

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem em feridas cutâneas
de ratas desnutridas e desnutridas tratadas com dieta normoproteica

Silvia Belissa Ferrareto

2015

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SILVIA BELISSA FERRARETO

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
DE ALTA VOLTAGEM EM FERIDAS
CUTÂNEAS DE RATAS DESNUTRIDAS E
DESNUTRIDAS TRATADAS COM DIETA
NORMOPROTEICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Dosimetria e convalidação de recursos fisioterapêuticos

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Luiza Ozores Polacow

PIRACICABA
2015

Dedico este trabalho aos meus pais,
Dante (*in memoriam*) e Maria Helena, a
quem devo tudo que sou e o que
conquistei.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela força, coragem e anseio de seguir e alcançar meus objetivos e sonhos.

Aos meus pais, Dante (*in memoriam*) e Maria Helena, essenciais em minha vida, por serem a base de tudo, pela educação e amor recebidos, por todo apoio, confiança e incentivo nas minhas decisões.

Aos meus familiares, em especial tia Haines e tia Maria pelo apoio, conselhos, incentivos, e meus irmãos Fábio e Alex, por vibrarem sempre pelas minhas conquistas.

Ao meu namorado Paigý, pelo amor e carinho, pela companhia nessa caminhada e assistência em tantas horas.

Aos meus amigos, que sempre torcem por mim, em especial Cintia e Neliane, irmãs de alma, que caminham juntas comigo desde sempre, para sempre.

À Prof^a Dr^a Maria Luiza Ozores Polacow, pela brilhante orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, a quem tenho imensa admiração e a quem me espelharei em minha vida acadêmica.

À Rafaela Bertochi Ferreira pelo auxílio e dedicação durante todo o experimento e processamento dos dados.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva pela assistência em fases da pesquisa, com seu conhecimento único.

À Prof^a Dr^a Maria Imaculada de Lima Montebelo, pelo auxílio na análise dos dados.

À Prof^a Dr^a Elaine Caldeira de Oliveira Guirro por me iniciar na pesquisa científica e fazer encontrar meu caminho, a quem tenho enorme admiração, gratidão e apreço.

À Universidade Metodista de Piracicaba e a todos os colegas e funcionários que de alguma forma estiveram envolvidos e auxiliaram na realização dessa pesquisa, em especial à Patrícia Carla Paulino Belotto e à Sandra Helena Nazato Ubices pela colaboração e empenho em me ajudar, sempre que necessário.

À banca de qualificação e defesa: Prof^a Dr^a Rosana Macher Teodori, Prof^a Dr^a Adrienne Christine Palanch e Prof^a Dr^a Elaine Caldeira de Oliveira Guirro pela leitura cuidadosa e as importantes contribuições que engrandeceram o trabalho final.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROSUP) pela bolsa de estudos.

Ao chefe do Centro de Recuperação Físico-Funcional da Prefeitura de Capivari, Marcelo Toledo, pela compreensão com meus horários e atividades discentes, sem o qual não conseguiria concretizar esse sonho.

À todos, minha eterna gratidão. Muito obrigada.

“Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem,
você continuará vivendo, mas terá deixado de existir”

