

**Artigo original**

# A utilização da insulina em fonoforese no tratamento de úlceras diabéticas

## *The use of insulin in phonophoresis in the treatment of diabetic ulcers*

Maria José Misael da Silva Morsoleto, D.Sc.\*, Lia Mara Grosso Neves, M.Sc.\*, Priscila Silenci\*\*,  
Luiz Paulo Gomes Rosa Milares\*\*

.....  
*\*Docente do curso de fisioterapia da Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS, \*\*Discentes do curso de fisioterapia da Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS*

### Resumo

Diabetes melito é um grupo de desordens metabólicas, com uma característica em comum, a hiperglicemia, causando feridas e uma anormal cicatrização. A eletroestimulação é eficaz neste tratamento, ativando macrófago, fibroblasto e colágeno, além de ter ação vasodilatadora capilar. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos do ultrassom associado à insulina no processo de cicatrização de animais diabéticos induzidos. Foram utilizadas 20 ratas fêmeas adultas da linhagem Wistar induzidas à diabetes por injeção endovenosa de aloxana (Dioxiuracio monohidrato). Os animais foram divididos em: Grupo Controle (GC) e Grupo Experimental (GE), os grupos sofreram uma lesão no músculo tibial anterior da pata traseira direita. Após a lesão, o GC recebeu o tratamento conservador, somente de gel carbopol, e o GE recebeu tratamento de gel de carbopol com insulina em fonoforese. O protocolo consistiu de ultrassom de cabeçote reduzido com área efetiva de radiação (ERA) de 0,6 cm<sup>2</sup> com intensidade de 0,4 W/cm<sup>2</sup>, frequência de 1 Mhz, modo contínuo e aplicação de um minuto, durante 5 sessões. Conclui-se, portanto, que a insulina associada à fonoforese atua na redução das agressões teciduais causadas por atividade oxidativa excessiva, gerada na resposta inflamatória.

**Palavras-chave:** insulina, fonoforese, cicatrização, diabetes.

### Abstract

Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders with a common characteristic, hyperglycemia, causing wounds and abnormal wound healing. The electrical stimulation is effective in this treatment, activating macrophages, fibroblasts and collagen, in addition to capillary vasodilator. The aim of this work was to verify the effects of ultrasound associated with insulin in the healing of induced diabetic animals. We used 20 adult female rats of the Wistar strain with induced diabetes by intravenous injection of alloxan (dioxuracio monohydrate). The animals were divided into control group (CG) and experimental group (EG), the groups suffered an injury in the tibialis anterior muscle of the right hind paw. After the injury the CG received conservative treatment only with carbopol gel and EG received treatment carbopol gel with insulin in phonophoresis. The protocol consisted of head ultrasound small probe with effective radiation area (ERA) 0.6 cm<sup>2</sup> with an intensity of 0.4 W/cm<sup>2</sup>, frequency of 1 MHz, continuous mode and applying a minute for 5 sessions. It is concluded, therefore, that phonophoresis associated with insulin acts to reduce damaged tissue caused by excessive oxidative activity generated in the inflammatory response.

**Key-words:** insulin, phonophoresis, wounds, healing, diabetes.

Recebido em 15 de agosto de 2013; aceito em 17 de setembro de 2014.

**Endereço para correspondência:** Luiz Paulo Gomes Rosa Milares, Rua 4, nº 3419, Jardim Portugal, 13504-113 Rio Claro SP

## Introdução

A eletroterapia é um dos elementos fundamentais para a prática da fisioterapia [1]. O ultrassom terapêutico (UST) é um destes elementos, que utiliza uma forma de energia mecânica transmitida através de tecidos biológicos [2]. Na prática fisioterápica o UST é utilizado para tratar lesões de tecidos moles, acelerar a reparação da ferida e aumentar a fase de reparo [3-5]. No tratamento de ferida cutânea o UST estimula a neoangiogênese, a formação de tecido de granulação e a produção de fibroblasto, favorecendo a liberação de histamina, mastócitos e macrófagos durante a fase inflamatória [6]. O ultrassom ainda pode promover a síntese de colágeno, relacionada com a quantidade do mesmo e arranjo ou alinhamento do colágeno no leito da ferida, favorecendo, assim, o remodelamento tecidual [7].

