIRA, 2004).

Os eventos que diminuem a viabilidade dos retalhos cutâneos podem ser atribuídos à insuficiência arterial que ocorre ao longo do retalho, por secção de vasos sanguíneos cutâneos e vias nervosas simpáticas (KERRIGAN, 1983; FERREIRA, ANDREWS, LAREDO FILHO, 1995; SALMI, HONG, FUTRELL, 1999; ESTEVES JÚNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004) e à estase venosa que leva à trombose venosa e edema, diminuindo o suprimento arterial, e, conseqüentemente, à necrose (HJORTDAL *et al.*, 1994).

A fim de minimizar as condições isquêmicas dos retalhos cutâneos, diversas pesquisas vêm sendo efetuadas utilizando-se diferentes agentes farmacológicos, como substâncias vasodilatadoras (DAVIS *et al.*, 1999; SARIFAKIOGLU *et al.*, 2004; ESTEVES JÚNIOR *et al.*, 2005; ULUSOY *et al.*, 2005; TUFAN, 2007; TSAI *et al.*, 2008; ARNOLD *et al.*, 2009; PAZOKI-TOROUDI *et al.*, 2009), antioxidantes (DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; GOMES *et al.*, 1998; FREIRE *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2004; ABLA *et al.*, 2005; AYDOGAN *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2007), anticoagulantes (SHALOM, FRIEDMAN, WESTREICH, 2008; BEZUHLY *et al.*, 2009; LIVAOGLU *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009), hormônios (TOUTAIN *et al.*, 2009), fatores de crescimento (FUJIHARA *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2009) e, também, agentes físicos. Dentre esses, têm-se destacado acupuntura (JANSEN *et al.*, 1989), eletroacupuntura (NIINA *et al.*, 1997), correntes elétricas polarizadas (IM, LEE, HOOPES, 1990), energia eletromagnética pulsada (KRAG *et al.*, 1979), estimulação elétrica nervosa transcutânea (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation – TENS*) (KJARTANSSON *et al.*, 1988a; 1988b; LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; ATALAY *et al.*, 2003; LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2003; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008; ATALAY & YILMAZ, 2009), *laser* de baixa potência (KAMI *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1992; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2006; PRADO *et al.*, 2006; BOSSINI *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009), iontoforese (ESTEVES JÚNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004; ESTEVES JÚNIOR *et al.*, 2005; 2009), ondas de choque (KUO *et al.*, 2007) e, também o ultra-som (EMSEN, 2007).

O equipamento de ultra-som (US) pode ser caracterizado como um

gerador de corrente elétrica de alta frequência, ligado a uma cerâmica piezoelétrica sintética que se deforma na presença de um campo elétrico e gera a onda mecânica longitudinal com frequência acima de 20 kHz (não audível) (VALENTINI, MACIEL, PARIZOTTO, 2006; O'BRIEN JUNIOR, 2007). A transmissão dessas ondas pelos tecidos causa vibrações moleculares que, por sua vez, levam a diferentes efeitos biológicos, de acordo com os parâmetros ajustados (O'BRIEN JUNIOR, 2007).

O US terapêutico é amplamente utilizado em programas de reabilitação (WEBSTER *et al.*, 1980; VAN DER WINDTA *et al.*, 1999; EBENBICHER, 2009) e em procedimentos estéticos pré-operatórios em Cirurgia Plástica (FERRARO *et al.*, 2008; ROUSTAEI *et al.*, 2009), por ser equipamento acessível, de fácil manuseio, de baixo custo (DOAN *et al.*, 1999) e por seus efeitos na reparação tecidual (WEBSTER *et al.*, 1980; DYSON, 1987).

O US promove aumento do fluxo sanguíneo (DYSON & POND, 1973) e da permeabilidade da membrana (DINNO *et al.*, 1989), facilitando o influxo de cálcio intracelular que age como segundo mensageiro em uma série de reações metabólicas (MORTIMER & DYSON, 1988). O US também favorece a liberação de fatores de crescimento e mediadores químicos pelos mastócitos, macrófagos e plaquetas, acelerando a resolução da fase inflamatória (DYSON, 1987; DINNO *et al.*, 1989; YOUNG, DYSON, 1990a,b). Dessa forma, aumenta a atividade de fibroblastos e de células endoteliais, estimulando a formação do tecido de granulação (YOUNG & DYSON, 1990a) e a angiogênese (YOUNG & DYSON, 1990c), durante a fase proliferativa da cicatrização (WEBSTER *et al.*, 1980; DYSON, 1987; DOAN *et al.*, 1999).

Estudos mostram que o US provoca estresse de cisalhamento no endotélio vascular, aumentando o influxo de cálcio intracelular, o qual

favorece a angiogênese, por estimular a produção do fator de crescimento do endotélio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor VEGF*) (DOAN *et al.*, 1999) e devido ao fato de a enzima óxido nítrico sintetase gerar mais óxido nítrico (SUCHKOVA *et al.*, 2002; BERTUGLIA, 2007; SUGITA *et al.*, 2008; HIGHTOWER & INTAGLIETTA, 2009). Pode, destarte, representar potente agente físico na prevenção e no tratamento de tecidos isquêmicos (SUGITA *et al.*, 2008).

Até o momento, apenas um trabalho demonstrou a melhora da viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos, tratados com US de 0,75 MHz ou 3 MHz, pulsado 20% (EMSEN, 2007). Entretanto, a influência das diferentes frequências de repetição de pulso na viabilidade e na angiogênese de retalhos não foi pesquisada e, em muitos equipamentos de US, essas podem ser moduladas de 16 a 100 Hz.

Além disso, ainda não há consenso quanto à indicação específica de cada frequência. No entanto, alguns autores (LOW & REED, 2000) sugerem que a frequência de repetição de pulso (FRP) de 16 Hz seria a mais efetiva para a reparação tecidual, pois possui o mesmo valor da frequência fundamental do sistema de cálcio intracelular. Os íons cálcio podem agir como mensageiros intracelulares, mudando sua distribuição em resposta às modificações da membrana plasmática causadas pelas ondas ultrassônicas, atuando como um sinal intracelular que regula a expressão gênica e o metabolismo celular (DOAN *et al.*, 1999; MORTIMER & DYSON, 1988).

Dessa forma, a PRF poderia ser considerado um parâmetro de extrema importância nos equipamentos de US quando utilizado com objetivo de aceleração e modulação do reparo tecidual, norteando adequadas condutas terapêuticas.

**OBJETIVO**

## **2. Objetivo**

Avaliar o ultra-som com frequências de repetição de pulso de 16 e 100 Hz na viabilidade e na angiogênese do retalho cutâneo randômico, em ratos *Wistar*.

**LITERATURA**



### 3. Literatura

McFARLANE, DeYOUNG, HENRY (1965) desenvolveram um modelo experimental para estudo e prevenção da necrose no retalho cutâneo randômico, no rato. O retalho tinha como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica, medindo 10 centímetros (cm) de comprimento por 4 cm de largura, obtendo, assim, proporção entre comprimento e largura de 2,5:1.

O delineamento do retalho era realizado por meio de molde plástico, recortado nas medidas padrão. O retalho era elevado a partir da fáscia profunda dos músculos, incluindo fáscia superficial, panículo carnoso e pele. Em seguida, o retalho era recolocado no seu leito e suturado. Os animais eram observados por vários dias, para determinação da extensão da necrose do retalho. Em 94,3% dos animais, houve necrose do retalho na região distal, variando de 25 a 50%.

UGLAND (1966) apresentou modelo de retalho cutâneo de sete cm de comprimento por dois cm de largura, de base cranial, para avaliar a ação de um agente anticoagulante (*Dicoumarol*), para diminuir a formação de trombos venosos e melhorar a viabilidade desse procedimento operatório. Uma barreira plástica foi interposta entre o leito e o retalho, pois, de outra forma, este poderia ser revascularizado a partir do leito, prevenindo a necrose na sua extremidade caudal e dificultando o modelo de estudo.

KERRIGAN (1983) investigou o mecanismo fisiopatológico da necrose em retalhos cutâneos no porco, por meio de microesferas

radioativas. Pontuou que a perda do retalho poderia ocorrer por fatores extrínsecos sistêmicos e locais, mas o único fator intrínseco descrito foi a insuficiência arterial do retalho. Esta seria explicada pela secção de vasos cutâneos e de vias nervosas simpáticas durante o procedimento operatório, com diminuição nas taxas de fluxo sanguíneo em sentido distal, ao longo do retalho. Diante disso, sugeriu que as modalidades de tratamento que aumentassem o influxo arterial para o retalho, ou que estabilizassem a membrana celular em tecidos isquêmicos, deveriam ser escolhidas.

YOUNG & DYSON (1990a), pesquisaram a ação do US na cicatrização de lesões de pele de espessura total em ratos. Os 36 animais foram distribuídos em dois grupos: G1 (tratados por cinco dias) e G2 (tratados por sete dias). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos: simulado, US 0,75 MHz e US 3 MHz. Usaram densidade de potência de 0,1 W/cm<sup>2</sup> (SATA) e modo pulsado a 20%, por cinco minutos. No 5º dia, observaram diminuição significativa no número de células inflamatórias, aumento na quantidade de fibroblastos e maior formação de tecido de granulação (com ambas as frequências). Com 3 MHz, houve aumento significativo de células endoteliais. No 7º dia, não observaram diferenças significantes no número de células, sugerindo que o US acelera a resolução das fases inflamatória e proliferativa do reparo tecidual.

YOUNG & DYSON (1990c) investigaram o efeito do US na angiogênese em 36 ratas submetidas à ferida excisional de um cm<sup>2</sup>. Os animais foram distribuídos em dois grupos, um examinado cinco dias após a lesão (G1 – tratados por cinco dias), no final da fase inflamatória do reparo; e o outro, sete dias após a lesão (G2 – tratados por sete dias),

durante a fase proliferativa. Cada grupo foi subdividido em três subgrupos: A – controle (não tratado); B – US de 0,75 MHz, pulsado a 20%, frequência de repetição de pulso não informada, densidade de potência de 0,1 W/cm<sup>2</sup> SATA; C – US de 3 MHz com os mesmos parâmetros. O tempo de aplicação foi de cinco minutos. Cinco dias após o ato operatório, em todos os grupos havia vasos invadindo todos os espaços da ferida. Entretanto, nos grupos tratados com US, a quantidade de vasos foi maior, sendo 30% a mais para 0,75 MHz e 20% para 3 MHz. No 7º pós-operatório (PO), o crescimento dos vasos estava direcionalmente mais organizado, porém sem diferenças entre os grupos.

LEITE *et al.* (2003) evidenciaram a influência das frequências de repetição de pulso de 16 e 100 Hz do US de 1 MHz, no processo de reparo da tíbia após osteotomia experimental. Quarenta ratos foram distribuídos em quatro grupos: controle; simulado; 16 Hz e 100 Hz. O tratamento teve início 24 horas após o ato operatório, com US de 1 MHz, pulsado a 20%, 0,5 W/cm<sup>2</sup> (SATA), durante seis dias, por três minutos, e as análises sanguíneas, histológicas e radiográficas foram efetuadas no 7º PO. O diâmetro da lesão na tíbia diminuiu significativamente em todos os grupos tratados em comparação ao controle, bem como o nível sérico de fosfatase alcalina. Os autores concluíram que a frequência de repetição de pulso de 100 Hz foi a mais efetiva em acelerar a reparação após osteotomia da tíbia.

AMÂNCIO *et al.* (2006) identificaram maior proliferação de células germinativas e novos vasos sanguíneos em enxertos cutâneos de espessura total, após estimulação ultrassônica. Vinte coelhas foram submetidas ao procedimento operatório e um dos lados recebeu US 3 MHz, 0,5 W/cm<sup>2</sup>,

por cinco minutos, a partir do 3º PO, durante sete dias consecutivos. O lado contralateral recebeu tratamento simulado. Os autores sugeriram que o US levou ao aumento na proliferação da camada germinativa, na formação de novos vasos e na união mais rápida dos enxertos.

MENDONÇA *et al.* (2006) pontuaram o papel do US de 1,5 MHz, pulsado, frequência de repetição de pulso de 1 kHz, com densidade de potência de 30 mW/cm<sup>2</sup> (SATA), durante 10 minutos (min), na cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais, em 60 ratos. Mostraram que o US estimulou o processo de cicatrização, acelerando a resolução da fase inflamatória (menor quantidade de células inflamatórias no grupo tratado) e aumentando a quantidade de vasos sanguíneos na fase proliferativa.

BERTUGLIA (2007) revisou a ação do US de baixa intensidade no aumento dos níveis de óxido nítrico (*Nitric Oxide – NO*) em diferentes modelos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Forneceu uma visão geral da isquemia-reperfusão, caracterizando-a por lesão das células endoteliais, principalmente como resultado do estresse de cisalhamento associado à vasoconstrição, à perfusão capilar reduzida e ao excessivo estresse oxidativo. Mostrou que as oscilações mecânicas do US, decorrentes da diferença de impedância acústica entre as células endoteliais e seu conteúdo, levam a maior estresse de cisalhamento pelo fluxo sanguíneo na parede do vaso, elevando os níveis de *NO* com ação vasodilatadora e aumentando o calibre dos vasos e a perfusão.

EMSEN (2007) elucidou o uso do US na viabilidade de retalhos cutâneos, em ratos. O retalho utilizado, com 10 cm de comprimento por 3

cm de largura, foi elevado em 30 ratos, distribuídos em 3 grupos. O controle recebeu simulação da terapia ultrassônica com o equipamento desligado; um grupo (G1) recebeu a terapia com 0,1 W/cm<sup>2</sup> (SATA) e o outro grupo (G2), com 0,18 W/cm<sup>2</sup>. Nos dois grupos tratados, o US teve frequência variável de 0,75 e 3 MHz, modo pulsado a 20%, frequência de repetição de pulso não informada. A aplicação foi realizada na base cranial do retalho, por 5 min, iniciando no pós-operatório imediato (POI) e sendo repetida até o 15° PO. A área de necrose foi avaliada no 15° PO, com planímetro, mostrando 65% de necrose no grupo controle, 36,7% no G1 e 16,5% no G2, sendo que essas diferenças foram significantes.

GONÇALVES *et al.* (2007) salientaram a possibilidade do US na integração de enxertos cutâneos de espessura total em 20 coelhas. O enxerto do lado direito (G1) foi tratado com US de 3 MHz, pulsado a 50%, frequência de repetição de pulso não informada, com densidade de potência de 0,5 W/cm<sup>2</sup> (SATA), por 5 min diários, por 20 sessões a partir do 3° PO. O enxerto esquerdo foi o controle (G2). Observaram aumento significativo no número de células em proliferação (G1 = 12,18% e G2 = 7,34%) e novos vasos por campo (G1 = 6,27% e G2 = 3,07%).

TACANI *et al.* (2008) quantificaram a angiogênese no retalho *TRAM* em ratos tratados com US pulsado. Doze animais foram submetidos ao procedimento operatório de retalho *TRAM* e, em seguida, distribuídos em quatro grupos: controle (GC), no qual os ratos não receberam tratamento; US 0,5 W/cm<sup>2</sup> (GUS 0,5); US 1 W/cm<sup>2</sup> (GUS 1) e US 1,5 W/cm<sup>2</sup> (GUS 1,5 – SATP). Os animais foram tratados com US 3 MHz, pulsado a 20%, com frequência de repetição de pulso de 100 Hz, por 8 min, na zona 1 do retalho

*TRAM*, imediatamente após o procedimento operatório e nos 2 dias subsequentes. Observaram diferença significativa entre GUS 1 e GC, bem como na comparação entre GUS 1 e GUS 0,5, tanto para a área de necrose, como para a contagem de vasos. A aplicação de US com densidade de potência de 1 W/cm<sup>2</sup>, na zona 1 do retalho *TRAM*, reduziu significativamente a área de necrose e aumentou a densidade vascular.

## **MÉTODOS**

## 4. Métodos

### 4.1 DESENHO DE PESQUISA

O presente estudo, do tipo primário, intervencional, experimental, analítico, controlado, aleatorizado e uni-cego, foi realizado em centro único e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob número 1131/07 (Anexo 1).

### 4.2 AMOSTRA

A amostra foi composta por 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), *Wistar* EPM-1, machos, adultos, pesando de 280 a 300 gramas, oriundos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) e transferidos para o Biotério da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP.

Os animais permaneceram durante 15 dias aclimatando-se ao ambiente, antes do início do experimento. Estavam em gaiolas individuais, com ração comercial e água *ad libitum*, durante todo o experimento, em ciclos de claro-escuro de 12 horas cada, com temperatura constante de 22°C, umidade do ar de 55% ( $\pm 10$ ) e controle de ruídos, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Lei 6.638 - de 8 de maio de 1979). Os procedimentos operatórios foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP.



### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento operatório e após, foram distribuídos aleatoriamente pelo programa *Bioestat*<sup>®</sup> 5.0 em 4 grupos de 15 ratos, como segue:

**Grupo Controle (GC)** – Não receberam aplicação de US;

**Grupo Simulado (GS)** – Simulação da aplicação do US (desligado);

**Grupo Ultra-som 16 Hz (G16Hz)** – Aplicação do US de 3 MHz, pulsado com ciclo de trabalho de 20% (12,5 ms *on*; 50 ms *off*) e FRP de 16 Hz;

**Grupo Ultra-som 100 Hz (G100Hz)** – US de 3 MHz, pulsado com ciclo de trabalho de 20% (2 ms *on*; 8 ms *off*) e FRP de 100 Hz.

A simulação e os tratamentos do US foram realizados do POI (60 segundos após o procedimento operatório), repetindo-se, diariamente, até o 2° PO, totalizando 3 aplicações de 24 min (12 min no lado direito e 12 min no esquerdo, na base cranial do retalho).