Charles Chaplin

RESUMO

A regeneração cutânea apresenta demanda significativa de processos e estruturas que dependem da disponibilidade de aminoácidos. A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) é um recurso extensamente estudado e ratificado como eficaz na cicatrização de feridas cutâneas, mas é desconhecido o mecanismo de regeneração cutânea sob intervenção terapêutica em rato desnutrido e o comportamento tecidual frente à recuperação nutricional. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da desnutrição na regeneração cutânea, da EEAV na desnutrição, bem como a associação com dieta normoproteica. Trinta e cinco ratos Wistar foram divididas igual e aleatoriamente em cinco grupos: Controle (C), Controle Tratado (CT), Desnutrido Controle (DC), Desnutrido Tratado (DT) Desnutrido Tratado em Recuperação (DTR). Os animais dos grupos DC, DT e DTR receberam dieta hipoproteica e os grupos C e CT dieta normoproteica, por 45 dias. Após esse período foi removido 1 cm² de pele na região interescapular e 24 horas depois iniciada EEAV (100 Hz; polo alternado diariamente, iniciando pelo negativo; limiar motor; 30 minutos/dia), aplicada sete dias consecutivos. No grupo DTR foi administrada dieta normoproteica durante esse período e os demais mantiveram as dietas iniciais. A massa corporal foi mensurada inicialmente e a cada sete dias. Foi analisada a área da ferida no pós-operatório (PO) imediato, 4° e 8° dias PO, e determinado o Índice de Cicatrização da Úlcera (ICU). No 8° dia, após eutanásia, amostras de pele foram processadas histologicamente para mensuração da re-epitelização, espessura da epiderme e derme, contagem de fibroblastos e leucócitos, densidade de área de vasos sanguíneos e análise da birrefringência das fibras colágenas. Houve redução significativa no ganho ponderal dos animais desnutridos em relação aos controles após 45 dias e após o fim do período de EEAV, inclusive no grupo DTR. Todos os grupos apresentaram redução na área da ferida ($p < 0,05$), porém o ICU não diferiu entre os grupos. Os grupos CT, DT e DTR apresentaram maior epitelização comparados ao C ($p < 0,05$), e a medida de “effect size” mostrou que a desnutrição produziu um efeito positivo na re-epitelização. Já a espessura do epitélio foi menor nos grupos DC e DT em relação à C e CT ($p < 0,05$) e o grupo DTR atingiu os valores de C e CT, apresentando espessura maior comparado ao DC ($p < 0,05$). Na derme, houve redução na espessura do grupo DC em relação aos controles ($p < 0,05$), enquanto DT e DTR mostraram valores equivalentes a estes. Os grupos DT e DTR apresentaram maior densidade de vasos comparados ao C ($p < 0,05$), e, em relação ao perfil numérico das células, a média dos leucócitos não foi diferente entre os grupos, e a de fibroblastos foi significativamente maior nos grupos CT e DTR em relação ao DC, resultado semelhante ao apresentado pela birrefringência das fibras colágenas. Pode-se concluir que a desnutrição influenciou negativamente na epitelização da ferida, assim como na derme, promovendo um tecido pouco estruturado. A aplicação de EEAV e intervenção nutricional minimizaram os efeitos da desnutrição no processo cicatricial, resultando em epiderme e derme histologicamente mais estruturadas.

Palavras-Chave: Desnutrição Proteica, Cicatrização de Feridas, Estimulação elétrica, Terapia Nutricional, Ratos.