O processo de reparação tecidual é dividido de modo geral, em três fases, de limites não muito distintos, a fase de inflamação, formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e remodelação [8-9]. A terapia com ultrassom pode afetar cada uma dessas fases, resultando em uma aceleração da cicatrização, portanto o uso da eletroestimulação em úlceras é comprovado, pois as ondas ultrassônicas podem produzir uma ação mecânica vibratória em âmbito celular.

Dentre as várias formas de aplicação do UST, a fonoforese ou sonoforese é uma das técnicas que vem ganhando amplo espaço na terapêutica não invasiva, pois aumenta os efeitos dos agentes farmacológicos, utilizando energia ultrassônica [10].

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas, que se caracteriza por hiperglicemia crônica, resultante dos defeitos da secreção da insulina, ação, ou ambos [11]. Associada ainda à intolerância à glicose, hipertensão, dislipidemia, estado pró-coagulante e aumento de doença vascular [12]. As feridas crônicas tipicamente cicatrizam com lentidão na população diabética, pelo fato de ocorrer um retardo da resposta inflamatória e redução na formação do tecido de granulação [13], uma vez que a produção do tecido de granulação depende da insulina, uma quantidade insuficiente deste hormônio gera um atraso na formação desse tecido.

Devido ao desenvolvimento evolutivo da patologia diabética, a ferida cutânea possui evolução insidiosa, é refratária a diversos tipos de tratamentos e decorre de condição predisponível, que dificulta a normal cicatrização do tecido cutâneo.

Este estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos da insulina em fonoforese no processo de reparo do músculo tibial anterior em ratos.

## Material e métodos

Este é um estudo experimental controlado e foi realizado no laboratório de Biologia Celular, do departamento de Biomedicina da Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para utilização

animal da Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS sob o parecer nº 059/2010.

## Animais de experimentação

Para este experimento, foram utilizados 20 ratos (*Rattus Norvegicus Wistar*), fêmeas, sadias, sedentárias, com 90 dias de idade, com peso corporal de  $175 \pm 10$  g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS, mantidos em gaiolas de polietileno padrão, sob condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22°C e ambiente higienizado), recebendo ração própria comum e água ad libitum.

## Grupos experimentais

Os animais foram devidamente pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos (n = 10):

- Grupo 1 – (GC) Grupo Controle – animais diabéticos, lesados e tratados com ultrassom e gel de carbopol.
- Grupo 2 – (GE) Grupo Experimental – animais diabéticos, lesados e tratados com ultrassom e gel de carbopol + insulina em fonoforese.

## Modelo experimental de diabetes

Para a realização da indução a diabetes, os animais ficaram 24 horas em jejum, após isto os animais foram submetidos à injeção endovenosa na região peritoneal de aloxana para indução de diabetes melito (*5,6 Dioxiuracil Monohidrato*) [14].

Após a injeção de aloxana, os animais receberam glicose 10% durante 24 horas, a fim de se evitar hipoglicemia e hiperinsulinemia. O sucesso do protocolo foi testado através dos valores glicêmicos, fazendo um leve corte na extremidade da cauda dos animais. Os valores normais da glicemia, em ratos, variam entre 47,7 a 107 mg/dl [15]. Com isso, foram considerados diabéticos os animais que atingiram níveis de glicemia  $\geq 110$  mg/dl.

## A lesão

Os animais foram pesados e anestesiados com Ketamina (0,3 mL)/Xilazina (0,1 mL) e sofreram tricotomia da pata tra-seira direita. A pele foi seccionada e o músculo tibial anterior (TA) e sua fâscia foram expostos. Nestes animais foram feitos um corte de 3 mm de largura por 3 mm de profundidade com auxílio da lâmina de bisturi, de maneira a seccionar as fibras transversalmente no terço médio do músculo [6]. Realizou-se a sutura com fio cirúrgico somente do tecido cutâneo a fim de preservar a lesão muscular. Foi realizada a assepsia no local com álcool 70%, logo no pós-operatório imediato, os animais receberam paracetamol ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) nas primeiras 24h após o procedimento cirúrgico.