Para os grupos tratados, a densidade de potência de 1 W/cm<sup>2</sup> que corresponde à intensidade de pico (*Spatial Average Temporal Peak – SATP*) foi determinada após estudo piloto (Apêndice 1). Pode-se calcular a intensidade média de acordo com o ciclo de trabalho utilizado, que corresponde a 0,2 W/cm<sup>2</sup> (*Spatial Average Temporal Average - SATA*).

O fluxograma a seguir mostra a relação grupos/procedimentos:

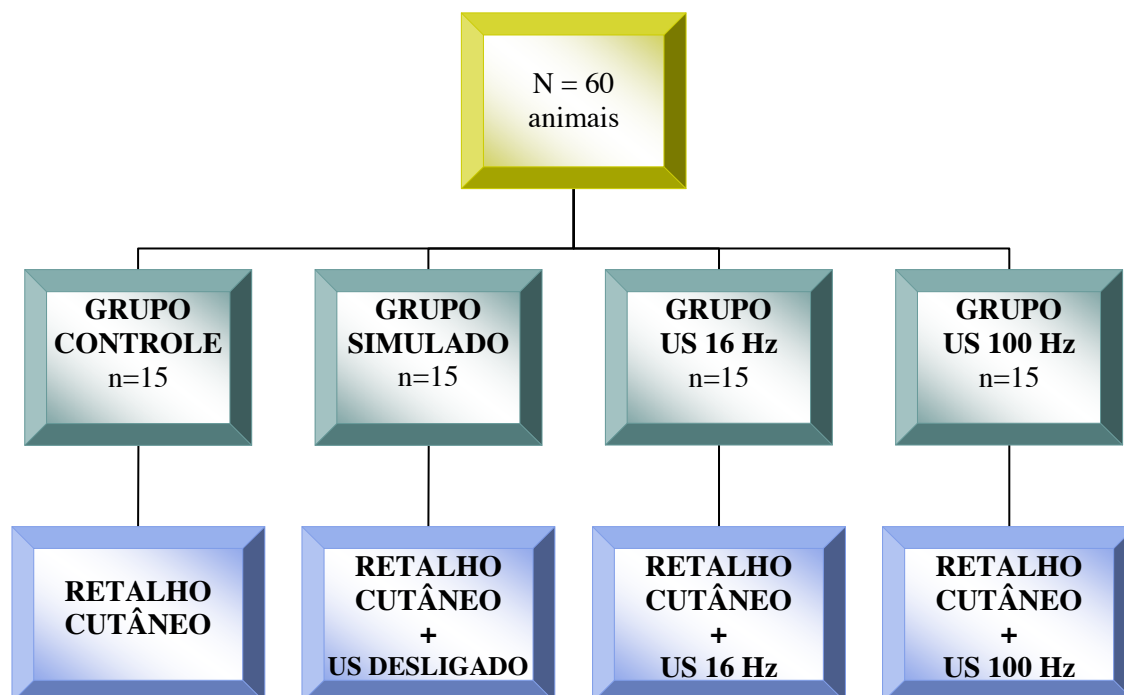


Figura 1. Distribuição dos grupos e respectivos procedimentos.

#### 4.4 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO

O modelo de retalho cutâneo dorsal utilizado para todos os grupos deste experimento foi o de base cranial proposto por McFARLANE, DeYOUNG, HENRY (1965).

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (100 mg/kg) associado a cloridrato de xilazina (50 mg/kg). Os animais foram retirados das gaiolas e contidos pela região dorsal, para aplicação intramuscular dos anestésicos (no músculo gastrocnêmio direito). Para aplicação dos anestésicos foi utilizada seringa de 1 ml e agulha hipodérmica de 45 x 13 mm.

Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral, sobre mesa operatória, para realização da epilação digital por tração da região dorsal, em área de 6 cm (lâtero-lateral) por 12 cm (crânio-caudal), adotando como limite cranial a margem cranial das escápulas e como limite caudal, 1 cm caudalmente às cristas ilíacas do rato.

Após a epilação digital, foram demarcados os limites do retalho, por meio de molde padronizado de cartolina, com 10 cm de comprimento por 4 cm de largura, com marcador *Pilot*<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil (Figura 2).

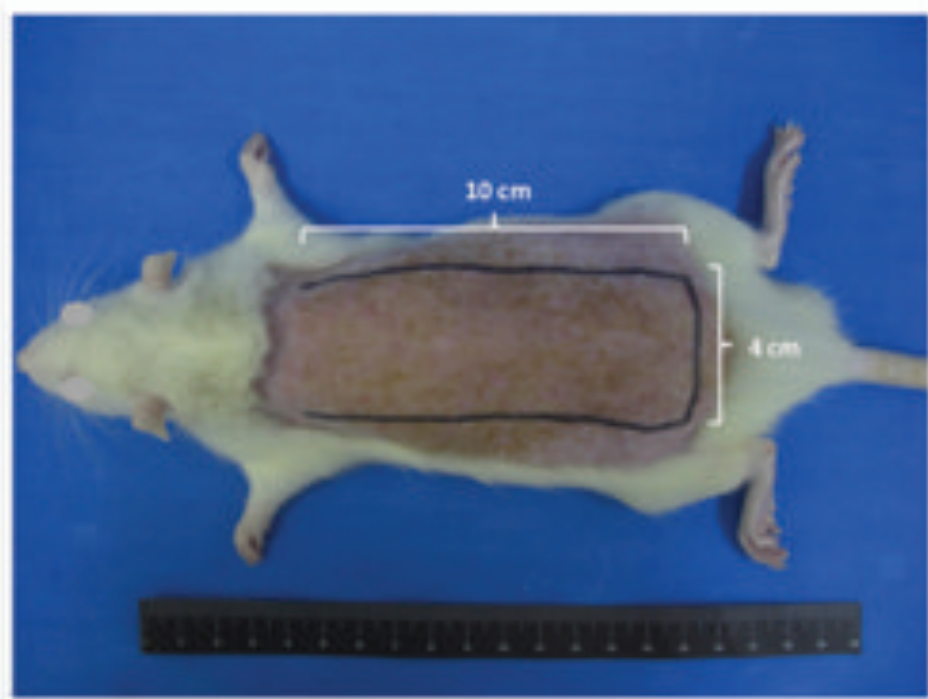


Figura 2. Animal epilado, com as demarcações do retalho cutâneo randômico de 10 x 4 cm.

Em seguida, a pele foi incisada em todo o perímetro do retalho, com auxílio de lâmina de bisturi número 15. O retalho foi elevado a partir da fáscia profunda dos músculos, contendo a fáscia superficial, o pânículo

carnoso, o tecido areolar e a pele, e teve como limites os ângulos caudais das escápulas e os ossos craniais da cintura pélvica (Figura 3).

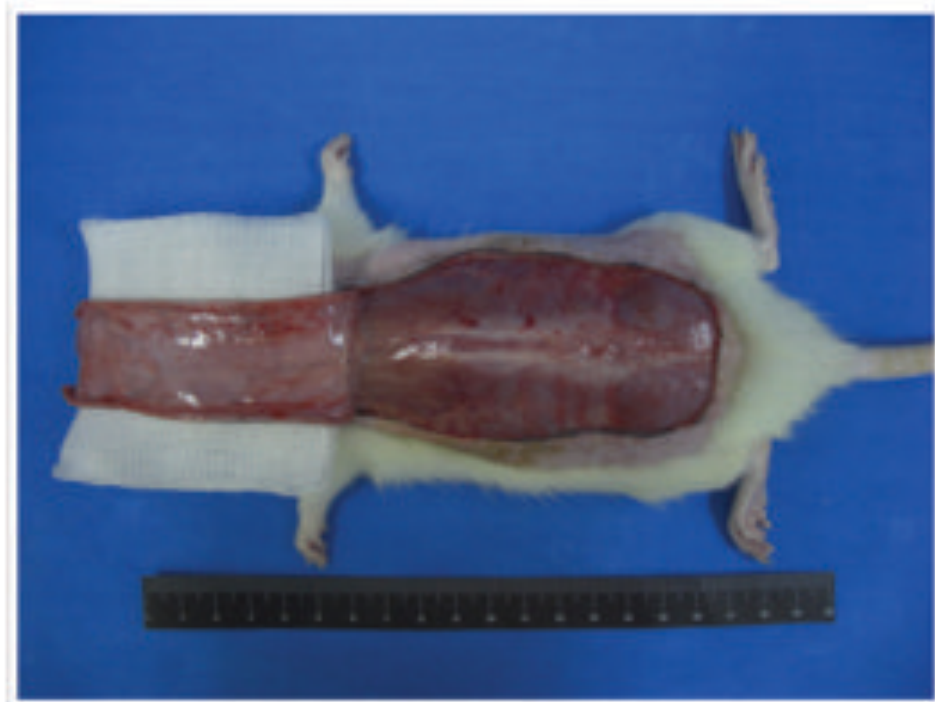


Figura 3. Elevação do retalho cutâneo dorsal de base cranial.

Uma barreira plástica impermeável (filme F1 – poliéster e polietileno), recortada nas medidas padrão (10 x 4 cm) foi interposta entre o retalho e o seu leito doador (UGLAND, 1966). A sutura do retalho foi realizada com pontos simples de náilon monofilamentar 4-0, com intervalos de 1 cm (Figuras 4 e 5, respectivamente).

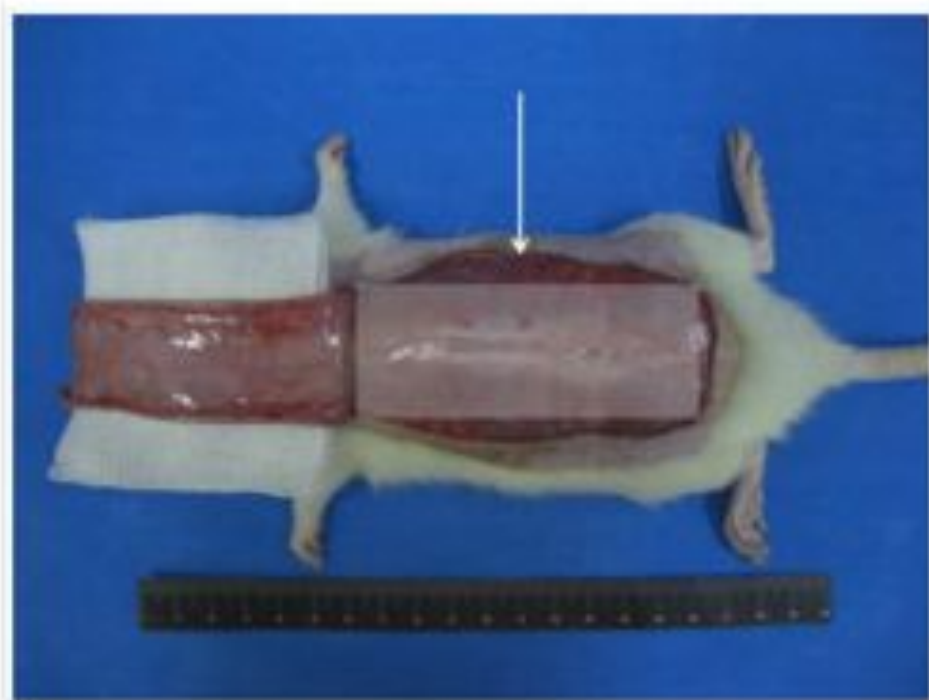


Figura 4. Barreira plástica interposta entre o retalho e o leito doador.

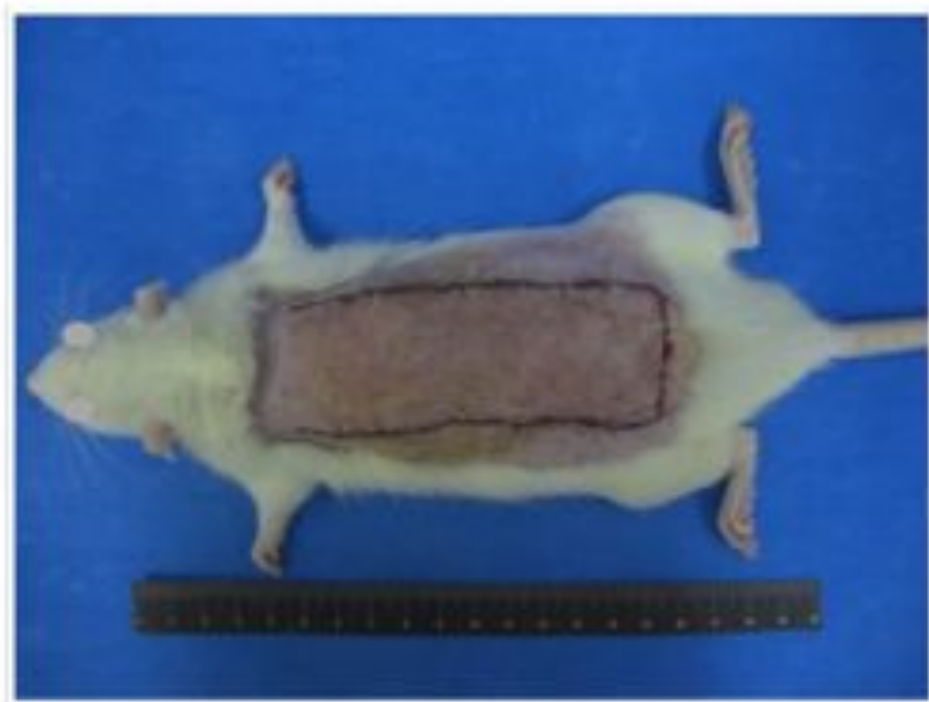


Figura 5. Retalho suturado com pontos simples.

Os animais receberam colar cervical de plástico, para evitar a autofagia, confeccionado a partir de garrafa de água de 500 ml da marca Crystal<sup>®</sup>, medindo seis cm o diâmetro distal, três cm o proximal e três cm a altura. Foi fixado por meio de cinco pontos, dois na região cervical dorsal e três na região ventral, com pontos simples efetuados com náilon monofilamentar 0-0 (Apêndice 2).

Após o procedimento operatório, os ratos permaneceram mais 30 minutos anestesiados, para aplicação do US e, diariamente, até o dia da eutanásia, foi realizada analgesia com 5 mg/kg de cloridrato de tramadol, por gavagem.

Todos os animais foram operados pelo mesmo pesquisador, que não teve conhecimento dos grupos aos quais pertenciam os animais.

A documentação fotográfica dos ratos foi realizada com etiqueta padronizada com o número do animal, com a utilização da câmera digital Sony<sup>®</sup> Cyber-Shot (modelo DSC-s730).

Os animais foram recolocados em gaiolas individuais com ração e com água *ad libitum*.

## **4.5 EQUIPAMENTO**

O equipamento utilizado para este experimento foi o US SONACEL Expert<sup>®</sup> S. 1070, de 3 MHz, número de série 0403001, da Bioset Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda. (Av. 55, nº 1.212, Jardim Kennedy, Rio Claro, SP) (Apêndice 3).

Antes do início da pesquisa, o aparelho foi calibrado com dosímetro de precisão (*Ultrasonic Power Meter*, modelo UPM-DT10) e recalibrado

quatro semanas depois, no final do experimento, segundo especificações técnicas propostas pela Comissão Internacional Eletrônica (IEC 601-2-5) (1984) e Normas Vigentes no Brasil (NBR – IEC 60601 – 1) de 1989, para garantir acurácia e reprodutibilidade dos parâmetros (GUIRRO *et al.*, 1997; VALENTINI, MACIEL, PARIZOTTO, 2006) (Anexo 2).

O transdutor do equipamento de US foi elaborado para essa pesquisa, possuindo área de radiação efetiva (*Effective Radiation Area*, E.R.A) de 0,5 cm<sup>2</sup> (Anexo 3) e taxa de não-uniformidade do feixe (*Beam Non-uniformity Ratio*, B.N.R) de 6:1.

#### 4.6 APLICAÇÃO DO ULTRA-SOM

A aplicação do US iniciou-se 60 segundos após o procedimento operatório, na base cranial do retalho, em uma área de 3 cm de comprimento por 4 cm de largura, equivalente a 12 cm<sup>2</sup>. Foi subdividida em duas áreas de 6 cm<sup>2</sup>, e o tempo foi calculado conforme a fórmula abaixo (HOOGLAND, 1986): Tempo (T) = Área (6 cm<sup>2</sup>) / E.R.A (0,5 cm<sup>2</sup>) = 12 min.

Com os animais anestesiados, a área a ser tratada foi higienizada com salina a 0,9% e demarcada com caneta (marcador *Pilot*<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) sendo colocado um ml de gel acoplante (*Carbogel*<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) no lado direito e mais um ml no lado esquerdo, com auxílio de seringa de 20 ml, para controle dessa quantidade. O meio acoplante utilizado foi o gel de uso corrente em humanos, hidrossolúvel, não gorduroso, não irritante, não abrasivo, hipoalergênico, inodoro, incolor e viscoso, composto de polímero

carboxivinílico polipropileno glicol (PPG), trietilamina (TEA), conservante, água purificada e pH neutro.

O US foi aplicado durante 12 minutos, no lado direito e, então, o equipamento interrompia a emissão de energia automaticamente e avisava com um sinal sonoro, sendo acionada a tecla *stop* seguida pela *start*, para mais 12 minutos de aplicação no lado esquerdo.

Tanto a simulação como a aplicação da terapia ultrassônica em si foram executadas por meio do transdutor do US de forma direta, uniforme, ininterrupta e lenta, aproximadamente 15 movimentos por minuto (cronometrados por meio do relógio modelo HRM200, da marca *Challenge*<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) equivalentes a 2 cm/s. Os movimentos executados foram circulares, no sentido anti-horário, deslizando suavemente sem pressionar, apenas para manter perfeito acoplamento entre o transdutor, o gel e a pele do animal (Figura 6).