ABSTRACT

The skin regeneration presents a significant demand of processes and structures that depend on the availability of amino acid. The high volt electrical stimulation (HVES) is an alternative widely studied and proved to be efficient in healing of skin ulcers, but the skin regeneration mechanism in therapeutic intervention in underfed rats and tissue behavior concerning nutritional recovery is unknown. The objective of this study was to analyze the effects of malnutrition in skin regeneration, the HVES on malnourished, as well as the association with a normoprotein diet. Thirty-five female Wistar rats were divided equally and randomly into 5 groups: control (C), treated control (TC), Malnourished Control (MC), Malnourished Treated (MT) Malnourished Treated in Recovery (MTR). The animal from groups MC, MT and MTR received hypoproteic diet and groups C and TC normoprotein diet, for 45 days. After this period, 1 cm² of skin was removed from the interscapular area, and 24 hours later, started HVES (100 Hz, daily alternating current, starting from the negative; motor threshold; 30 minutes/day), applied 7 consecutive days. In the MTR group, it was administrated a normoprotein diet during this period while the other groups remained with their initial diets. Body mass was measured initially and every 7 days. The wound areas from the postoperative (PO) were analyzed immediately, 4th day PO and 8th day PO, and determined the wound healing rate (WHR). On day 8, after euthanasia, skin samples were processed histologically for measurement of reepithelialization, thickness of the epidermis and dermis, fibroblasts and leukocytes count, blood vessel area density and analyses of the birefringence of collagen fibers. There was a significant reduction in weight gain in malnourished animals compared to controls after 45 days and after the HVES period, even in the MTR group. All groups showed a reduction in the wound area ($p < 0.05$), but the WHR did not alter between groups. The groups TC, MT, MTR had higher epithelization compared to C ($p < 0.05$), and the measurement of "effect size" showed that malnutrition had a positive effect on reepithelialization. However, the thickness of the epithelium was lower in MC and MT groups compared with C and TC ($p < 0.05$) and the MTR group reached C and TC values, with higher thickness compared to MC ($p < 0.05$). As for dermis, there was a reduction in the thickness of the MC group compared to controls ($p < 0.05$), while MT and MTR showed similar values to these. The MT and MTR groups showed higher density of vessels compared to C ($p < 0.05$), and compared to the cells profile number, the average of leukocytes was not different between the groups while fibroblasts average was significantly increased in TC and MTR groups comparing to MC, results similar to that presented by the birefringence of collagen fibers. It can be concluded that malnutrition negatively influenced the epithelialization of the wound, and the dermis as well, resulting in an unstructured tissue. The application of HVES and protein nutritional intervention minimized the effects of malnutrition during the healing process, resulting in epidermis and dermis histologically more structured.

Keywords: Protein Malnutrition, Wound Healing, Electric Stimulation, Nutrition Therapy, Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	19
3.2 AMOSTRA	19
3.3 DIETA EXPERIMENTAL	20
3.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA CORPORAL	21
3.5 INDUÇÃO DA FERIDA	22
3.6 INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA	23
3.7 ÁREA DA FERIDA	24
3.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	25
3.9 MENSURAÇÃO DA EPIDERME E DERME NA FERIDA	26
3.10 PERFIL NUMÉRICO DE LEUCÓCITOS E FIBRIBLASTOS	26
3.11 DENSIDADE DE ÁREA DE VASOS	27
3.12 BIRREFRINGÊNCIA DAS FIBRAS COLÁGENAS	27
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4 RESULTADOS	30
5 DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO 1	66

1 INTRODUÇÃO

A desnutrição é um problema de saúde pública mundial, com maior prevalência nos países em desenvolvimento, que acarreta complicações e altos níveis de mortalidade, estudados e documentados desde a década de 1970 (Onis, Frongillo e Blösner, 2000). A grande maioria das publicações geram índices de desnutrição relacionados à criança com menos de cinco anos de idade, devido à maior susceptibilidade às complicações graves e elevado risco de morte nessas condições (Ministério da Saúde, 2005). Entretanto, cerca de 842 milhões de pessoas no mundo apresentam algum tipo de desnutrição (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Outra situação bastante comum de desnutrição é dada pela hospitalização de pacientes, os quais podem apresentar a instalação do quadro com apenas cinco dias de internação, aumentando a prevalência progressivamente de acordo com o tempo de permanência, chegando a 83% em pacientes hospitalizados há mais de 15 dias (Rezende et al., 2004).

A literatura mostra que uma porcentagem baixa de pacientes passam por triagem de risco nutricional nas admissões hospitalares, assim como por uma avaliação nutricional detalhada. Além disso, apresentam-se situações de baixa frequência na documentação em prontuário da situação nutricional dos pacientes internados e baixa capacidade de diferenciação por parte dos profissionais de saúde (nutricionistas, médicos, estudantes de medicina) entre pacientes nutridos e desnutridos. Conseqüentemente, o que se tem é uma baixa aplicação de intervenção nutricional com dietas enterais e falta de acompanhamento nutricional durante o período de internação (Waitzberg,

Caiaffa e Correia, 2001; Rezende et al., 2004; Bavelaar et al., 2008; Gout, Barker e Crowe, 2009).