## O tratamento

O tratamento consistiu de ultrassom de cabeçote reduzido com área efetiva de radiação (ERA) de 0,6 cm<sup>2</sup>, intensidade de 0,4 W/cm<sup>2</sup>, frequência de 1 Mhz, modo contínuo e aplicação de um minuto.

As aplicações foram feitas por meio de massagem longitudinal, paralela, bem lenta, durante 5 sessões. No último dia de tratamento foi realizada a eutanásia dos animais e a coleta dos materiais para posterior análise.

## Processamento das amostras e eutanásia dos animais

Ao término do período experimental, os animais foram pesados e anestesiados e, em seguida, submetidos à técnica de punção cardíaca. O músculo tibial anterior foi utilizado para a confecção das lâminas histológicas. Para isso, os tecidos foram fixados em solução de formalina tamponada 10% por 24 horas e mais 24 horas em álcool 70%. Posteriormente, o material foi processado em parafina e embocado. Os cortes foram transversais seriados com 6 µm de espessura através de um micrótomo (Leica RM – 2145, Germany). As lâminas cortes foram coradas em: Hematoxilina-Eosina (HE) para análise descritiva. Além disso, foi realizada a análise bioquímica em relação ao estresse oxidativo pelo método de *Thiobarbituric Acid Reative Substances* (TBARS).

## Análise bioquímica

Para a realização das análises bioquímicas o tecido muscular foi realizado a medida das substâncias que reagem ao TBARS (*Thiobarbituric Acid Reative Substances*).

## Score de inflamação

Os aspectos histológicos observados foram tabulados para análise descritiva qualitativa, por 2 avaliadores treinados. Os cortes histológicos foram avaliados ao longo de toda sua extensão com um aumento de (100x). Para avaliação do infiltrado inflamatório, foram utilizados escores semiquantitativos, conforme abaixo:

1	Presença de inflamação discreta;
2	Infiltrado inflamatório de intensidade moderada;
3	Infiltrado inflamatório intenso.

## Resultados e discussão

### Análise descritiva das lâminas de HE

Os resultados foram obtidos através de análise qualitativa e semiquantitativa. No músculo dos animais do Grupo Con-

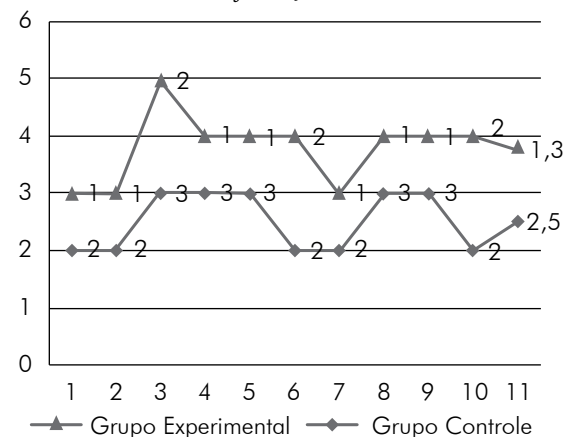
trole, submetidos à lesão, sacrificados com 5 dias após a lesão (L<sub>2</sub>) e tratados com gel de carbopol, o tecido conjuntivo ainda mostra alguns vasos sanguíneos e um infiltrado de células inflamatórias, porém, aparentemente, com mais fibroblastos e fibras colágenas, além de algumas células adiposas. Os cotos seccionados das fibras musculares começam a esboçar certa organização, porém ainda é possível observar fibras musculares necróticas sendo fagocitadas. Observa-se a fenda incisional relativamente limpa de restos necróticos, sendo invadida gradativamente por células inflamatórias.