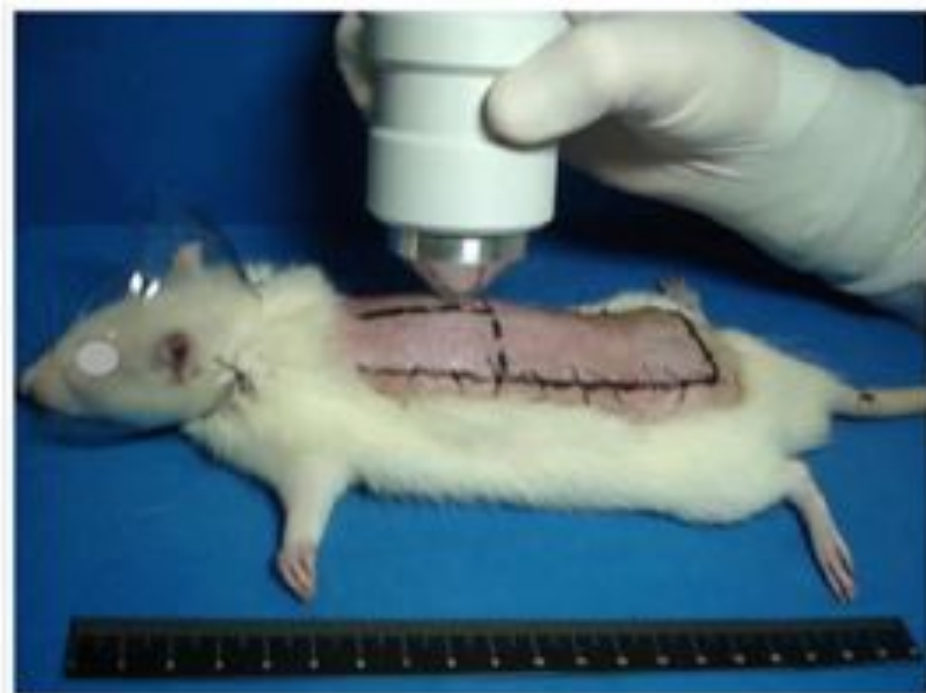


Figura 6. Região de aplicação do US, na base cranial do retalho, dividida em duas áreas de  $6 \text{ cm}^2$ .

A Figura 7 ilustra o esquema dos movimentos do transdutor representados por três círculos com setas no sentido anti-horário. Iniciava-se a aplicação do US no círculo mais distal (mais distante da base cranial), girando o transdutor uma vez. A seguir, era feito outro giro, no segundo círculo (central) e mais um giro no último círculo (o mais próximo da base). Para voltar, iniciava-se pelo círculo da base cranial, pelo círculo central e pelo círculo mais distal, repetindo-se esses movimentos durante os 12 minutos de aplicação no lado direito, totalizando 180 movimentos. Da mesma forma, realizava-se no lado esquerdo.

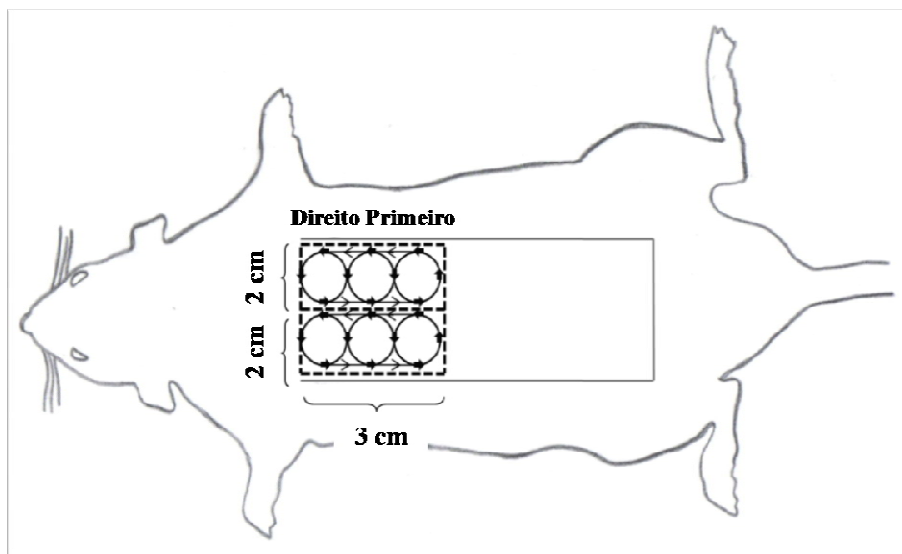


Figura 7. Esquema da forma de aplicação do US, iniciando-se pelo círculo distal, central e proximal, depois voltando na ordem inversa.

#### 4.7 ANÁLISE DA ÁREA DE NECROSE

A porcentagem de área de necrose do retalho foi determinada no 7º PO, pelo método do gabarito de papel (SASAKI & PANG, 1980).

Para essa mensuração, os animais foram anestesiados com a associação de 100 mg/Kg de cloridrato de ketamina, com 50 mg/Kg de cloridrato de xilazina, por via intramuscular. Ao atingirem plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito ventral, para sobreposição de corte de papel vegetal, com gramatura de 90 g/95 m<sup>2</sup>, medindo 6 cm de largura por 12 cm de comprimento. Com lápis grafite 2B, os pesquisadores desenhavam todo o comprimento do retalho e, em seguida, a região do retalho onde houvesse necrose, verificada pelo aspecto

escurecido, rígido e sem pelos (LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006) (Figura 8).

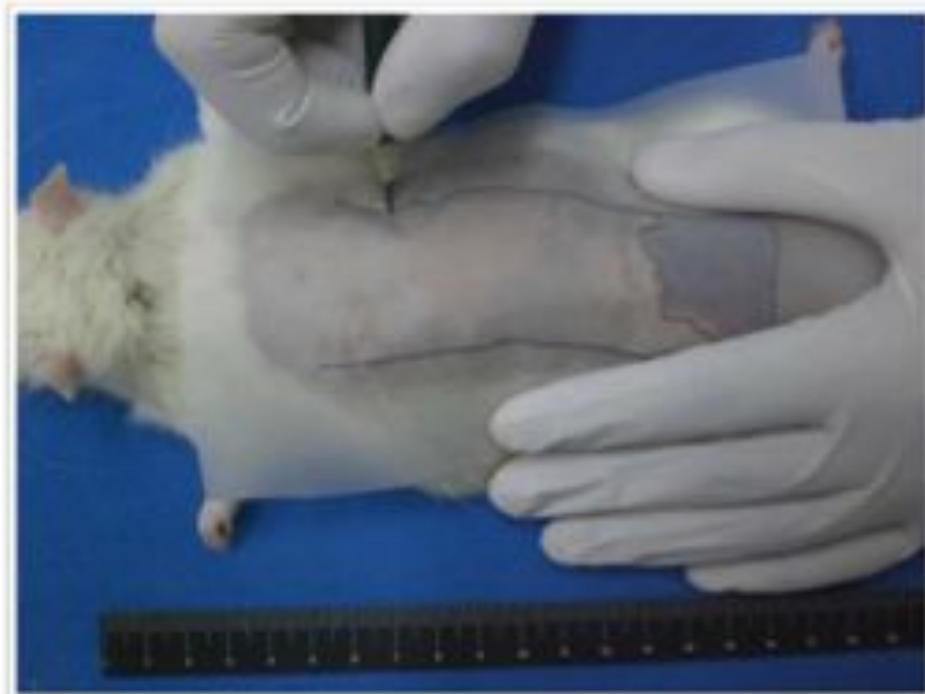


Figura 8. Análise da área de necrose pelo método do gabarito de papel.

Essa análise foi realizada por dois avaliadores que desconheciam a qual grupo pertencia os animais (avaliadores um e dois – AV1 e AV2).

O papel vegetal foi cortado nos limites do retalho desenhado para aferir, primeiramente, o peso total do retalho. Depois, a área de necrose foi recortada e aferida. Ambos foram pesados em balança de precisão ( $\pm 0,001g$  de erro), da marca Shimadzu do Brasil Comércio Ltda<sup>®</sup>, modelo AY220, número de série D452200834, ano 2005, classe I, portaria Inmetro 065/2003, do Laboratório de Bioquímica da UNIFESP.

Os valores foram aplicados à seguinte fórmula, para determinação da porcentagem da área de necrose:

$$\text{Porcentagem de necrose} = \frac{\text{peso do gabarito de papel da área de necrose do retalho}}{\text{peso do gabarito de papel da área total do retalho}} \times 100$$

Os valores da porcentagem de necrose foram inseridos no programa *Microsoft Office Excel 2007*<sup>®</sup>, para organização dos dados, formatação das tabelas e análise estatística.

#### **4.8 ANÁLISE DA DENSIDADE VASCULAR**

Com os animais anestesiados, foi retirado todo o fragmento de pele referente às dimensões do retalho e o material foi fixado em solução de formaldeído a 10%, por 24 horas. Para evitar a retração do fragmento de pele, este foi mantido em uma cortiça de seis cm de comprimento por cinco centímetros de largura em um recipiente de plástico. Em seguida, ainda no 7º dia, foi realizada a eutanásia animal por sobredose de anestésico (250 mg/kg de cloridrato de xilazina e 500 mg/Kg de cloridrato de ketamina), por via intraperitoneal.

Após a fixação por 24 horas, o fragmento foi clivado com lâmina de micrótomo em cortes transversais, divididos em amostras de pele de aproximadamente cinco milímetros, por toda a extensão do retalho. Foram selecionadas quatro amostras para análise histológica, sendo separado um fragmento a cada cinco cortes, começando a seleção pelo 1º fragmento (base cranial – 1ª amostra), depois o 5º fragmento (2ª amostra), 10º fragmento (3ª amostra) e 15º fragmento (4ª amostra) (Figura 9).

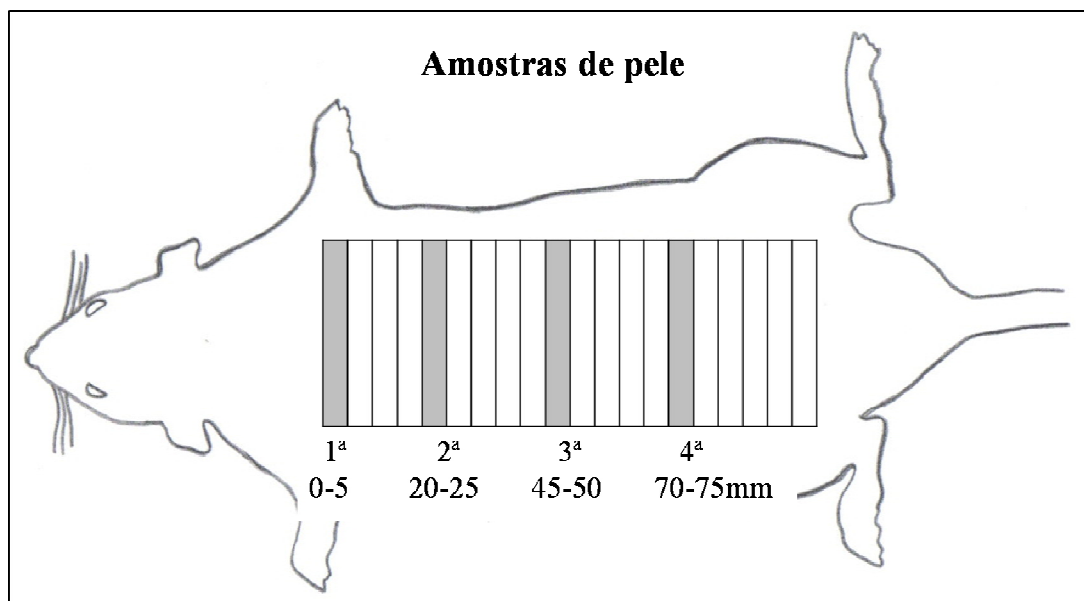


Figura 9. Fragmento de pele referente às dimensões do retalho, demarcado a cada 5 mm, para análise histológica.

Cada fragmento foi processado em banhos crescentes de álcool, seguidos pela clarificação em banhos de xilol e infiltrados em parafina a 60°C. Finalizado esse processamento, o material foi emblocado em parafina e cortado com micrótomo manual (5  $\mu\text{m}$ ), perpendicularmente ao eixo craniocaudal. As lâminas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em banhos decrescentes de álcool até a água deionizada, coradas em Hematoxilina de Mayer, seguidas da coloração de Eosina-Floxina.

A partir disso, as lâminas foram montadas e analisadas por avaliador experiente (patologista), que desconhecia a qual grupo pertencia as lâminas.

Para a mensuração da densidade vascular, foram realizadas quatro fotomicrografias das lâminas, de cada amostra selecionada, em microscópio óptico marca Zeiss® com câmera digital Sony® acoplada em

uma lente ocular de 10 x e objetiva de 40 x, totalizando um aumento de 400 x.

Para a leitura morfométrica bidimensional, foram observados 4 campos de cada fragmento selecionado, sendo 4 amostras de cada animal, totalizando 16 campos por animal. As imagens foram gravadas em *slides* individuais (uma imagem por *slide*) no programa *Microsoft Power Point*<sup>®</sup> *Windows XP*<sup>®</sup> e, no modo apresentação de slides, foi colocado gradeado com 100 pontos, para contagem de vasos sanguíneos que coincidiam com os pontos (Figura 10).

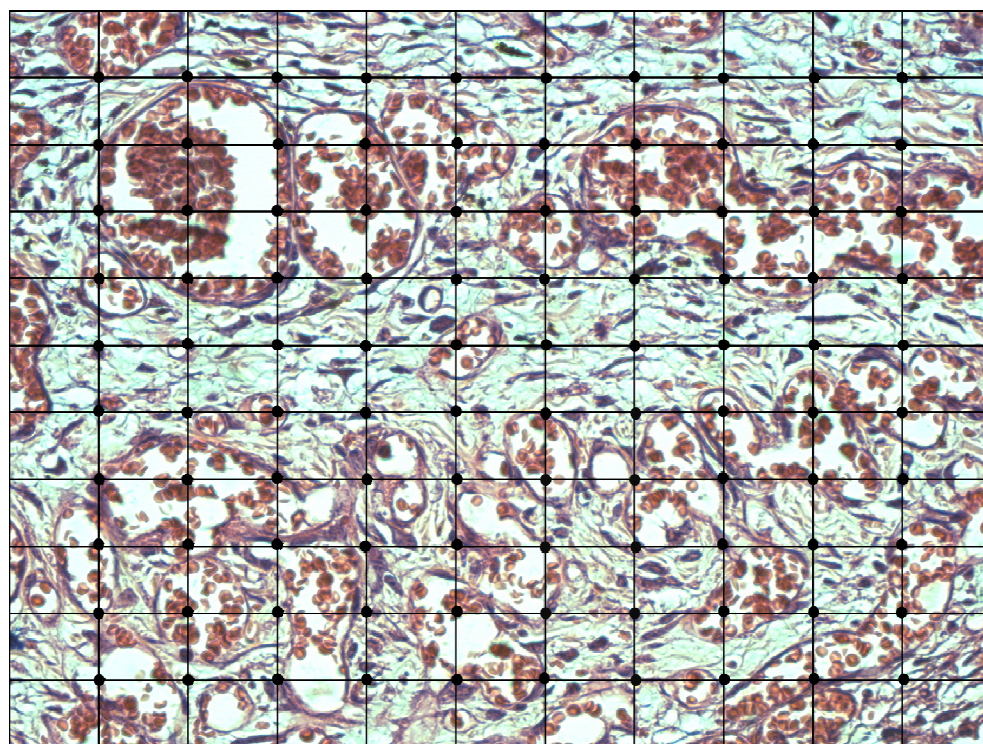


Figura 10. Gradeado com 100 pontos sobreposto às fotomicrografias, para contagem dos pontos que coincidem com os vasos sanguíneos (Hematoxilina-Eosina, 400x).

Ao final da contagem dos vasos, os valores da densidade vascular dos 16 campos foram inseridos no programa *Microsoft Office Excel 2007*<sup>®</sup> para organização dos dados, formatação das tabelas e análise estatística.

#### **4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados com *Software SPSS V11.5* (SPSS Inc., São Paulo, Brasil) e os testes preliminares para distribuição normal e cálculo da amostra foram realizados com *Software Minitab 14* (*Globaltech*, Minas Gerais, Brasil). Para a análise da concordância entre os avaliadores quanto à área de necrose, foi utilizado o *Wilcoxon Signed Ranks Test*. Para a avaliação das variáveis áreas de necrose e densidade vascular dos grupos, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* e *post hoc Dunn's*. O nível de significância foi estipulado em 5% ( $p \leq 0,05$ ) e os resultados apresentados com média, mediana e desvio padrão (SIEGEL & CASTELLAN, 1988).

## **RESULTADOS**



## 5. Resultados

A Tabela 1 mostra as porcentagens das áreas de necrose dos grupos determinadas pelos avaliadores 1 (AV1) e 2 (AV2) e pelo teste de *Wilcoxon* não foram observadas diferenças entre eles.