Apesar de se ter a avaliação e a terapia nutricional como ferramentas para a recuperação ou controle da desnutrição hospitalar, um estudo mostra que apenas 8,41% dos pacientes internados receberam terapia enteral, enquanto no grupo dos pacientes desnutridos 7,79% receberam essa indicação, sugerindo pouca atenção dos profissionais à um quadro secundário ao da intenção da internação. O baixo conhecimento do estado nutricional do paciente, mostra a reduzida consciência por parte dos profissionais da importância desse fator no estado de saúde geral (Waitzberg, Caieffe e Correia, 1999; Rezende et al., 2004).

A falta de intervenção nutricional para suprir as necessidades desses pacientes os direciona para a acentuação do quadro, leva à complicações clínicas e internações mais prolongadas e, conseqüentemente ao aumento na mortalidade (Waitzberg, Caieffe e Correia, 1999; Otero et al., 2002; Mello et al., 2003; Rezende et al., 2004).

A alta prevalência e o impacto negativo da desnutrição hospitalar tem sido amplamente estudado e apontado como realidade grave no Brasil, à medida que se tem meios padronizados e referenciados de reverter o quadro e, o mais importante, preveni-lo (Waitzberg, Caieffe e Correia, 1999; Waitzberg, Caiaffa e Correia, 2001; Mello et al., 2003; Rezende et al., 2004). A exemplo disso, o maior estudo epidemiológico realizado no país pelo Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar (Waitzberg, Caiaffa e Correia, 2001), aponta dados completos do cenário nacional. A média referenciada de hospitais públicos brasileiros revela prevalência de 48,1% de desnutrição

hospitalar, sendo 12,6% em desnutrição grave e 35,5% em desnutrição moderada.

A desnutrição hospitalar varia em níveis de acordo com a região estudada, sendo os estados norte e nordeste os de maiores índices, perfazendo juntos 63,9% (Waitzberg, Caiaffa e Correia, 2001). Um estudo mais recente, porém de menor porte, aponta prevalência de 63,11% de pacientes desnutridos em um hospital de referência em Salvador (Rezende et al., 2004).

A desnutrição hospitalar também é altamente prevalente em toda a América Latina, alcançando 50,2%, sendo 11,2% referentes à desnutrição grave (Correia e Campos, 2003). Índices menores são descritos para hospitais de países europeus (Edington et al., 2000; Pirlich et al., 2006; Bavelaar et al., 2008) e Austrália (Gout, Barker e Crowe, 2009), com cerca de 25%.

O fato da avaliação e intervenção nutricional não estarem sendo parte integrante e rotineira de um diagnóstico de saúde, mostra a falta de interdisciplinaridade de uma equipe multiprofissional, ou seja, de integralidade nos cuidados de saúde, que se faz estratégia ímpar para qualquer condição de atenção à saúde (Araújo e Rocha, 2007). Dessa forma, tem sido altamente recomendado que uma triagem nutricional seja adotada pelos hospitais, afim de reduzir as taxas de desnutrição hospitalar tão relatadas nos últimos anos (Barker, Gout e Crowe, 2011).

As concentrações de albumina sérica são utilizadas como meio de diagnóstico ou de acompanhamento da desnutrição. Porém, este é um marcador também susceptível à alteração de acordo com a morbidade instalada e por condições inflamatórias e infecciosas, ou seja, condições não nutricionais, comuns na população sujeita à desnutrição hospitalar. Além disso,

a albumina pode permanecer inalterada em quadro de privação curta de alimentos, já que a meia vida da albumina é de 20 dias e, nesse caso, aparece pouco alterada ao exame (Reid e Campbel, 2004; Bouillanne et al., 2007). Em idosos com baixa atividade física, a albumina reduzida pode subestimar a real situação nutricional dessa população (Kuzuya et al., 2007).