O tecido analisado proveniente dos animais do Grupo Experimental, submetidos à lesão e tratados 5 dias seguidos com insulina em fonoforese, mostra fibras com microlesões. Podemos observar que o tecido muscular está se reorganizando. Isso é comprovado pela presença de vários miotubos com morfologia bem característica, porém com ausência de uma membrana plasmática (sarcolema) bem definida. Nesta fase pode ser observado que as fibras regeneradas apresentam-se de forma fragmentada. O tecido conjuntivo da região incisional apresenta-se rico em fibroblastos, fibras colágenas e células inflamatórias, em meio ao tecido muscular em fase de regeneração. Pouco tecido necrótico é observado nesta fase. Dentre as células mononucleares presentes, notam-se macrófagos, plasmócitos, linfócitos e células gigantes multinucleadas. Nesse tecido conjuntivo, são evidentes a presença de vasos sanguíneos e leitos vasculares, além de células infiltradas relacionadas a eles. Há presença de inúmeros miotubos, em diferentes fases de maturação, além de fibras já em estado avançado de regeneração, onde se observa fusão de suas membranas celulares. Entre as fibras musculares que estão se regenerando pode ser observada a organização e diferenciação de células satélites para dar origem a um miotubo.

## Score de inflamação

Nos grupos estudados, o Grupo Controle apresentou score 2 (n = 5) e score 3 (n = 5). O Grupo Experimental apresentou score 1 (n = 7) e score 2 (n = 3). O teste estatístico para este agrupamento foi o t-Student, p = 0,00048 (Gráfico 1).

Gráfico I - Grau de Inflamação.



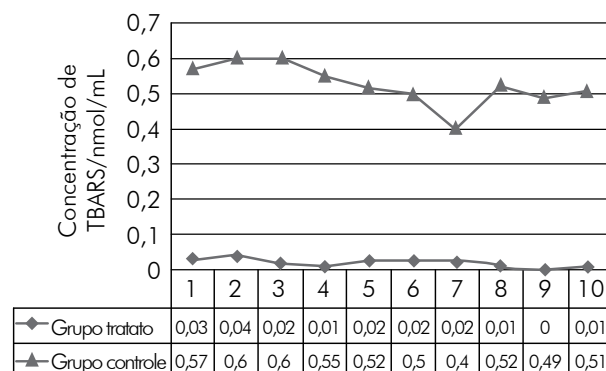
## Análise bioquímica

Para a análise sanguínea, foi utilizado o método de TBARS, que determina os produtos finais da lipoperoxidação. Foi avaliado o estresse oxidativo durante o processo inflamatório, estimando-se o dano celular no plasma sanguíneo dos animais do Grupo Controle (animais diabéticos e tratados com ultrassom convencional) e do Grupo Experimental (animais diabéticos e tratados com insulina em fonoforese). Como demonstrado houve uma diminuição significativa nos níveis de produtos finais no Grupo Experimental, quando comparado com a curva padrão do Grupo Controle (Figura 3).

O método de TBARS consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular). Determinação do óxido nítrico por método fluorimétrico: esta determinação é realizada de forma indireta, através da reação do composto não-fluorescente DAN (diaminonaftaleno) com um agente N-nitrosante derivado do NO, tendo como produto o composto altamente fluorescente NAT (2,3 naftotriazol). A quantificação do NAT por espectroscopia de fluorescência serve como indicador dos níveis de NO.

Foram diluídas 20µL de plasma em 4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,04 M). Adicionou-se 0,5 mL de ácido fosfotungstico 10%, aguardou-se 5 minutos e centrifugou-se a 3000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se novamente o sedimento em 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,04 M), seguido da adição de 0,3 mL de ácido fosfotungstico 10%. Após centrifugação a 3000 rpm, descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se outra vez o sedimento em 0,5 mL de H<sub>2</sub>O. A essa mistura foi adicionado 1 mL da solução reagente de ácido tio-barbitúrico, composta de ácido tio-barbitúrico 0,67% em ácido acético 50%. Incubou-se a mistura final em banho-maria (90°C) por 1 hora. Em seguida, esfriou-se em banho de gelo e efetuou-se a extração dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tio-barbitúrico) com 5 mL de butanol, agitando-se vigorosamente. Finalmente a medida da emissão da fluorescência da fase orgânica foi feita a 553 nm com excitação de 515 nm [16]. Para se calcular a concentração de TBARS, usou-se uma curva padrão de tetraetoxipropano. Os resultados foram expressos em nmol/mL de plasma.