Tabela 1 – Porcentagens das áreas de necrose dos avaliadores 1 e 2

<i>COMPARAÇÃO INTERAVALIADORES – ÁREA DE NECROSE (%)</i>								
ANIMAL	GRUPO CONTROLE		GRUPO SIMULADO		GRUPO 16 Hz		GRUPO 100 Hz	
	AV 1	AV 2	AV 1	AV 2	AV 1	AV 2	AV 1	AV 2
1	61,42	64,01	5,50	6,14	17,60	17,30	14,45	15,52
2	50,66	51,48	6,29	7,45	2,18	1,97	3,15	4,52
3	55,01	53,80	9,35	8,48	7,17	6,45	25,57	26,95
4	58,92	57,73	35,31	35,14	18,80	15,53	0,00	0,00
5	40,36	36,13	38,16	39,90	14,87	12,88	20,33	20,04
6	41,21	41,22	0,00	0,00	14,38	14,75	14,39	15,53
7	25,44	32,60	22,80	19,97	13,12	14,52	21,94	24,25
8	32,88	32,08	17,20	19,78	0,00	0,00	17,53	16,43
9	56,12	55,03	18,44	18,58	17,32	18,16	23,13	19,39
10	29,45	30,15	22,20	21,79	26,12	27,93	21,66	20,42
11	48,82	52,88	0,00	0,00	10,36	10,18	7,00	6,30
12	41,81	42,19	23,05	22,43	0,00	0,00	21,79	24,00
13	40,00	42,00	19,00	18,17	25,53	26,28	14,54	11,36
14	24,60	24,00	18,44	18,68	36,98	34,64	13,99	13,65
15	18,70	17,39	40,86	42,29	2,22	1,45	14,36	12,90
<b>Média</b>	41,69	42,18	18,44	18,58	13,78	13,47	15,59	15,42
<b>Mediana</b>	41,2	42,0	18,4	18,6	14,4	14,5	14,5	15,5
<b>Wilcoxon</b>	<b>p = 0,851</b>		<b>p = 0,700</b>		<b>p = 0,600</b>		<b>p = 0,826</b>	

Valores de  $p < 0,05$  considerados significantes.

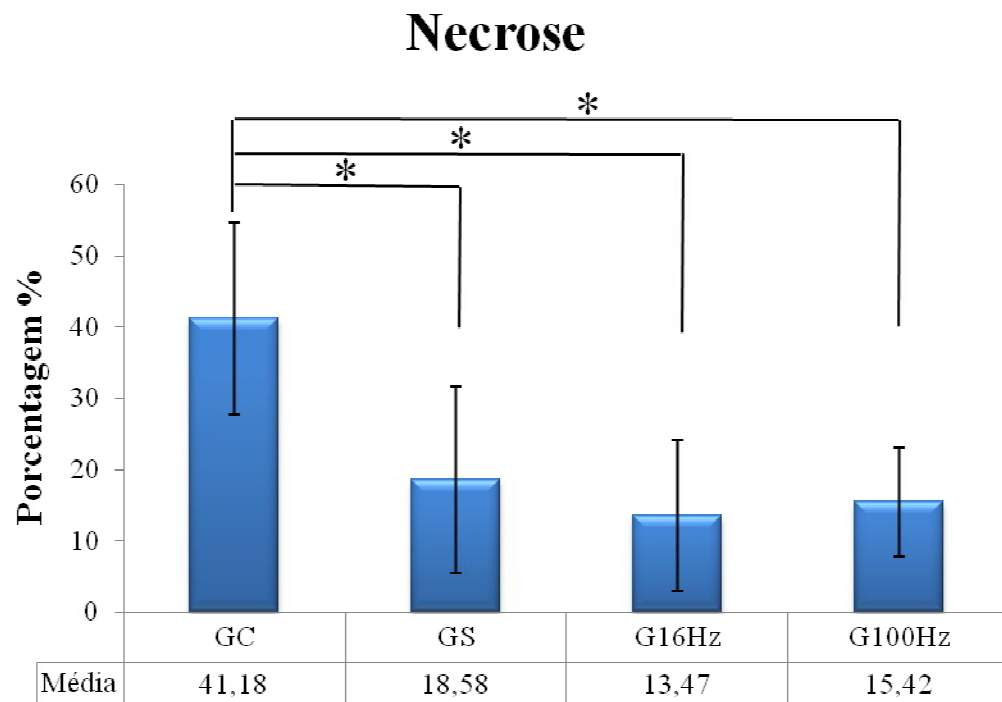
Como não houve diferença significativa entre os dados dos avaliadores 1 e 2, foram selecionados os dados do avaliador 2, para análise estatística entre os grupos (teste de *Kruskal-Wallis* e *post hoc Dunn's*), como mostra a tabela 2:

Tabela 2 – Porcentagens das áreas de necrose do avaliador 2 e comparação entre os grupos

<b>COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – ÁREA DE NECROSE (%)</b>				
	<b>GRUPO CONTROLE</b>	<b>GRUPO SIMULADO</b>	<b>GRUPO 16 Hz</b>	<b>GRUPO 100 Hz</b>
<b>ANIMAL</b>	<b>AV 2</b>	<b>AV 2</b>	<b>AV 2</b>	<b>AV 2</b>
<b>1</b>	64,01	6,14	17,30	15,52
<b>2</b>	51,48	7,45	1,97	4,52
<b>3</b>	53,80	8,48	6,45	26,95
<b>4</b>	57,73	35,14	15,53	0,00
<b>5</b>	36,13	39,90	12,88	20,04
<b>6</b>	41,22	0,00	14,75	15,53
<b>7</b>	32,60	19,97	14,52	24,25
<b>8</b>	32,08	19,78	0,00	16,43
<b>9</b>	55,03	18,58	18,16	19,39
<b>10</b>	30,15	21,79	27,93	20,42
<b>11</b>	52,88	0,00	10,18	6,30
<b>12</b>	42,19	22,43	0,00	24,00
<b>13</b>	42,00	18,17	26,28	11,36
<b>14</b>	24,00	18,68	34,64	13,65
<b>15</b>	17,39	42,29	1,45	12,90
<b>Média</b>	42,18	18,58*	13,47*	15,42*
<b>Mediana</b>	42,0	18,6	14,5	15,5
<b>DesvPad</b>	13,5	13,1	10,6	7,6
<b><i>Kruskal-Wallis</i> p &lt; 0,001*</b>				

Valores de  $p < 0,05$  considerados significantes. DesvPad = Desvio Padrão.

Na Figura 11, observa-se diferença significativa entre o grupo controle e os demais grupos ( $p < 0,001$ ) e não houve diferença significativa entre GS x G16Hz ( $p < 0,177$ ), GS x G100Hz ( $p < 0,604$ ) e G16Hz x G100Hz ( $p < 0,455$ ).



*Kruskal-Wallis* ( $p < 0,001^*$ ).

Figura 11. Comparação estatística da área de necrose entre os grupos.

Com relação à densidade vascular, houve diferença significativa entre o GC e os tratados ( $p < 0,001$ ) e entre o GS e os tratados ( $p < 0,001$ ) e não houve diferença significativa entre GC x GS ( $p < 0,010$ ), G16Hz x G100Hz ( $p < 0,042$ ), como mostra a Tabela 3 e a Figura 12.

Tabela 3 - Porcentagens das médias da densidade vascular das quatro amostras de pele e comparação entre os grupos

<i>COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – DENSIDADE VASCULAR (%)</i>				
<b>ANIMAL</b>	<b>GRUPO CONTROLE</b>	<b>GRUPO SIMULADO</b>	<b>GRUPO 16 Hz</b>	<b>GRUPO 100 Hz</b>
<b>1</b>	4	8,87	24,56	24,69
<b>2</b>	6	5,62	18,31	54,19
<b>3</b>	4,93	8,06	19,94	31,69
<b>4</b>	4,06	8,75	21,69	37,75
<b>5</b>	6,56	5,81	25,69	24,13
<b>6</b>	5,5	9,06	22,31	25,19
<b>7</b>	7,93	6,37	24,69	21,44
<b>8</b>	7,06	5,25	30	20,38
<b>9</b>	1,81	6,56	15,25	21
<b>10</b>	3,31	10,13	26,06	21,19
<b>11</b>	2,43	7,31	19,56	22,19
<b>12</b>	4,5	5,68	23,31	19,25
<b>13</b>	4,31	4	15,78	16
<b>14</b>	10,31	3,12	21,06	11,38
<b>15</b>	10,75	6,18	23,44	27,31
<b>Média</b>	5,56	6,72	22,11*	25,18*
<b>Mediana</b>	4,5	6	21	22
<b>DesvPad</b>	0,37	0,38	0,7	0,86

*Kruskal-Wallis p < 0,001\**

Valores de  $p < 0,05$  considerados significantes. DesvPad = Desvio Padrão.

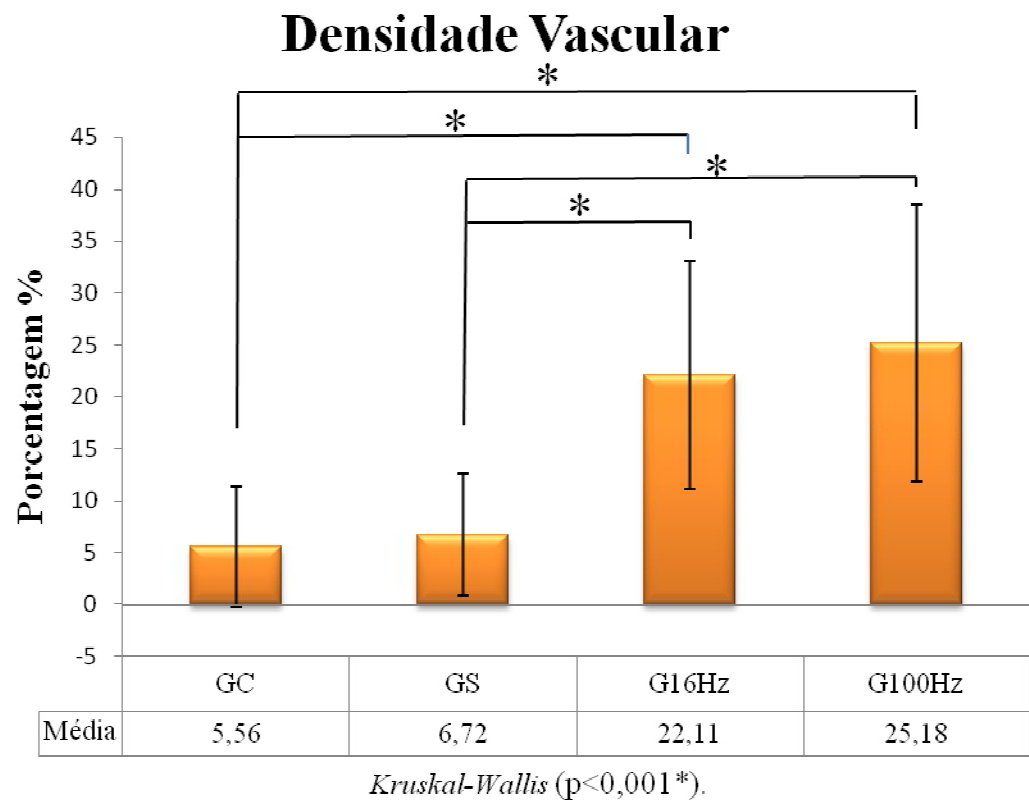


Figura 12. Comparação estatística da densidade vascular entre os grupos.

A porcentagem de necrose foi ilustrada por imagens do animal quatro do grupo simulado (Figura 13) no POI (a), 2° PO (b) e 7° PO (c).

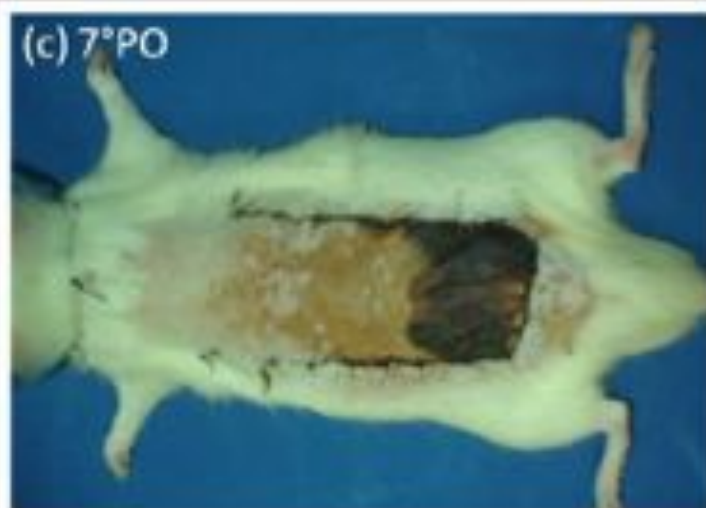
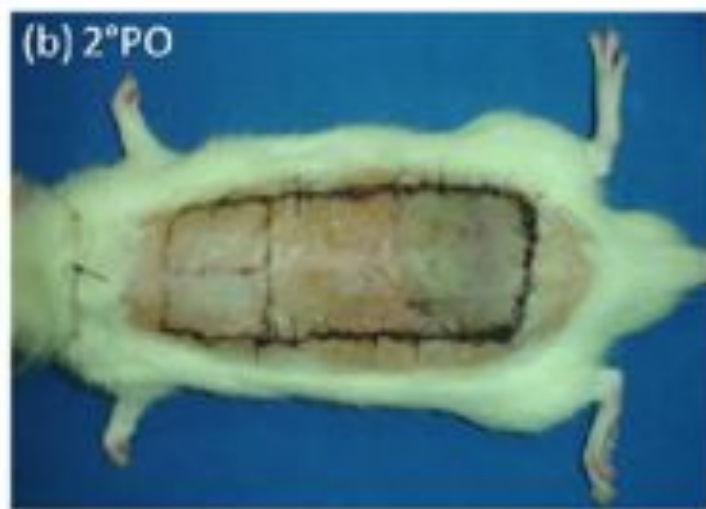


Figura 13. Evolução do pós-operatório do animal quatro do grupo simulado.

(a) 1º PO;

(b) 2º PO com sinais de isquemia na região distal do retalho;

(c) 7º PO com a necrose estabelecida na região distal do retalho, caracterizada pelo aspecto escurecido, rígido e sem pelos.

As imagens histológicas foram ilustradas com fotomicrografias (Figura 14) do grupo controle (a), grupo simulado (b), grupo 16 Hz (c) e do grupo 100 Hz (d), como segue:

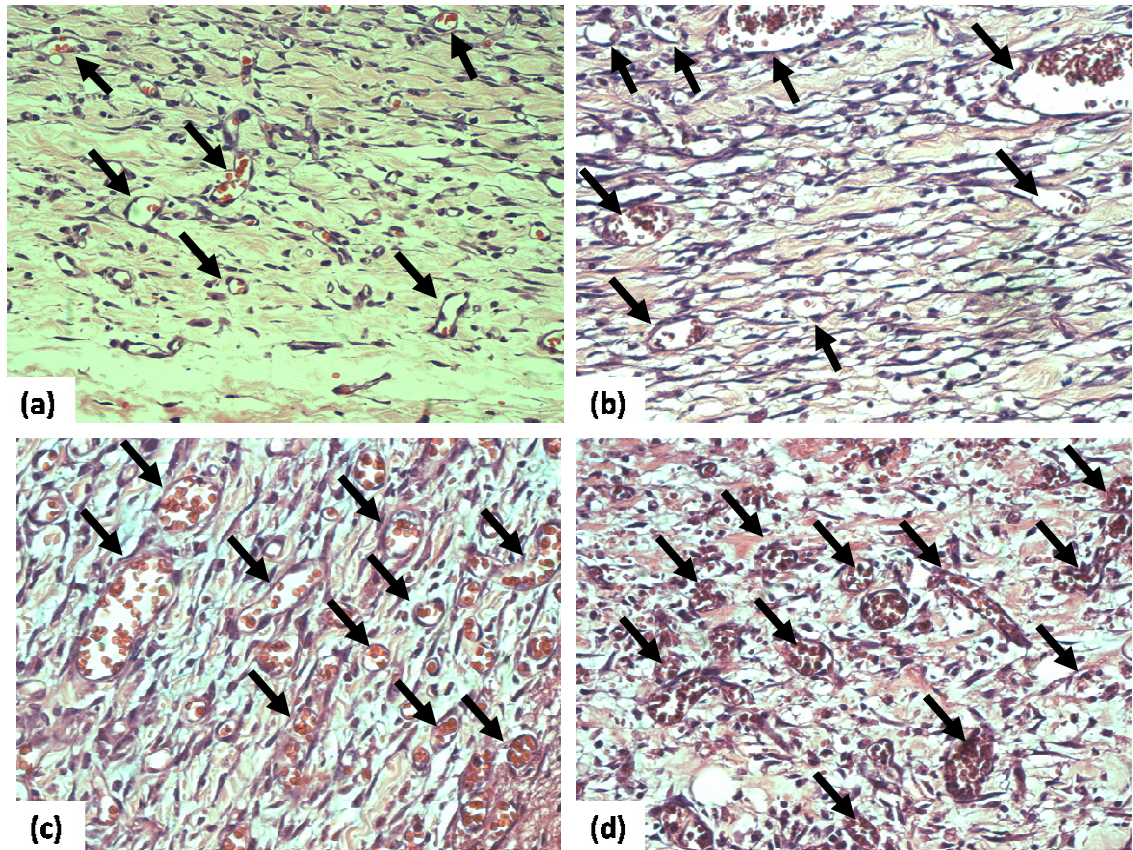


Figura 14. Fotomicrografias do GC (a), GS (b) nas quais se identifica menor quantidade de vasos sanguíneos e do G16Hz (c) e G100Hz (d), nas quais se identifica maior quantidade de vasos sanguíneos, apontados pelas setas (Hematoxilina-Eosina, 400x).

**DISCUSSÃO**



## 6. Discussão

Com o crescimento da Cirurgia Plástica, a procura por tratamentos pós-operatórios tem aumentado nos últimos anos, com o objetivo de reduzir a dor e o edema, aumentar o aporte sanguíneo tecidual e estimular o processo de reparo tecidual. Indicado para tais finalidades, o ultra-som tem sido um dos recursos acessíveis e de grande aplicabilidade na prática clínica (TACANI *et al.*, 2005).