A concentração de leptina tem sido o único parâmetro suficientemente capaz de indicar a condição nutricional do paciente, com valores reduzidos à medida que a desnutrição torna-se mais acentuada, porém sem sofrer alterações por condições adversas, tendo boa correlação com o peso e os níveis de triglicérides (Bouillanne et al., 2007; Amirkalali et al., 2010).

A desnutrição é definida como um quadro clínico resultante da ingestão insuficiente de nutrientes específicos ou da falta de absorção destes pelo organismo. No entanto, doenças que aumentem a demanda energética e complicações de uma doença subjacente podem levar à desnutrição, também denominada desnutrição secundária. É um quadro que leva à alteração de peso e crescimento corporal e pode trazer comprometimentos significativos em diversos tecidos e sistemas do corpo humano (Oishi et al., 2002; Nunes et al., 2002; Reid e Campbel, 2004).

O termo desnutrição implica na deficiência de um ou mais nutrientes, porém especificamente a desnutrição proteico-calórica afeta o metabolismo de proteínas corporais e, conseqüentemente, das células que delas dependem (Modolin et al., 1984; Oishi et al., 2002). Dessa forma, funções importantes do organismo como a formação de enzimas, anticorpos, hormônios, equilíbrio ácido-básico, transporte de oxigênio, coagulação do sangue, atividade muscular, ativação celular e processos de sínteses de tecidos podem estar

alteradas, nos quais a proteína é nutriente fundamental (Neiva, Guerino e Mello, 1999; Wild et al., 2010).

Assim, a desnutrição pode levar à incapacidade funcional para a recuperação de doenças graves, da regeneração do tecido muscular e da cicatrização de feridas, além de alterações na função imunológica, favorecendo a instalação de infecções (Reid e Campbel, 2004).

Mechanick (2004) aponta que em humanos, devido à atrofia na pele provocada pela desnutrição, estes indivíduos estão susceptíveis à lesões cutâneas também denominadas úlceras de pressão ou decúbito, cujo desenvolvimento é bastante comum nesses pacientes restritos ao leito com uma conseqüente dificuldade para cura.

Ocorre então a combinação frequente desses dois fatores: desnutrição e presença de úlceras cutâneas, seja pela desnutrição ser um fator negativo para o desenvolvimento de úlceras cutâneas, seja pela úlcera cutânea requerer um alto gasto energético para a sua reconstituição tecidual. Em vista disso, Legendre et al. (2008) analisaram o estado nutricional de pacientes alocados em hospitais e encontraram deficiência proteica em 27% dos pacientes que apresentavam úlceras cutâneas e em 2% dos pacientes controle (pacientes sem úlceras cutâneas, que apresentavam outras alterações dermatológicas), concluindo que a ferida também é um fator desencadeador de déficit proteico, devido à maior demanda energética dada pela atividade celular e pelo processo inflamatório. Além disso, um mau prognóstico do processo cicatricial foi significativamente associado à deficiência proteica.

A intervenção nutricional tem sido considerada, portanto, como terapia complementar em casos de feridas cutâneas, mesmo quando não há um

quadro de desnutrição, assim como em indivíduos sem lesão, mas que apresentam um quadro clínico de risco. O suporte nutricional proteico diminui o risco de desenvolvimento de úlceras de pressão, como visto pela revisão sistemática de Stratton et al. (2005) e quanto à cicatrização, reverteria o possível atraso nesse processo (Legendre et al., 2008; Wild et al., 2010).

Além disso, pacientes hospitalizados são frequentemente submetidos à intervenções cirúrgicas, o que resulta em incisão e conseqüente necessidade de cicatrização dos tecidos envolvidos e, em especial, a pele.

É de extenso conhecimento, que a pele tem como principal função a proteção dos tecidos internos, envolvendo os segmentos corporais e evitando a entrada de agentes nocivos ao organismo. Assim, é de extrema importância o desenvolvimento saudável da cicatriz cirúrgica.