**Gráfico II - Estresse oxidativo.**



## Discussão

A injeção de aloxana via intravenosa provocou nos animais um aumento da glicose, confirmando o estado diabético dos mesmos e caracterizando a hiperglicemia, induzindo o animal a um estado pró-inflamatório que inclui células inflamatórias e estresse oxidativo, tido como um dos mecanismos mais importantes na gênese do dano tecidual quando relacionado à hiperglicemia. Através deste mecanismo, o DM aumentaria a produção de espécies reativas do oxigênio em termos celulares, que pela sua toxicidade, seria capaz de promover o desenvolvimento das lesões diabéticas crônicas [17]. O aumento da hiperglicemia ocasiona um estresse celular que leva à diminuição das defesas antioxidantes intracelulares e ainda pode ocasionar um aumento na concentração dos produtos da glicosilação avançada, alterando assim a função celular. Não obstante, a hiperglicemia pode ainda ativar fatores de transcrição nuclear desencadeando um aumento na expressão de mediadores inflamatórios. A combinação desses mecanismos irá alterar a produção de oxidantes, causando estresse celular e o consequente dano estrutural [18]. No presente estudo, observou-se, através das análises bioquímicas, que houve uma redução da quantidade produtos de reações oxidativas quando implementada a inoculação tópica de insulina associada à fonoforese. Além disso, notou-se também uma redução da expressividade do infiltrado inflamatório, verificado pela diminuição do score de inflamação, pela análise semiquantitativa, a associação da insulina em fonoforese faz menção a uma melhora no índice de reparo nos animais do grupo experimental.

Em estudo realizado por Alfredo *et al.* [6], verificou-se o efeito do ultrassom de 1 MHz em fonoforese, utilizando-se da *arnica montana* sobre a fase inflamatória aguda de uma lesão cirúrgica muscular em ratos Wistar não diabéticos. A análise histológica revelou estágio mais avançado de regeneração nos tecidos dos grupos ultrassom no modo convencional e ultrassom em fonoforese com *arnica montana* igualmente. A similaridade de resultados entre estes grupos leva a concluir que a fonoforese com *arnica* apresentaram semelhança no processo inflamatório, sugerindo que ambos os modos tem utilização semelhante.

Contraditoriamente, em um estudo realizado por Ricoldy *et al.* [19], verificou-se o efeito do ultrassom em fonoforese, utilizando-se do gel de calêndula, e o grupo experimental tratado com o gel em fonoforese apresentou diminuição do tecido necrótico na fenda incisional, e atividade fagocitária maior, indicando que a utilização do ultrassom proporcionou aumento da atividade cicatricial do tecido, sugerindo-se que nos animais submetidos a essa insonação a fase de cicatrização é antecipada. Com relação à regeneração das fibras musculares, relativamente melhor em grupos tratados com ultrassom, alguns estudos descrevem que essa regeneração acelerada ocorre pelo aumento da atividade fagocitária local.

Em nossa pesquisa, observamos que os grupos que foram submetidos ao ultrassom em fonoforese apresentaram redução

da área lesionada, como foi comprovado pela estatística ( $p = 0,00048$ ). A utilização do ultrassom terapêutico foi efetivo na reparação muscular, aumentando a capacidade de reparo da lesão, a resistência local e o limite elástico das fibras tratadas. A associação do ultrassom com a insulina foi utilizada na recuperação de lesões de pele ou úlceras varicosas, pois na população diabética a falta do hormônio insulina, leva a um atraso do reparo.