Porém, mesmo sendo amplamente utilizado em programas de reabilitação (WEBSTER *et al.*, 1980; VAN DER WINDTA *et al.*, 1999; EBENBICHER, 2009) e em procedimentos estéticos pré-operatórios em Cirurgia Plástica (FERRARO *et al.*, 2008; ROUSTAEI *et al.*, 2009), poucos têm investigado a respeito da ação do US na viabilidade de retalhos (EMSEN, 2007; TACANI *et al.*, 2008) em comparação a outros agentes físicos, como o *laser* de baixa potência, por exemplo (KAMI *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1992; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2006; PRADO *et al.*, 2006; BOSSINI *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009).

Essa carência de informações, somada à hipótese de que a frequência de repetição de pulso de 16 Hz é a fundamental no sistema de cálcio intracelular (LOW & REED, 2000), fez com que surgisse este trabalho, o qual avaliou a influência do US de 3 MHz, com frequências de repetição de pulso de 16 e 100 Hz, na viabilidade e na angiogênese do retalho cutâneo

randômico, mostrando aumento significativo na densidade vascular, com ambas as frequências utilizadas.

A maioria dos equipamentos nacionais de US apresenta frequência do transdutor de 1, 3 ou 5 MHz, sendo esse parâmetro determinante na profundidade que se deseja atingir com o feixe ultrassônico (LOW & REED, 2000; McDIARMID & BURNS, 1987). Frequências mais altas são absorvidas mais superficialmente e ideais para tratar tecidos entre um ou dois cm de profundidade (DRAPER, RICARD, 1995; DEMMINK *et al.*, 2003). Dessa forma, selecionou-se a frequência de 3 MHz, corroborando com AMÂNCIO *et al.* (2006) e GONÇALVES *et al.* (2007), em estudos similares realizados com enxerto cutâneo em coelhos. EMSEN (2007) variou a frequência do US, usando 0,75 MHz de forma alternada com 3 MHz, na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos, porém não descreveu como foi a padronização dessa variação.

O modo de emissão do feixe ultrassônico pode ser contínuo ou pulsado, sendo que o primeiro promove mais efeitos térmicos, por ser transmitido sem intervalos e, no segundo, os ciclos de trabalhos podem variar conforme a relação entre o intervalo de emissão e o repouso das ondas ultrassônicas (10, 20 ou 50%). Assim, a forma pulsada promove menos efeitos térmicos, sendo mais favorável em condições agudas, permitindo a reabsorção de edemas e a resolução da fase inflamatória mais precocemente (DYSON, 1987).

Pela condição isquêmica e inflamatória aguda dos retalhos cutâneos randômicos, elegeu-se o modo de emissão pulsado a 20%, com intervalos de 2 ms *on* e 8 ms *off* para a FRP de 100 Hz e 12,5 ms *on* e 50 ms *off* para a

FRP de 16 Hz. Dessa forma, ocorre menor produção de calor, concordando com o trabalho de retalhos cutâneos de EMSEN (2007) e também com outros estudos semelhantes de feridas excisionais cutâneas (YOUNG & DYSON, 1990a; YOUNG & DYSON, 1990c).

A frequência de repetição de pulso é um parâmetro que pode ser variado apenas no modo de emissão pulsado e, em diversos equipamentos nacionais, varia de 16 a 100 Hz, sendo a primeira recomendada para favorecer o reparo tecidual, e a última para quadros álgicos e inflamatórios (LOW & REED, 2000). Porém, LEITE *et al.* (2003) verificaram melhora do reparo pós-fratura de tibia de ratos com 100 Hz e, por essa divergência, ambas as frequências de repetição de pulso foram escolhidas para comparação no presente estudo.

A densidade de potência dos equipamentos de US geralmente é selecionada em *SATP*, intensidade de pico espacial, variando de 0,1 a 2 W/cm<sup>2</sup> no modo pulsado ou contínuo e, para o modo pulsado, também se pode calcular a intensidade média temporal (*SATA*) durante os períodos de emissão e intervalo das ondas ultrassônicas (DOAN *et al.*, 1999).

Neste estudo, foi utilizada a intensidade de pico de 1 W/cm<sup>2</sup> (*SATP*) no modo pulsado a 20%, obtendo-se uma intensidade média de 0,2 W/cm<sup>2</sup> (*SATA*). Para selecionar a densidade de potência, deve-se considerar o tamanho da área a ser tratada, a profundidade dos tecidos que se deseja atingir, a dissipação do calor pelos tecidos e a frequência do transdutor. Doses maiores que 1,5 W/cm<sup>2</sup> (*SATP*) são recomendadas para atingirem tecidos profundos, enquanto que doses menores que 1 W/cm<sup>2</sup> (*SATP*), para tecidos superficiais (DRAPER, CASTEL, CASTEL, 1995).

A fim de definir a adequada densidade de potência, foi realizado um plano-piloto com 12 animais, distribuídos em quatro grupos G1: 0,5 W/cm<sup>2</sup> (SATP) ou 0,1 W/cm<sup>2</sup> (SATA); G2: 1 W/cm<sup>2</sup> (SATP) ou 0,2 W/cm<sup>2</sup> (SATA); G3: 1,5 W/cm<sup>2</sup> (SATP) ou 0,3 W/cm<sup>2</sup> (SATA) e G4: 2,0 W/cm<sup>2</sup> (SATP) ou 0,4 W/cm<sup>2</sup> (SATA). A densidade de potência de 1 W/cm<sup>2</sup> (SATP) ou 0,2 W/cm<sup>2</sup> (SATA) mostrou menor porcentagem de necrose, sendo a utilizada nos grupos tratados da pesquisa (Apêndice 1).

EMSEN (2007) verificou menor porcentagem de necrose em retalhos cutâneos randômicos após a aplicação do US com 0,1 W/cm<sup>2</sup> (SATA) e 0,18 W/cm<sup>2</sup> (SATA), quando comparados ao controle e, entre os grupos tratados, também observou diferença significativa. A densidade de potência de 0,18 W/cm<sup>2</sup> mostrou-se mais adequada para aumentar a viabilidade dos retalhos cutâneos, concordando com os achados do presente estudo, cuja densidade de potência foi de 0,2 W/cm<sup>2</sup> (SATA).

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com animais de experimentação, pela necessidade de coletar as amostras teciduais e avaliar intrinsecamente os efeitos biológicos de diversos recursos físicos (KAMI *et al.*, 1985; KJARTANSSON *et al.*, 1988a; SMITH *et al.*, 1992; LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2003; ESTEVES JÚNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004; ESTEVES JÚNIOR *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; PRADO *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; EMSSEN, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2007; KUO *et al.*, 2008; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008; BOSSINI *et al.*, 2009;

ESTEVEES JÚNIOR *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009).

Da mesma maneira, o animal de experimentação selecionado para este estudo foi o rato, pela facilidade de obtenção do animal, pelo baixo custo, pela praticidade no manuseio laboratorial, pelo modelo de retalho randômico que se desejava investigar e por existir uma série de trabalhos que já utilizaram esse modelo animal, favorecendo a comparação entre os resultados obtidos (KAMI *et al.*, 1985; GOMES *et al.*, 1994; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; GOMES *et al.*, 1998; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002, 2003; ESTEVEES JÚNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004; ESTEVEES JUNIOR *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; PRADO *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008; BOSSINI *et al.*, 2009; ESTEVEES JÚNIOR *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009).

Além disso, no rato, o panículo carnoso (camada muscular ausente na pele humana) é aderente à derme, mas ligado à fáscia profunda apenas por tecido areolar. No homem, o panículo adiposo (tela subcutânea superficial) é mais firmemente ligado à fáscia profunda. Em relação à irrigação sanguínea para a pele, essas camadas são comparáveis, pois os principais vasos se associam a elas, permitindo a comparação entre o modelo animal e humano, apesar de não ser possível extrapolar os resultados encontrados diretamente para a prática clínica (McFARLANE, DeYOUNG, HENRY, 1965; GOMES *et al.*, 1994; CARVALHO *et al.*, 2005).

Selecionou-se ratos machos para evitar a influência da ação de hormônios femininos, principalmente o estrógeno, que exerce efeito protetor à isquemia, como mostrou TOUTAIN *et al.* (2009) em um estudo com camundongos fêmeas, submetidas à ooforectomia e elevação do retalho cutâneo randômico após duas semanas. Os autores mostraram que no grupo submetido à ooforectomia, a necrose no retalho foi de 53,7% no 6° PO e no grupo que recebeu 17 $\beta$ -estradiol durante três dias antes da realização do retalho, foi de 3,8%. A ação hormonal exerceu de forma significativa, aumento da viabilidade, da angiogênese, das estruturas cutâneas (anexos), da reperfusão e do fluxo sanguíneo, com efeito antiinflamatório e antiapoptótico.

Durante toda pesquisa experimental deve-se levar em consideração o conceito dos “3R’s” estabelecido por Russel & Burch em 1959: *replacement* (substituição), *reduction* (redução) e *refinement* (refinamento) (RUSSEL & BURCH, 1992). Como o questionamento dessa pesquisa envolvia o modelo operatório, não foi possível substituir os animais por outros modelos experimentais, porém o refinamento foi seguido de forma criteriosa ao se utilizar um modelo de anestesia dissociativa e incluir a analgesia durante todo o experimento. Para o conceito de redução, a determinação do número de animais foi realizada pelo cálculo do poder da amostra, obtendo-se 83,58% com 15 animais em cada grupo, número mínimo para representatividade estatística adequada, concordando com estudos semelhantes em retalhos cutâneos (ESTEVES JÚNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; 2008; TSAI *et al.*, 2008; BOSSINI *et al.*, 2009; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009).

O método anestésico utilizado foi de anestesia dissociativa, que promove analgesia completa e intensa do sistema músculo-esquelético, com sono superficial, sem perda de reflexos protetores. A associação de ketamina e xilazina foi realizada por ser indicada para procedimentos operatórios de curta duração, mantendo os animais em plano anestésico de 40 a 60 min (SCHANAIDER & SILVA, 2004) e por outros autores que pesquisaram retalhos cutâneos também terem utilizado essa mesma associação (SMITH *et al.*, 1992; SARIFAKIOGLU *et al.*, 2004; AYDOGAN *et al.*, 2007; TUFAN *et al.*, 2007; BOSSINI *et al.*, 2009), mostrando ser um método eficaz, rápido e de baixo custo, associando o efeito anestésico da ketamina, com sedação, analgesia e relaxamento muscular da xilazina.

O modelo de retalho cutâneo randômico utilizado foi o proposto por McFARLANE, DeYOUNG, HENRY (1965), para avaliar a necrose, pois é uma das possibilidades de averiguar a viabilidade tecidual e a perfusão vascular. A porcentagem de necrose obtida nesse modelo varia de 25 a 50% a partir da região distal, mas em 5,7% dos casos não ocorre necrose significativa. Para padronizar as condições de isquemia e de necrose, foi colocado um filme plástico entre o retalho e o leito doador, para impedir a revascularização do retalho por meio dos vasos do leito, conforme descrito por UGLAND (1966), procedimento também realizado por outros autores (KAUFMAN *et al.*, 1985; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; GOMES *et al.*, 1998; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002, 2003; ESTEVES JÚNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; PRADO *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008; TSAI *et al.*, 2008; BOSSINI

*et al.*, 2009; ESTEVES JÚNIOR *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009).

Neste estudo, a área tratada foi a base cranial do retalho com três cm de comprimento por quatro cm de largura, a fim de favorecer a irrigação sanguínea até a porção mais distal, por meio dos vasos sanguíneos que não sofreram secção. Essa padronização pode ser comparada com EMSEN (2007) que aplicou US na base cranial do retalho e com KJARTANSSON *et al.* (1988a; 1988b) e LIEBANO, ABLA, FERREIRA (2006, 2008), que utilizaram *TENS* nessa mesma região. Por não possuírem uma artéria específica, PINFILDI *et al.* (2009) relataram que, em retalhos cutâneos randômicos, seria interessante aplicar *laser* também ao redor destes. Entretanto, PRADO *et al.* (2009) demonstraram que o local de aplicação influenciou na viabilidade de retalhos cutâneos tratados por *laser*. Obtiveram resultados significantes, irradiando a 2,5 cm a partir da base cranial do retalho, com valores de necroses significativamente menores, comparado a outros pontos de aplicação. Portanto, observa-se que a área de aplicação do US, entre zero e três cm a partir da base cranial do retalho, atingiu o ponto ideal proposto por PRADO *et al.* (2009).

O tempo de tratamento com US depende da área a ser tratada e da área de radiação efetiva (*ERA*) do equipamento, dividindo-se a área pela *ERA* (HOOGLAND, 1986). Assim, a energia ultrassônica pode ser igualmente distribuída ao longo da área, evitando sua dispersão. Neste estudo, a base cranial do retalho com 3 cm por 4 cm totalizava uma área de 12 cm<sup>2</sup> que, dividida pela *ERA* de 0,5 cm<sup>2</sup>, chegaria a um tempo de 24 minutos de aplicação. Porém, HOOGLAND (1986) preconiza um tempo máximo de 15 minutos de aplicação ininterrupta por região tratada e, caso o



tempo calculado exceda esse limite, a área deve ser dividida. Portanto, a área inicial de 12 cm<sup>2</sup> foi dividida em duas de 6 cm<sup>2</sup>, aplicando-se o US durante 12 minutos em cada.

O US foi aplicado por técnica direta, movimentando o transdutor suavemente, sem pressionar, para evitar a formação de ar entre o transdutor, o gel e a pele do animal, de forma circular (anti-horária) e ininterrupta, para evitar estase temporária e dano endotelial (DOCKER, FOULKES, PATRICK, 1982). A velocidade de movimentação foi de aproximadamente 2 cm/s, corroborando com o protocolo dinâmico em cadáveres suínos de DEMMINK *et al.* (2003) e com WEAVER *et al.* (2006), que compararam diferentes velocidades de movimentação do transdutor em 11 voluntários. Constataram que não houve diferença no aumento de temperatura intramuscular entre as três velocidades usadas: 2-3 cm/s, 4-5 cm/s e 7-8 cm/s. No presente estudo, optou-se pela movimentação mais lenta, por se tratar de um período pós-operatório imediato, evitando possíveis traumas teciduais.

O meio de acoplamento utilizado foi o gel, composto de polímero carboxivinílico PPG, TEA, conservante, água purificada e pH neutro, por ser hidrossolúvel, não gorduroso, não irritante, não abrasivo, hipoalergênico, inodoro e incolor. Além disso, possui menor atenuação da onda ultrassônica, baixa formação de bolhas, alta transmissão acústica, alta viscosidade e de baixo custo, sendo caracterizado como um dos meios mais eficientes e adequados para a terapia por US (DOCKER, FOULKES, PATRICK, 1982; CASAROTTO *et al.*, 2004; POLTAWSKI & WATSON, 2007).

Pela condição isquêmica e inflamatória do pós-operatório do retalho cutâneo randômico, que se inicia nas primeiras horas após a elevação deste, os tratamentos devem ser aplicados precocemente, iniciando-se imediatamente após o procedimento operatório e prosseguindo-se durante a fase pós-isquêmica, a fim de aumentar e de manter o fluxo sanguíneo (SASAKI & PANG, 1980; KERRIGAN, 1983) e de melhorar a congestão venosa (UGLAND, 1966).

De acordo com essa prerrogativa, a aplicação do US foi efetuada 60 segundos após a sutura do retalho e prosseguiu por mais dois dias consecutivos, concordando com outros autores que também utilizaram agentes físicos, como o *TENS*, a iontoforese e o *laser* de baixa potência, com resultados significantes (ESTEVES JÚNIOR *et al.*, 2004; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008; ESTEVES JÚNIOR *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009).

Seguindo esse raciocínio, é questionável a aplicação do US por 5 minutos diários até o 15° PO efetuada por EMSEN (2007), período tardio, no qual os sinais de necrose já são evidentes desde o 3° e o 4° dias, atingindo o limiar final entre 7 e 10 dias (McFARLANE, DeYOUNG, HENRY, 1965; KAMI *et al.*, 1985; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; GOMES *et al.*, 1998).

Baseando-se na evolução da necrose, esta foi avaliada no 7° PO, pelo método do gabarito de papel descrito por SASAKI & PANG (1980). Por ser um método confiável, com erro menor que 5%, foi incluído na metodologia deste estudo. A coleta dos dados foi feita por dois avaliadores

e, quando comparados entre si, não apresentaram diferenças significantes, fato que demonstra sua reprodutibilidade e confiabilidade. Somam-se a essas vantagens facilidade de utilização, baixo custo e ampla aplicação na literatura, facilitando a comparação dos resultados (GOMES *et al.*, 1994; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; GOMES *et al.*, 1998; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002, 2003; ESTEVES JÚNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; PRADO *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008; BOSSINI *et al.*, 2009; ESTEVES JÚNIOR *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009).

EMSEN (2007) utilizou plástico transparente para demarcar a área viável e de necrose do retalho, de 10 cm de comprimento por 3 cm de largura, no 15° PO, pelo método de planimetria. GOMES *et al.* (1998) compararam a planimetria computadorizada com o método do gabarito de papel (SASAKI & PANG, 1980) e verificaram não haver diferenças significantes, sendo este último de mais fácil aplicação.

A porcentagem de necrose do grupo controle encontrada nesse estudo, variou de 17,39% a 64,01%, com média de 42,18%, concordando com McFARLANE, DeYOUNG, HENRY (1965), cuja porcentagem de necrose variou de 25% a 50%. Pesquisas com esse modelo de retalho tratado com agentes físicos, também mostraram uma variação média do grupo controle de 43,11% (LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006) a 50,97% (PRADO *et al.*, 2009), com média de 47,06% entre os nove trabalhos analisados (ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; PRADO *et al.*, 2006;

RUSSO *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008; BOSSINI *et al.*, 2009; ESTEVES JÚNIOR *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009). Com agentes farmacológicos, os estudos mostraram variação de 22% (CAMPOS *et al.*, 2001) a 66% (ABLA *et al.*, 2005), com média de 43,14% entre os cinco analisados (CAMPOS *et al.*, 2001; ESTEVES JÚNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004; FONSECA *et al.*, 2004; ABLA *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2007).

Com relação aos resultados do presente estudo, foi encontrado dado peculiar quanto à porcentagem de necrose, pois não houve diferença entre o grupo simulado e os grupos tratados, mostrando que o aumento da viabilidade desse procedimento pode ter ocorrido pela movimentação externa do transdutor.

Esse achado corrobora com ROBINSON & BUONO (1995), que investigaram o efeito do US no fluxo sanguíneo muscular e cutâneo do antebraço de indivíduos saudáveis, durante cinco minutos. Observaram aumento significativo do fluxo sanguíneo cutâneo tanto no grupo tratado como no simulado, porém sem diferença entre eles. FABRIZIO *et al.* (1996) evidenciaram a velocidade do fluxo sanguíneo na artéria poplítea humana com grupos controle, simulado e tratados por US, durante 15 minutos. Encontraram diferença significativa apenas entre controle x simulado e controle x US. Ambos os estudos justificaram o aumento do fluxo sanguíneo no grupo simulado pelos efeitos térmicos causados pelos movimentos externos do transdutor (ROBINSON & BUONO, 1995; FABRIZIO *et al.* 1996).

Mais recentemente, NOBLE, LEE, GRIFFITH-NOBLE (2007), também pesquisaram os efeitos do US de 3 MHz no fluxo sanguíneo cutâneo do antebraço humano, por 6 minutos, com grupos controle, simulado, pulsado (ciclo de trabalho de 50%) e contínuo. Referiram aumento significativo do fluxo sanguíneo nos grupos tratados e no simulado, quando comparados ao controle, mas não entre os grupos tratados e o simulado. Os autores concluíram que o aumento do fluxo sanguíneo no grupo simulado indica que os movimentos externos do transdutor podem promover efeito adicional de massagem.

Durante a terapia ultrassônica, bem como durante a simulação no grupo sham, o transdutor foi movido lenta, suave, superficialmente e sem executar pressão adicional à pressão exercida pelo próprio peso do transdutor sobre o retalho, aproximadamente 244 g/cm<sup>2</sup>. Provavelmente, a estimulação mecânica da pele causada pelos movimentos do transdutor, aumentou o fluxo sanguíneo, como demonstraram FABRIZIO *et al.* (1996) e NOBLE, LEE, GRIFFITH-NOBLE (2007) e, também referem, que os mecanismos pelos quais ocorreu esse efeito ainda não estão claros. Para FABRIZIO *et al.* (1996) esse efeito de massagem pode ter desencadeado estímulos autonômicos levando ao aumento de temperatura na pele e, para NOBLE, LEE, GRIFFITH-NOBLE (2007), pode ter ocorrido vasodilatação tanto pela liberação de mediadores químicos, como a histamina, quanto pelo aumento de temperatura da pele. Possivelmente esses mecanismos favoreceram a viabilidade dos retalhos tanto no grupo simulado como nos tratados.

MORHENN (2000) aplicou manobras de deslizamentos profundos (*firm stroking*) na face de oito voluntários e verificou aumento significativo

na temperatura da pele e no eritema, porém esse efeito não ocorreu pelo aumento de histamina, pois a ingestão de anti-histamínico via oral não impediu a formação do eritema. A autora relaciona esses efeitos cutâneos com a estimulação de nociceptores que liberam substância P, a qual estimula a produção de óxido nítrico na microcirculação da derme e ambos atuam como vasodilatadores. Todavia, é necessário esclarecer que, no presente estudo, durante a aplicação ou a simulação do US, o transdutor foi movimentado de forma suave, sem pressionar a pele do animal e, dessa forma, não se assemelhou ao deslizamento profundo (*firm stroking*), e sim ao deslizamento superficial.

Com relação aos estímulos nociceptivos, a ativação de mecanorreceptores de baixo limiar conectados a fibras-A $\beta$  aferentes por estimulação mecânica, pode evocar aumento do fluxo sanguíneo em áreas de alodínia, como no caso do retalho cutâneo, mas não em áreas de pele normal e sem dor (GARCIA-NICAS, LAIRD, CERVERO, 2001; CERVERO & LAIRD, 1996). O aumento do fluxo sanguíneo ocorre devido a maior liberação de neuropeptídeos vasoativos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*Calcitonin Gene-Related Peptide – CGRP*) e a substância P, na área estimulada e no dermatomo correspondente a essa (GARCIA-NICAS, LAIRD, CERVERO, 2001). Se a estimulação mecânica do transdutor do US foi capaz de facilitar a liberação desses neuropeptídeos, isso pode estar relacionado com a diminuição da necrose, conforme mostraram algumas pesquisas que utilizaram *CGRP* na melhora da viabilidade dos retalhos cutâneos (ESTEVES JÚNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004; GHERARDINI *et al.*, 1998; GHERARDINI *et al.*, 1999; JANSEN *et al.*, 1999). Esse mesmo mecanismo foi sugerido como possível responsável pela redução da

necrose em retalhos isquêmicos submetidos à aplicação da *TENS* (KJARTANSSON *et al.*, 1988a; 1988b; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008).

Essa estimulação mecânica, também pode ter se assemelhado ao deslizamento superficial (*effleurage*) da massagem clássica, que promove aumento da circulação sanguínea e linfática da pele (GOATS, 1994; KUPRIAN, 1995; DE DOMENICO & WOOD, 1997; WATSON *et al.*, 1999; TACANI & CERVERA, 2004) devido a estimulação dos receptores cutâneos e por via reflexa atuar no controle autonômico dos capilares. Pode, também, facilitar a reabsorção de edemas (DE DOMENICO & WOOD, 1997) e levar a uma possível diminuição da estase sanguínea e da congestão venosa, considerados por HJORTDAL *et al.* (1994) e UGLAND (1966) como a principal causa de necrose de retalhos cutâneos, justificando a melhora da viabilidade desses no grupo simulado.

A aplicação de estímulos mecânicos na superfície da pele pode desencadear processos mecanoquímicos pela transmissão de forças ao longo da rede de fibras colágenas, ampliando as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, como sugerem SILVER, SIPERKO, SEEHRA (2003). Os autores mostraram que o metabolismo celular durante o processo de cicatrização pode ser influenciado por forças externas, as quais favorecem a abertura dos canais iônicos, aumentando sua taxa metabólica, expressão gênica e síntese proteica. Referem ainda, que estímulos mecânicos se convergem em energia mecânica gerando potenciais químicos. Possivelmente, a estimulação mecânica do transdutor do US pode ter desencadeado tais interações metabólicas como sugerido pelos

autores, porém estudos que envolvam a biologia molecular com as ciências físicas sejam necessários para maior explicação dessas questões.

EMSEN (2007) investigou a viabilidade de retalhos cutâneos em ratos tratados por US e verificou redução da necrose nos grupos tratados, comparados ao simulado, diferentemente dos achados deste estudo. Essa diferença pode ser explicada pelo maior tempo de simulação da terapia realizada neste estudo, 24 minutos contra 5 minutos, concordando com NOBLE, LEE, GRIFFITH-NOBLE (2007) e FABRIZIO *et al.* (1996), que obtiveram aumento significativo do fluxo sanguíneo cutâneo, respectivamente, com 6 e 15 minutos de aplicação, sem diferença entre os grupos tratados por US e o simulado.

Ainda no 7° PO, foram retiradas as amostras de pele para analisar a densidade vascular pela quantidade de vasos sanguíneos e para obter informações adicionais acerca da viabilidade dos retalhos. Foram selecionadas quatro amostras de pele, a cada 2,5 cm que representassem quase a totalidade da área referente ao retalho, aproximadamente 70%. TSAI *et al.* (2008) pesquisaram a densidade vascular em ratos submetidos ao retalho cutâneo randômico, tratados com sildenafil combinado com *VEGF*. Selecionaram amostras de pele a cada 2,5 cm, duas amostras longitudinais e duas transversais, sendo estas últimas das mesmas regiões obtidas neste estudo, aproximadamente a 50 e a 70% da base cranial.

AMÂNCIO *et al.* (2006) e GONÇALVES *et al.* (2007) também selecionaram amostras de pele de enxertos em coelhos após terapia ultrassônica, quantificando os vasos sanguíneos por campos. ULUSOY *et al.* (2005) avaliaram 4 campos de uma amostra obtida transversalmente da



metade do retalho cutâneo de ratos tratados com sildenafil, concordando com a análise da densidade vascular proposta neste estudo, no qual 4 campos também foram eleitos por amostra de pele, contando-se os vasos dos 16 campos de cada animal.

A densidade vascular teve aumento significativo nos grupos tratados (22,11% G16Hz e 25,18% G100Hz), quando comparados ao controle e ao simulado (5,56% GC e 6,72% GS), confirmando o aumento da angiogênese pela estimulação ultrassônica, tal como observado por outros pesquisadores em estudos experimentais *in vitro* (MORTIMER & DYSON, 1988; DOAN *et al.*, 1999; MIZRAHI, SELIKTAR, KIMMEL, 2007) e *in vivo*, em modelos de retalhos miofasciocutâneos (TACANI *et al.*, 2008), de enxertos em coelhos (AMÂNCIO *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2007), de feridas em ratos (YOUNG & DYSON, 1990c; MENDONÇA *et al.*, 2006) e de isquemia em membros de ratos (BARZELAI *et al.*, 2006; HIGHTOWER & INTAGLIETTA, 2009) e de coelhos (SUGITA *et al.*, 2008). Esse é o primeiro estudo que mostra um aumento na densidade vascular em retalhos cutâneos isquêmicos com a aplicação de US terapêutico. O estudo prévio da literatura, mediu apenas a área viável do retalho cutâneo (EMSEN, 2007).

TACANI *et al.* (2008) analisaram a angiogênese no retalho *TRAM* em ratos tratados por US de 3 MHz, ciclo de trabalho de 20% a 0,1 W/cm<sup>2</sup>, 0,2 W/cm<sup>2</sup> e 0,3 W/cm<sup>2</sup> (SATA), por 8 min. Observaram menor porcentagem de necrose e maior densidade vascular com 0,2 W/cm<sup>2</sup>, e apesar de modelos de retalhos diferentes, corroboram com os resultados deste estudo. GONÇALVES *et al.* (2007) investigaram a integração de enxertos cutâneos em coelhas com US 3 MHz, 0,5 W/cm<sup>2</sup> (SATA), ciclo de

trabalho de 50%, por 5 min. Também obtiveram maior número de vasos no grupo tratado que no simulado, com diferença significativa e, apesar de procedimentos operatórios distintos (enxerto e retalho), o US aumentou a angiogênese, mostrando-se recurso auxiliar pós-cirurgia plástica.

Algumas pesquisas mostram que o US aumenta o influxo de cálcio intracelular, que estimula a atividade da enzima óxido nítrico sintetase (DYSON, 1987; MORTIMER & DYSON, 1988; SUCHKOVA *et al.*, 2002; BERTUGLIA, 2007; SUGITA *et al.*, 2008; HIGHTOWER & INTAGLIETTA, 2009). Pode ser que o aumento da angiogênese observada neste estudo tenha sido pela maior quantidade de óxido nítrico produzido, o qual modula a produção e/ou a atividade dos fatores angiogênicos, promovendo proliferação e migração de células endoteliais (BARZELAI *et al.*, 2006; BERTUGLIA, 2007).

Apesar do US ter aumentado significativamente a angiogênese, possivelmente esse evento não teve influência direta na prevenção da necrose, pois no grupo simulado também houve diminuição desta. Apesar de os estímulos angiogênicos, como a liberação de fatores de crescimento e citocinas por macrófagos (*Platelet-Derived Growth Factor – PDGF*, *Fibroblast Growth Factor – FGF*, Interleucina – IL-8) e mastócitos (*FGF*, IL-8) se iniciarem precocemente na fase inflamatória, a angiogênese vai se estabelecendo durante a fase proliferativa do reparo tecidual, com acréscimo dos estímulos de outros fatores de crescimento (*VEGF*, *Transforming Growth Factor – TGF- $\beta$* ), migração e proliferação de células endoteliais (DYSON, 1987; YOUNG & DYSON, 1990c). Esse período, considerado pós-operatório tardio, é o momento em que a necrose já se estabeleceu (SASAKI & PANG, 1980; KERRIGAN, 1983), não havendo

tempo hábil para restabelecimento da microcirculação pelos novos vasos formados. Essa questão pode auxiliar no esclarecimento dos resultados observados, pois, nos grupos tratados, houve aumento significativo apenas da angiogênese, e não da necrose, quando comparados ao grupo simulado.

Dessa maneira, o aumento do fluxo sanguíneo e linfático, promovido pelo efeito externo de massagem, pode ter melhorado a estase e o edema, os quais parecem ser os mecanismos mais importantes envolvidos na prevenção da necrose, no POI, ainda na fase inflamatória do reparo tecidual (UGLAND, 1966; SASAKI & PANG, 1980; HJORTDAL *et al.*, 1994).

No presente estudo, não houve diferença significativa na porcentagem de necrose e tampouco na densidade vascular entre os grupos 16 Hz e 100 Hz, demonstrando que, provavelmente, ambas as frequências de repetição de pulso, podem ter estimulado o sistema de cálcio intracelular e não apenas com 16 Hz, como referido por LOW & REED (2000), ou que ambas favoreceram o influxo de cálcio intracelular (MORTIMER & DYSON, 1988; JUFFERMANS *et al.*, 2008) e por meio desse mecanismo estimularam a angiogênese (MIZRAHI, SELIKTAR, KIMMEL, 2007).

Poucos estudos mostraram a ação das diferentes FRP, e com uma FRP de 20 Hz, próxima a de 16 Hz, JUFFERMANS *et al.* (2008) observaram que o US de 1 MHz *in vitro* estimulou o influxo de cálcio em células do miocárdio de ratos. MIZRAHI, SELIKTAR, KIMMEL (2007), utilizando uma FRP intermediária, de 40 Hz, observaram aumento da angiogênese *in vitro*, com células aórticas bovinas, utilizando US de 1 MHz. MORTIMER & DYSON (1988) verificaram, *in vitro*, o aumento do influxo de cálcio em fibroblastos do embrião de frangos com US de 1 MHz

e FRP de 100 Hz, tal como referiu DINNO *et al.* (1989), que o US de 1 MHz a 100 Hz também aumentou o influxo de cálcio nas células da pele de sapos.

Com relação à comparação entre as FRP, apenas esse estudo e o de LEITE *et al.* (2003) compararam 16 Hz com 100 Hz, sendo que nesse estudo foi verificada a ação das FRP no reparo cutâneo e, no de LEITE *et al.* (2003), no reparo ósseo. Esses autores mostraram que o US de 1 MHz a 100 Hz foi mais efetivo que 16 Hz em acelerar o processo de reparo pós-fratura de tíbia de ratos, enquanto que nesse estudo não houve diferença no reparo cutâneo entre as FRP utilizadas.

Dessa forma, a FRP que poderia ser considerada um parâmetro de extrema importância quando utilizado com objetivo de aceleração e modulação do reparo tecidual, deve ser utilizado com cautela na prática clínica, pois, talvez, esse parâmetro não influencie os efeitos biofísicos do US envolvidos na angiogênese e na viabilidade de retalhos.

Os achados permitiram a reflexão quanto à ação do ultra-som na fisiopatologia da isquemia e da necrose após elevação de retalhos cutâneos, pois se acreditava que, ao diminuir as condições isquêmicas e ampliar a angiogênese, poderia-se prevenir a necrose. Porém, é possível observar que outros aspectos também foram extremamente importantes, como a melhora do retorno venoso e linfático, possivelmente mediado pelo efeito externo de massagem.

Como perspectivas sugere-se analisar os efeitos do US na microcirculação por meio da dosagem de substâncias vasodilatadoras,

como histamina, óxido nítrico, substância P e *CGRP*, mediadoras da resposta inflamatória e do fluxo sanguíneo, entre outras funções. Ampliar a avaliação da angiogênese por imuno-histoquímica com dosagem de *VEGF* e óxido nítrico, quantificar células inflamatórias como mastócitos e correlacionar com a histamina liberada por estes, e avaliar o retorno venoso por *laser Doppler* e linfático por linfocintilografia.

Novas pesquisas devem ser realizadas a fim de demonstrar os efeitos do US e de seus respectivos parâmetros no fluxo sanguíneo e linfático e na reperfusão pós-isquêmica, para melhor entendimento da terapia ultrassônica em retalhos cutâneos.

**CONCLUSÃO**

## 7. Conclusão

Conclui-se que o ultra-som com frequências de repetição de pulso de 16 e 100 Hz, aumentou a angiogênese e, ambos, o ultra-som e a sua simulação, aumentaram a viabilidade do retalho cutâneo randômico, em ratos *Wistar*.

## **REFERÊNCIAS**



**8. Referências**

Abla LEF, Gomes HC, Percário S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2005;20(2):121-3.

Amâncio ACG, Barbaeri CH, Mazzer N, Garcia SB, Thomazini JA. Ultrasonic stimulation of total skin grafts union. An experimental study in rabbits. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(5):276-9.

Arnold PB, Merritt W, Rodeheaver GT, Campbell CA, Morgan RA, Drake DB. Effects of perivascular botulinum toxin-A application on vascular smooth muscle and flap viability in the rat. *Ann Plast Surg.* 2009;62(5):463-7.

Assis LR, Marcolino AM, Pinfildi CE, Prado RP, Lourencin F, Ferreira LM. Comparação dos lasers diodo 904 nm e 670 nm na viabilidade do retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos. *Fisioter Brasil.* 2006;7(1):36-9.