Estes achados corroboram os dados encontrados em nossa pesquisa, em que a fase de cicatrização mediante a inflamação aguda parece ter sido antecipada, apesar da diferenciação do agente farmacológico utilizado, porém são escassos os trabalhos que tratam desta temática.

## Conclusão

Concluímos que o grupo tratado com ultrassom e insulina em fonoforese apresentou um processo de reparo mais eficiente, comparado ao grupo tratado convencionalmente com ultrassom e gel carbopol. Sugere-se que a insulina associada à fonoforese atue na redução das agressões teciduais causadas por atividade oxidativa excessiva, gerada na resposta inflamatória. Acelerando, assim, o processo de cicatrização da população insulino dependente.

## Referências

1. De Brito Vieira WH, Aguiar KA, Silva KM, Canela PM, Silva FS, Abreu BJ. Overview of ultrasound usage trends in orthopedic and sports physiotherapy. *Crit Ultrasound J* 2012;4(1):11-28.
2. Fávoro-Pípi E, Feitosa SM, Ribeiro DA, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, Renno ACM. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci* 2010;25:727-32.
3. John PS, Poulouse CS, George B. Therapeutic ultrasound in fracture healing: the mechanism of osteoinduction. *Indian J Orthop* 2008;42(4):444-47.
4. Pounder NM, Harrison AJ. Low intensity pulsed ultrasound for fracture healing: a review of the clinical evidence and the associated biological mechanism of action. *Ultrasonics* 2008;48(4):330-38.
5. Montalti CS, Souza NV, Rodrigues NC, Fernandes KR, Toma RL, Renno AC. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on injured skeletal muscle. *Braz J Phys Ther* 2013;17(4):343-50.
6. Alfredo PP, Anaruma CA, Pião ACS, João SMA, Casarotto RA. Análise quantitativa dos efeitos da sonoforese com arnica montana sobre o processo inflamatório agudo do músculo esquelético de ratos. *Fisioter Pesqui* 2008;15(3):273-9.
7. Michlovitz SL, Davis FA. Thermal agents in rehabilitation. *J Athl Train* 1996;32(1):80-1.
8. Assis L, Moretti AI, Abrahão TB, Cury V, Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg Med* 2012;44(9):726-35.
9. Assis L, Moretti AI, Abrahão TB, de Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci* 2013;28(3):947-55.
10. Silveira PCL, Victor EG, Scheffer D, Silva LA, Streck EL, Paula MM, et al. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound Med Biol* 2010;36:44-50.
11. Patrocínio-Silva TL, Souza AM, Goulart RL, Pegorari CF, Oliveira JR, Fernandes K, et al. The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats. *Lasers Med Sci* 2014;29(4):1357-64.
12. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res* 2006;85(1):15-21.
13. Pavletic MM. Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. 3a ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2010.
14. Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini SA, Padovani CR. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cir Bras* 2003;18(2):132-42.
15. Zanoello AM, Melazzo-Mazzanti C, Kerpel-Gindri J, Filappi A, Prestes D, Cecim M. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra diabetes mellitus induzido por aloxana em ratos. *Acta Farm Bonaerense* 2002;21(1):33.
16. Alves AA. Marcadores de estresse oxidativo induzido pelo exercício físico e tecnologia para sua quantificação [Tese]. Campinas: UNICAMP; 2002. p.24-25.
17. Spadella CT, Suarez OA, Lucchesi AN, Marques SF, Cataneo AJ. Effects of pancreas transplantation on oxidative stress in pulmonary tissue from alloxan-induced diabetic rats. *Transplant Proc* 2010;42(6):2087-91.
18. Forgiarini Junior LA, Kretzmann NA, Porawski MD, Simões AD, Marroni NAP. Estresse oxidativo e alterações estruturais pulmonares no diabetes mellitus experimental. *J Bras Pneumol* 2009;35(8):788-91.
19. Ricoldy DS, Botura ACA, Oda JY, Takemura OS. Efeito do ultrassom associado ao gel de calêndula sobre a atividade reparadora em lesões musculares experimentais. *Acta Scient Health Sci* 2010;32(2):135-40.