Atalay C, Koçkaya A, Çetin B, Kismet K, Akay T. Efficacy of topical nitroglycerin and transcutaneous electrical nerve stimulation on survival of random-pattern skin flaps in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2003;37(1):10-3.

Atalay C, Yilmaz KB. The effect of transcutaneous electrical nerve

stimulation on postmastectomy skin flap necrosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117:611-4.

Aydogan H, Gurlek A, Parlakpınar H, Askar I, Bay-Karabulut A, Aydogan N, *et al.* Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2007;60:563-8.

Barzelai S, Sharabani-Yosef O, Holbova R, Castel D, Walden R, Engelberg S, *et al.* Low-intensity ultrasound induces angiogenesis in rat hind-limb ischemia. *Ultrasound Med Biol.* 2006;32(1):139-45.

Bertuglia S. Mechanisms by which low-intensity ultrasound improve tolerance to ischemia-reperfusion injury. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33:663-71.

Bezuhly M, Morris SF, Juskevicius R, Currie W, West KA, Liwski RS. Activated protein C improves ischemic flap survival and modulates proangiogenic and antiinflammatory gene expression. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123(2):502-15.

Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, Renno AC, Benze B, Zuanon JA, *et al.* Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):209-13.

Campos H, Ferreira LM, Santos WLC, Araújo MCM. Efeitos da nicotina nos retalhos cutâneos em ratos. *Acta Cir Bras.* 2001;16(4):206-10.

Casarotto RA, Adamowski JC, Fallopa F, Bacanelli F. Coupling agents in therapeutic ultrasound: acoustic and thermal behavior. *Arch Phys Med Rehabil.* 2004;85:162-5.

Carvalho EN, Ferreira LM, Carvalho NAS, Abla LEF, Liebano RE. Viability of a random pattern dorsal skin flap, in diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2005;20(3):225-8.

Cervero F, Laird JMA. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain.* 1996;68:13-23.

Cymrot M, Percário S, Ferreira LM. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. *Acta Cir Bras.* 2004;19(1):18-26.

Davis RE, Wachholz JH, Jassir D, Perlyn CA, Agrama MH. Comparison of topical anti-ischemic agents in salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. *Arch Facial Plast Surg.* 1999;1:27-32.

De Domenico G, Wood EC. Técnicas de massagem de Beard. 4ª ed. São Paulo (SP): Manole; 1997.56-8p.

Demmink JH, Helders PJM, Hobaek H, Enwemeka C. The variation of heating depth with therapeutic ultrasound frequency in physiotherapy. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29(1):113-8.

Dinno MA, Dyson M, Young SR, Mortimer AJ, Hart J, Crum LA. The significance of membrane changes in the safe and effective use of

therapeutic and diagnostic ultrasound. *Phys Med Biol.* 1989;34:1543-52.

Doan N, Rehem P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999;57:409-19.

Docker MF, Foulkes DJ, Patrick MK. Ultrasound couplants for physiotherapy. *Physiotherapy.* 1982;68(4):124-5.

Draper DO, Castel JC, Castel D. Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1995;22(4):142-50.

Draper DO, Ricard MD. Rate of temperature decay in human muscle following 3 MHz ultrasound: The stretching window revealed. *J Athl Train.* 1995;30(4):304-7.

Duarte SI, Gomes HFC, Ferreira LM. Effect of dimethyl sulphoxide on necrosis of skin flaps in rats. *Can J Plast Surg.* 1998;6(2):93-7.

Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy.* 1987;73(3):116-20.

Dyson M, Pond JB. The effects of ultrasound on circulation. *Physiotherapy.* 1973;59:284-7.

Ebenbichler G. Evidence-based medicine and therapeutic ultrasound of the

musculoskeletal system. *Z Rheumatol.* 2009;68(7):543-8.

Emsen IM. The effect of ultrasound on flap survival: an experimental study in rats. *Burns.* 2007;33:369-71.

Esteves Júnior I, Ferreira LM, Liebano RE. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cir Bras.* 2004;19(6):626-9.

Esteves Júnior I, Masson IB, Ferreira LM, Liebano RE, Baldan C, Gomes AC. Administração tópica de cloridrato de hidralazina na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cir Bras.* 2005;20(2):164-7.

Esteves Júnior I, Tacani PM, Liggieri VC, Ruggi BG, Ferreira LM, Liebano RE. Histamine iontophoresis on the viability of random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2009;24:48-51.

Fabrizio PA, Schmidt JA, Clemente RF, Lankiewicz IA, Levine ZA. Acute effects of therapeutic ultrasound delivered at varying parameters on the blood flow velocity in a muscular distribution artery. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1996;24(5):294-302.

Ferraro GA, De Francesco F, Nicoletti G, Rossano F, D'Andrea F. Histologic effects of external ultrasound-assisted lipectomy on adipose tissue. *Aesthetic Plast Surg.* 2008;32:111-5.

Ferreira LM, Andrews JM, Laredo Filho J, Ramos RR. Retalho fásio-cutâneo axial na reparação de perdas de substâncias da perna. *F Med.*

1986;93(4):261-4.

Ferreira LM, Andrews JM, Laredo Filho J. Retalho fasciocutâneo de base distal: Estudo anatômico e aplicação clínica nas lesões do terço inferior da perna. *Rev Bras de Ort.* 1987;2(5):127-31.

Ferreira LM, Nicoletti SJ, Hochman BS, Laredo Filho J, Andrews JM. Utilização da fixação de Hoffman em retalho fásquio-cutâneo Cross-leg. *F Med.* 1988;97(2):95-7.

Fonseca AV, Ferreira LM, Gomes HC, Percário S. Terazosin and propranolol as blockers to the deleterious effect of nicotine in a random skin flap, in the rat. *Acta Cir Bras.* 2004;19(3):186-95.

Freire ST, Ferreira LM, Gomes HC, Percário S. Uric acid as a monitor of oxidative stress in a random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2003;18(6):534-6.

Fujihara Y, Koyama H, Ohba M, Tabata Y, Fujihara H, Yonehara Y, *et al.* Controlled delivery of  $\beta$ -FGF to recipient bed enhances the vascularization and viability of an ischemic skin flap. *Wound Rep Reg.* 2008;16:125-31.

Garcia-Nicas E, Laird JMA, Cervero F. Vasodilatation in hyperalgesic rat skin evoked by stimulation of afferent  $A\beta$ -fibers: further evidence for a role of dorsal root reflexes in allodynia. *Pain.* 2001;94:283-91.

Gherardini G, Girlek A, Milner SM, Matarasso A, Evans GRD, Jernbeck J, *et al.* Calcitonin gene-related peptide improves skin flap survival and

tissue inflammation. *Neuropeptides*.1998; 32(3):269-73.

Gherardini G, Lundeberg T, Cui J, Eriksson SV, Trubek S, Linderoth B. Spinal cord stimulation improves survival in ischemic skin flaps: an experimental study of the possible mediation by calcitonin gene-related peptide. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103(4):1221-8.

Goats GC. Massage – The scientific basis of an ancient art: part 2. Physiological and therapeutic effects. *Br J Sp Med*. 1994;28(3):153-6.

Gomes HFC, Bueno PCS, Scardoeli CAA, Landman MRL, Ishizuka MMA, Martins DMFS, Andrews JM. Effect of nicotine in randomized skin flaps in rats. *Rev Hosp São Paulo Esc Paul Med*. 1994; 5:13-7.

Gomes HFC, Bueno P, Scardoeli CAC, Percario S, Landman MRL, Ferreira LM. Effect of N-acetylcysteine in a random skin flap after administration of nicotine, in the rat. *F Med (BR)*. 1998;117(3):209-11.

Gomes HC, Campos JHO, Ferreira LM, Kobayashi LA. Experimental model to study the effect of nicotine in a random skin flap, in the rat. *Acta Cir Bras*. 2004;19(Edição especial):1-4.

Gonçalves AC, Barbieri CH, Mazzer N, Garcia SB, Thomazini JA. Can therapeutic ultrasound influence the integration of skin grafts? *Ultrasound Med Biol*. 2007;33:1406-12.

Guirro R, Serrão F, Elias D, Bucalon AJ. Calibration of therapeutic ultrasound equipment. *Physiotherapy*. 1997;83(8):419-22.

Hightower CM, Intaglietta M. Early iNOS impairment and late eNOS enhancement during reperfusion following 2.49 MHz continuous ultrasound exposure after ischemia. *Ultrason Sonochem.* 2009;16:197-203.

Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Venous ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg.* 1994;93(2):366-74.

Hoogland R, editor. *Terapia ultrasónica.* Delft: Enraf –Nonius; 1986.

Im MJ, Lee WP, Hoopes JE. Effect of electrical stimulation on survival of skin flaps in pigs. *Phys Ther.* 1990;70(1):37-40.

Jansen GB, Törkvist L, Löfgren O, Raud J, Lundeberg T. Effects of calcitonin gene-related peptide on tissue survival, blood flow and neutrophil recruitment in experimental skin flaps. *Br J Plast Surg.* 1999; 52: 299-303.

Jansen G, Lundeberg T, Samuelson UE, Thomas M. Increased survival of ischemic musculocutaneous flaps in rats after acupuncture. *Acta Physiol Scand.* 1989;135(4):555-8.

Juffermans LJM, Kamp O, Dijkmans PA, Visser CA, Musters RJP. Low-intensity ultrasound-exposed microbubbles provoke local hyperpolarization of the cell membrane via activation of BKCa channels. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34:502-8.

Kami T, Yoshimura Y, Nakajima T, Ohshiro T, Fujino T. Effects of low-



power diode lasers on flap survival. *Ann Plast Surg.* 1985;14(3):278-83.

Kaufman T, Angel MF, Eichenlaub EH, Levin M, Hurwitz DJ, Futrell JW. The salutary effects of the bed on the survival of experimental flaps. *Ann Plast Surg.* 1985;14(1):64-73.

Kerrigan CL. Skin flap failure: Pathophysiology. *Plast Reconstr Surg.* 1983;72(6):766-77.

Kjartansson J, Lundeberg T, Samuelson UE, Dalsgaard CJ. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increases survival of ischaemic musculocutaneous flaps. *Acta Physiol Scand.* 1988a;134(1):95-9.

Kjartansson J, Lundeberg T, Samuelson UE, Dalsgaard CJ, Hedén P. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increase cutaneous blood flow in a musculocutaneous flap in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1988b;134(1):89-94.

Krag C, Taudorf U, Siim E, Bolund S. The effect of pulsed electromagnetic energy (diapulse<sup>®</sup>) on the survival of experimental skin flaps: a study on rats. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1979;13:377-80.

Kuo YR, Wu WS, Hsieh YL, Wang FS, Wang CT, Chiang YC, *et al.* Extracorporeal shock wave enhanced extended skin flap tissue survival via increase of topical blood perfusion and associated with suppression of tissue pro-inflammation. *J Surg Res.* 2007;143(2):385-92.

Kuprian W. Massage. In: Kuprian W, editor. *Physical therapy for sports.*

2<sup>nd</sup> ed. New York: W.B. Sanders Company; 1995. p4.

Leite MT, Gomes HFC, Percário S, Russo CRA, Ferreira LM. Dimethyl sulfoxide as a block to the deleterious effect of nicotine in a random skin flap in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120:1819-22.

Leite VL, Douat ESV, Parizotto NA, Gouvea CM. Effect of 16 and 100 Hz pulse modulated 1 MHz therapeutic ultrasound in rat tibia healing after osteotomy. *Proceedings of the 14<sup>th</sup> Congress of the World Confederation for Physical Therapy*; 2003; Barcelona, Spain.

Liebano RE, Ablá LEF, Ferreira LM. Effects of high frequency transcutaneous nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2006;21(3):133-8.

Liebano RE, Ablá LEF, Ferreira LM. Effect of low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on the viability of ischemic skin flaps in the rat: An amplitude study. *Wound Rep Reg.* 2008;16(1):65-9.

Liebano RE, Ferreira LM, Sabino Neto M. The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on the viability of random skin flaps in rats. *Can J Plast Surg.* 2002;10(4):151-4.

Liebano RE, Ferreira LM, Sabino Neto M. Experimental model for transcutaneous electrical nerve stimulation on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2003;18:54-9.

Livaoğlu M, Kerimoğlu S, Sönmez B, Livaoğlu A, Karaçal N. The effect of Hirudoid on random skin-flap survival in rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. Forthcoming, 2009.

Low J, Reed A. Therapeutic ultrasound. In: Low J, Reed A, editor. *Electrotherapy explained: Principles and practice*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2000.172-211p.

McDiarmid T, Burns PN. Clinical applications of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. 1987;73(4):155-62.

McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg*. 1965;35:177-82.

Mendonça AC. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Acta Ortop Bras*. 2006;14(3):152-7.

Mizrahi N, Seliktar D, Kimmel E. Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33(11):1818-29.

Morhenn VB. Firm stroking of human skin leads to vasodilatation possibly due to the release of substance P. *J Dermatol Sci*. 2000;22:138-44.

Mortimer AJ, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med Biol*. 1988;14:499-506.

Niina Y, Ikeda K, Iwa M, Shakita M. Effects of electroacupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation on survival of musculocutaneous flap in rats. *Am J Chin Med.* 1997;25(3):273-80.

Noble JG, Lee V, Griffith-Noble F. Therapeutic ultrasound: The effects upon cutaneous blood flow in humans. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33:279-85.

O'Brien Junior WD. Ultrasound – biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93:212-55.

Pazoki-Toroudi H, Ajami M, Habibey R, Hajiaboli E, Firooz A. The effect of enalapril on skin flap viability is independent of angiotensin II AT1 receptors. *Ann Plast Surg* 2009;62: 699-702.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Helium-Neon laser in viability of random skin flap in rats. *Lasers Surg Med.* 2005;37(1):74-7.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Enokihara MMMSS, Lippert R, Gobbato RC, *et al.* Effect of Low-Level Laser Therapy on mast cells in viability of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:337-43.

Poltawski L, Watson T. Relative transmissivity of ultrasound coupling agents commonly used by therapists in the UK. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33(1):120-8.

Prado RP, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE, Ferreira LM.

Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2006;21(4):258-62.

Prado RP, Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Effect of application site of low-level laser therapy in random cutaneous flap viability in rats. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:411-6.

Robinson SE, Buono MJ. Effect of continuous-wave ultrasound on blood flow in skeletal muscle. *Phys Ther.* 1995;75(2):145-50.

Roustaei N, Masoumi SJ, Chalian M, Chalian H, Bakhshandeh H. Safety of ultrasound-assisted liposuction: A survey of 660 operations. *Aesth Plast Surg.* 2009; 33:213–8.

Russel WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. England: Universities Federation for Animal Welfare, 1992.

Russo CRA, Leite MT, Gomes HC, Ferreira LM. Transcutaneous electrical nerve stimulation in viability of a random skin flap in nicotine-treated rats. *Ann Plast Surg.* 2006;57(6):670-2.

Salmi A.M, Hong C, Futrell J.W. Preoperative cooling and warming of the donor site increase survival of skin flaps by the mechanism of ischemic preconditioning: an experimental study in rats. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg.* 1999;33(2):163-7.

Sarifakioglu N, Gokrem S, Ates L, Akbuga UB, Aslan G. The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study.

Br J Plast Surg. 2004; 57: 769-72.

Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg*. 1980;65(2):152-8.

Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras*. 2004;19(4):441-7.

Shalom A, Friedman T, Westreich M. Effect of aspirin and heparin on random skin flap survival in rats. *Dermatol surg*. 2008;34:785-90.

Siegel S, Castellan JR. *Nonparametric statistics*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 1988. 399p.

Silver FH, Siperko LM, Seehra GP. Mechanobiology of force transduction in dermal tissue. *Skin Res Technol* 2003;9:3-23.

Smith RJ, Birndorf M, Gluck G, Hammond D, Moore WD. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(2):306-10.

Suchkova VN, Baggs RB, Sahni SK, Francis CW. Ultrasound improves tissue perfusion in ischemic tissue through a nitric oxide dependent mechanism. *Thromb Haemost*. 2002;88:865-70.

Sugita Y, Mizuno S, Nakayama N, Iwaki T, Murakami E, Wang Z, *et al*. Nitric oxide generation directly responds to ultrasound exposure. *Ultrasound Med Biol*. 2008;34:487-93.

Tacani PM, Costa MS, Silveira TS, Gomes HFC, Liebano RE, Ferreira LM. Ultra-som pulsado na angiogênese do retalho musculocutâneo transverso do reto do abdome (TRAM), em ratos. Anais do III Congresso Brasileiro de Fisioterapia em Cancerologia; 2008; Rio de Janeiro, Brasil. Fisioter Brasil. 2008; 1(suppl): 39.

Tacani RE, Cervera L. Técnicas manuais. In: De Maio M, editor. Tratado de Medicina Estética. São Paulo:Roca; 2004.1881-918p.

Tacani RE, Gimenes RO, Alegrance FC, Assumpção JD. Investigação do encaminhamento médico a tratamentos fisioterapêuticos de pacientes submetidos à lipoaspiração. Mundo Saúde. 2005;29(2):192-8.

Toutain CE, Brouchet L, Raymond-Letron I, Vicendo P, Bergès H, Favre J, *et al.* Prevention of skin flap necrosis by estradiol involves reperfusion of a protected vascular network. Circ Res. 2009;104;245-54.

Tsai JW, Ayubi FS, Hart KL, Baur DA, Parham MA, Moon JK, *et al.* Evaluation of the effect of sildenafil and vascular endothelium growth factor combination treatment on skin flap survival in rats. Aesth Plast Surg. 2008;32:624-31.

Tufan H, Zaki BM, Tecder-Ünal M, Erdem R, Take G. Angiotensin II captopril cotreatment augments angiogenesis in abdominal skin flap in rats. Ann Plast Surg. 2007;58(4):441-8.

Ugland O. Flaps and flap necrosis. Improving the circulation in skin flaps with complamin<sup>®</sup> and with dicoumarol: Animal experiments.

Acta Chir Scand.1966;131:408-12.

Ulusoy MG, Uysal M, Koçer U, Karaaslan O, Cuzdan SS, Ayyıldız A, *et al.* Improved flap viability with site-specific delivery of sildenafil citrate using fibrin glue. *Ann Plast Surg.* 2005;55(3):292-6.

Valentini EA, Maciel CD, Parizotto NA. Importância da conformidade dos equipamentos de ultra-som terapêutico com a NBR-IEC 1689. *Fisioter Bras.* 2006;7(1):59-65.

Van der Windt DAWM, van der Heijden GJMG, van den Bergc SGM, ter Rietd G, de Wintera AF, Boutera LM. Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: A systematic review. *Pain.* 1999;81(3):257-71.

Watson J, Fodor PB, Cutcliffe B, Sayah D, Shaw W. Physiological effects of endermologie®: A preliminary report. *Aesthetic Plast Surg.* 1999;19(1):39-45.

Weaver SL, Demchak TJ, Stone MB, Brucker JB, Burr PO. Effect of transducer velocity on intramuscular temperature during a 1 MHz ultrasound treatment. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2006;36(5):320-5.

Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB. The role of ultrasound-induced cavitation in the in vitro stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. *Ultrasonics.*1980;18(1):33-7.

Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics.* 1990a;28(3):175-80.



Young SR, Dyson M. Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 1990b;16:809-16.

Young SR, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. *Ultrasound Med Biol.* 1990c;16:261-9.

Yu RA, Brumini C, Esteves Junior I, Ferreira LM, Liebano RE. Magnesium sulphate given topically by iontophoresis for viability of random skin flaps in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2009;43(4):197-200.

Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, *et al.* Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121:59-69.

**NORMAS ADOTADAS**

## NORMAS ADOTADAS

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). [Homepage da internet]. Princípios éticos da experimentação animal. [Última visita em 10 Setembro 2009]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br>.

DeCS. Descritores em Ciências da Saúde. [Última visita em 11 Setembro 2009]. Disponível em: <http://www.decs.bvs.br>.

Ferreira LM. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses. 1ª ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora; 2008.

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE - Nomina anatômica veterinária. 3.ed. New York: Ithaca; 1983. 216p.

NLM (National Library of Medicine). International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to

biomedical journals: Sample references. [Última visita em 21 Setembro 2009]. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/>.

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001. 248p.

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

**Introduction:** Skin flaps play a key role in Plastic Surgery and one of the complications with more difficult solution is necrosis, leading to a surge of researches with both physical and pharmacologic agents, in an attempt to improve the vascular response of these flaps. **Objective:** Evaluating ultrasound in the viability and angiogenesis of the random skin flaps, in rats. **Methods:** In 60 *Wistar* EPM-1 rats dorsal skin flaps (10 x 4 cm) of the cranial base were lifted and they were randomly assigned to four groups, as follows: Control – only skin flaps, Simulated – simulation of ultrasound application with the device turned off, Group 16 Hz – 3 MHz ultrasound, pulsed at 20%, 0.2 W/cm<sup>2</sup> (SATA) and Pulse Repetition Rate (PRR) of 16 Hz, and Group 100 Hz – ultrasound with the same parameters and a 100 Hz PRR applied for 3 consecutive days. The percentage of necrosis was assessed at the 7<sup>th</sup> day and four samples of skin were collected from each flap to determine the vascular density. **Results:** The percentage of necrosis was 42.18±13.5% GC, 18.58±13.1% GS, 13.47±10.6% 16 Hz and 15.42±7.6% 100 Hz with significant difference between the control and the other groups (p < 0.001). The vascular density was 5,56±5,81% Control, 6,72±5,9% Simulated, 22,11±10,96% 16 Hz, and 25,18±13,32% 100 Hz with significant difference among the treated groups compared with control and simulated groups (p<0.001). Significant differences were not seen within the treated groups. **Conclusion:** The ultrasound increased angiogenesis, and both ultrasound and its simulation increased the random skin flap viability in rats.

**APÊNDICES**

## APÊNDICE 1 – Projeto Piloto.

O projeto piloto teve como objetivo averiguar a densidade de potência mais adequada para este experimento.

Para isso, foram necessários 4 grupos com 3 animais cada, os quais foram submetidos ao mesmo procedimento operatório (retalho cutâneo randômico de base cranial 10 x 4 cm) e à aplicação de US 3MHz, pulsado com ciclo de trabalho de 20%, frequência de repetição de pulso de 100 Hz, aplicado na base cranial do retalho em uma área de 3 x 4 cm, subdividida em duas áreas de 6 cm<sup>2</sup> durante 12 minutos em cada lado, iniciando pelo direito e, depois o esquerdo.

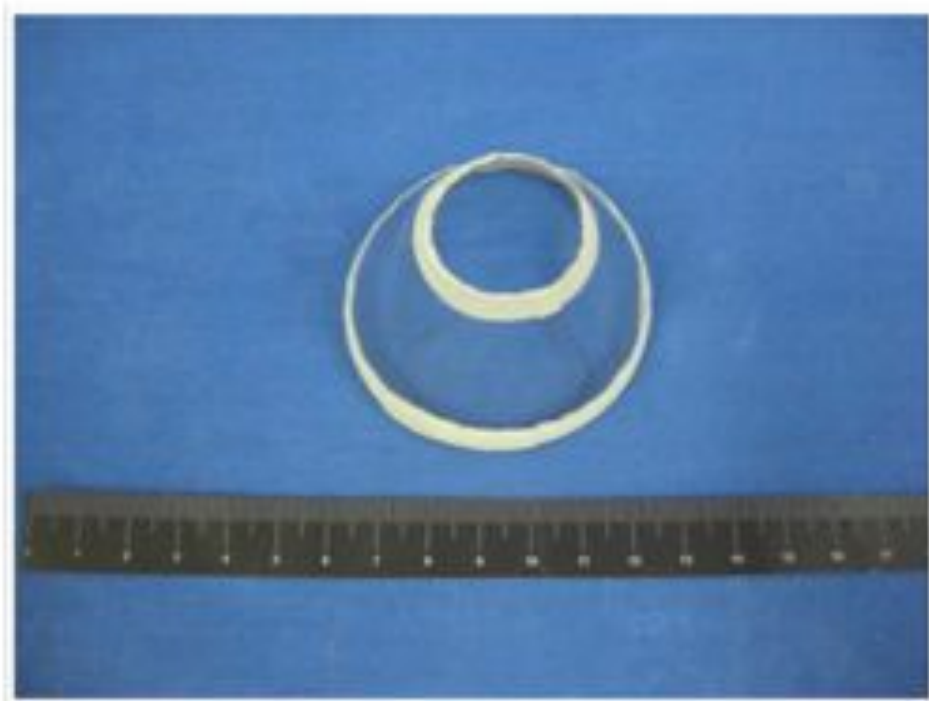
Cada grupo recebeu uma densidade de potência diferente, sendo o G1: 0,5 W/cm<sup>2</sup>; G2: 1 W/cm<sup>2</sup>; G3: 1,5 W/cm<sup>2</sup> e G4: 2 W/cm<sup>2</sup> (SATP). No sétimo pós-operatório foi realizada a determinação da porcentagem da área de necrose pelo método de gabarito de papel (SASAKI & PANG, 1980), por dois avaliadores que desconheciam a qual grupo pertenciam os animais (avaliador 1 – AV1 e avaliador 2 – AV2). Em seguida, os dados dos avaliadores foram comparados pelo teste de *Wilcoxon* para verificar se houve diferença entre eles, considerando  $p < 0,05$ .

Pelos resultados, não foram observadas diferenças significantes entre os avaliadores e a densidade de potência de 1 W/cm<sup>2</sup> foi a que apresentou a menor porcentagem de necrose dentre as demais, sendo esta a densidade de potência estabelecida para ser utilizada nos grupos da tese.



Tabela 4- Porcentagem de necrose dos grupos do piloto. Comparação interavaliadores (*Wilcoxon*):

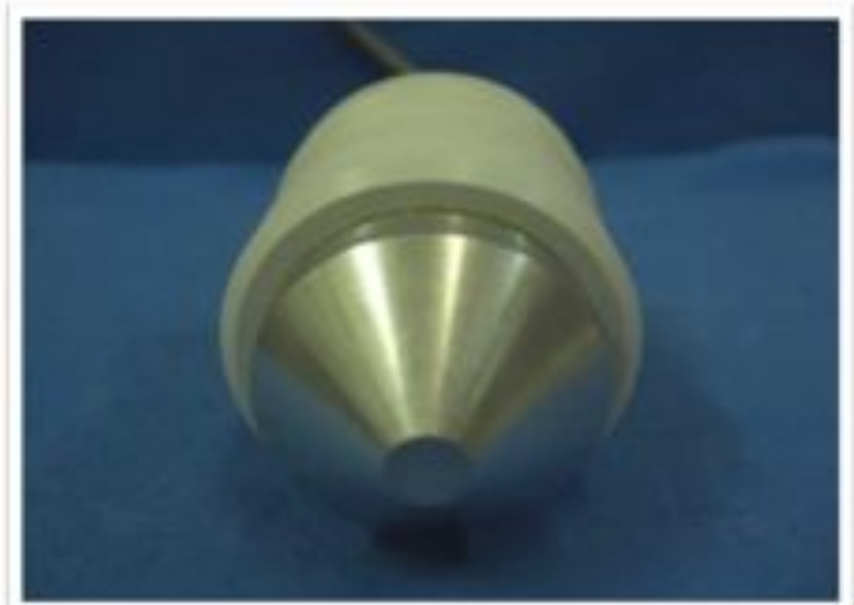
<i>Grupos Ultra-som</i>	<i>Médias da porcentagem de necrose</i>		<i>Wilcoxon (p &lt; 0,05)</i>
	<i>AV 1</i>	<i>AV 2</i>	
Grupo US 0,5 W/cm <sup>2</sup>	13%	13%	p = 0,6547
Grupo US 1,0 W/cm <sup>2</sup>	8%	7%	p = 0,6547
Grupo US 1,5 W/cm <sup>2</sup>	17%	17%	p = 0,5930
Grupo US 2,0 W/cm <sup>2</sup>	14%	13%	p = 0,3173

**APÊNDICE 2 – Colar cervical.**

Colar cervical utilizado para evitar autofagia.

**APÊNDICE 3 – Equipamento utilizado na pesquisa.**

Equipamento de US de 3 MHz SONACEL *Expert*<sup>®</sup>.



Transdutor com ERA de 0,5 cm<sup>2</sup>.

**ANEXOS**

## Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisas  
Hospital São Paulo

São Paulo, 3 de agosto de 2007  
**CEP 1131/07**

Ilmo(a) Sr(a)  
Pesquisador(a) PASCALÉ MUTTI TACANI  
Co-Investigadores: Heitor Gomes de Carvalho, Richard Elio Lievano, Lydia Masako Ferreira  
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref. Projeto de pesquisa intitulado: "Ultra-som pulsado com frequência de repetição de pulso a 100Hz e 16Hz na viabilidade de retalho cutâneo randômico no rato".

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Estudo experimental crônico em ratos.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** não se aplica.

**OBJETIVOS:** Analisar o efeito do ultra-som pulsado com frequência de repetição de pulso de 100Hz e 16Hz na viabilidade de retalho cutâneo randômico, no rato.

**RESUMO:** Amostra será composta por 60 ratos machosistar - EPM, 300g, mantidos de acordo com as normas do COBEA, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 15 ratos cada, submetidos ao procedimento operatório de retalho cutâneo dorsal randômico, submetidos à aplicação de ultra-som desde pós-operatório imediato até o 3ºPO. A forma de aplicação do ultra-som será direta, com movimentos lentos do transdutor, com as seguintes características 3MHz, pulsado, ciclo de trabalho a 20%, um grupo com frequência de repetição de pulso a 100Hz e outro a 16Hz, intensidades deverão ser definidas com o projeto piloto; um grupo simulação placebo e outro grupo controle. Quanto ao projeto piloto serão necessários 4 grupos com 3 ratos em cada, totalizando 12 animais para definição da melhor dose a ser usada. Logo após o procedimento cirúrgico, os animais receberão 5mg/kg/dia de cloridrato de tramadol, inclusive os do piloto. No 7º dia PO será feita a determinação da porcentagem de necrose por gabarito de papel (dois avaliadores cegos) e colhidas amostras de pele do retalho para análises histológicas e imunohistoquímicas com os animais anestesiados. Em seguida, será feita a eutanásia por overdose de anestésico. Análise estatística teste de Wilcoxon e Kruskal-Wallis.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** estabelecer efetiva atuação dos parâmetros frequência de repetição de pulso, ciclo de trabalho e intensidade sobre a ação do US em retalhos cutâneos randômicos experimental.

**MATERIAL E MÉTODO:** descritos os procedimentos que serão realizados por equipe especializada.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** sem financiamento específico.

**CRONOGRAMA:** 12 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Mestrado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 2/8/2008 e 2/8/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina


Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

## Anexo 2 – Laudo de Conformidade do Produto (LCP) Bioset.

	<p align="center"><b>Laudo de Conformidade do Produto</b></p>	<p align="center"><b>LCP</b></p>
<p align="center"><b>Declaração</b></p>		
<p>Vimos por meio deste, declarar, de acordo com os Registros da Qualidade gerados durante o processo de fabricação, que o aparelho: <i>S.1070 - SONACEL Expert 3,0MHz</i>, n.º série: <i>0403001</i>, está em conformidade com os parâmetros exigidos pela norma NBR IEC 60601-1. Em especial, o aparelho possui uma Área Efetiva de Radiação (ERA) de 0,5cm<sup>2</sup> do cabeçote.</p>		
<p>Segue abaixo a relação de testes exigidos por norma:</p>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Funcionamento do aparelho;</li> <li>- Aterramento de proteção;</li> <li>- Corrente de fuga e correntes auxiliares através do paciente</li> <li>- Rigidez dielétrica</li> </ul>		
<p>Informamos também que o aparelho foi calibrado, utilizando-se dispositivos de medição e balança Ultrasound Power Meter – Model UPM-DT10, devidamente calibrados e rastreados.</p>		
<p>Sem mais para o momento, subscrevemo-nos.</p>		
<p>Atenciosamente,</p>		
		
<p align="center"><i>Ronivaldo Augusto Damacchi</i> Produção</p>	<p align="center"> Garantia da Qualidade</p>	
<p align="center"><u>03 / 2007</u> Data (mm/aaaa)</p>	<p align="center"><u>03 / 2007</u> Data (mm/aaaa)</p>	

### Anexo 3 – Tabela de calibração do equipamento de US Bioset.



RIO CLARO, 13 DE JUNHO DE 2007.

Tabela de calibração de cabeçote reduzido tipo cone com diâmetro de 0,8 cm.

$$A = \pi r^2 = 3,147.(0,4)^2 = 3,140,16 = 0,5\text{cm}^2$$

$$ERA = 0,5\text{cm}^2$$

Intens(W/cm <sup>2</sup> )	ERA 3,5W/cm <sup>2</sup>	Reduzido Cabeçote 0,5W/cm <sup>2</sup>
0,10	0,35	0,10
0,20	0,70	0,20
0,30	1,05	0,30
0,40	1,40	0,40
0,50	1,75	0,50
0,60	2,10	0,60
0,70	2,45	0,70
0,80	2,80	0,80
0,90	3,15	0,90
1,00	3,50	1,00
1,10	3,85	1,10
1,20	4,20	1,20
1,30	4,55	1,30
1,40	4,90	1,40
1,50	5,25	1,50
1,60	5,60	1,60
1,70	5,95	1,70
1,80	6,30	1,80
1,90	6,65	1,90
2,00	7,00	2,00

Lisvaldo Barros

BIOSSET Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda. - Av. 55, n.º1212 - Jardim Kennedy - Rio Claro - SP  
 Cx. Postal 95 - CEP 13501-540 - Fone/Fax: (0xx19) 3534-2692 e 3534-8219 Ramal 28  
 Email:assistencia@biosset.com.br - hotmail: assistenciabiosset@hotmail.com  
 site: [www.biosset.com.br](http://www.biosset.com.br)



## **FONTES CONSULTADAS**

## FONTES CONSULTADAS

Cameron MH. Physical agents in rehabilitation. 2<sup>nd</sup> ed. California: Saunders; 2006. 185-217p.

Ferreira LM. Manual de cirurgia plástica. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu; 1995. Capítulo 20, Retalhos Cutâneos; p. 545-62.

Barbosa MVJ, Keira SM, Ferreira LM, Nahas FX. Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar. Cirurgia Plástica. 1<sup>a</sup> ed. Barueri: Manole; 2007. Capítulo 18, Retalhos cutâneos; p. 149-154.

Blakiston. Dicionário Médico. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: ANDREI; 1987.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de Pesquisa. Acta Cir Bras. 2005;20(Suppl 2):2-9.

Houaiss A. Dicionário da Língua Portuguesa. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Moderna; 2004.

Michaelis. Dicionário inglês-português. 38<sup>a</sup> ed. São Paulo: Melhoramentos; 2002.

Oxford Escolar. Dicionário inglês-português. 11<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 2004.

Pellizzon RF, Población DA, Goldenberg S. Pesquisa na área da saúde: Seleção das principais fontes para acesso à literatura científica. Acta Cir Bras. 2003;18(6):493-6.

Siegel S, Castellan JR. Nonparametric statistics. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 1988. 399p.

Young S. Terapia com Ultra-som. In: Kitchen S, Bazin S, editors. Eletroterapia: prática baseada em evidências. 11<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole; 2003. 211p.