A ferida cutânea representa a descontinuidade das camadas da pele e a sua reconstituição depende de mecanismos químico e galvanotáticos, responsáveis pela migração celular adequada, defesa e síntese de fibras, levando à cicatrização. Para isso, é necessário um metabolismo energético suficiente, com níveis adequados de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, razão pela qual a desnutrição é considerada um dos fatores sistêmicos que influencia negativamente o processo de cicatrização de uma ferida (Thomas, 2001; Williams e Barbul, 2003; Wild et al., 2010).

Apesar de ser a experimentação humana o estado real das implicações de uma condição a ser estudada, o modelo animal permite observar e aprimorar o conhecimento acerca dos mecanismos fisiopatológicos de uma afecção, oferecendo subsídios para o desenvolvimento das investigações e a aplicabilidade de tratamentos e cuidados em humanos (Schanaider e Silva,

2004). Assim, o estudo do comportamento celular, dos processos de síntese e degradação tecidual, e da organização do tecido na busca da homeostasia é imprescindível.

Dessa forma, já se sabe que proteínas intervêm em células da defesa, como monócitos, macrófagos, linfócitos, leucócitos e neutrófilos, as quais são essenciais na fase inflamatória do processo de cicatrização, que antecede a epitelização. Além das células da defesa, na desnutrição, células proliferativas da epiderme também tendem a diminuir significativamente (Lim, Levy e Bray, 2006; Sugiyama, Fujita e Kobayashi, 2011).

O colágeno é a maior estrutura proteica do corpo humano e é o principal componente do tecido conjuntivo na ferida durante as fases proliferativa e remodelação. Em condições normais, deve representar 75% do peso seco da pele e conferir qualidade ao tecido, já que proporciona resistência à tração e elasticidade. Portanto, na ferida, o aumento do colágeno está diretamente relacionado com o aumento da força de tração e qualidade do tecido. Em modelos animais desnutridos, a redução na espessura da derme e a diminuição na porcentagem de colágeno, sugere conseqüente falha de cicatrização, já que pode causar atraso nesse processo e predispor à cronicidade do quadro (Oishi et al., 2002; Wild et al., 2010).

Oishi et al. (2002) mostraram que a deficiência proteica em ratos afetou a presença de colágeno do tipo I e III na pele, mais acentuadamente do tipo III, apontando sua importância clínica e fisiológica, por este ser crucial na cicatrização da ferida. Além disso, puderam demonstrar alteração na atividade da colagenase, que interferiu na degradação do colágeno tipo III e, conseqüentemente, na síntese de colágeno tipo I.

Portanto, deficiência proteica interfere em todas as fases do processo cicatricial. Apesar de vários nutrientes serem importantes para o balanço energético e para um tecido saudável, a proteína desempenha o papel mais importante durante o processo de cicatrização.

A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) é indicada para o tratamento de feridas cutâneas por ter um papel similar à corrente fisiológica no processo de cicatrização, estimulando a atração galvanotática e, dessa forma, favorecendo e acelerando este processo (Nishimura, Isseroff e Nuccitelli, 1996; Kloth e McCulloch, 1996; Jünger et al., 2008). Apesar do tipo de corrente e intensidade, a polaridade é o fator fundamental para o processo de cicatrização ocorrer de forma efetiva, pois vai influenciar o tipo de célula atraída para o sítio da lesão (Brown, McDonnell e Menton, 1989; Tsai, Lin e Chao, 2013).

Por meio de estudos prévios, tem sido demonstrada a importância da utilização dos dois polos, negativo e positivo, durante o período de intervenção terapêutica pela eletroestimulação, já que cada um apresenta papel específico na atração celular. O polo positivo promove migração e proliferação de células epiteliais (Brown, McDonnell e Menton, 1989; Brown et al., 1995; Kloth e McCulloch, 1996) e a atração de macrófagos (Kloth e McCulloch, 1996; Jünger et al., 2008). O polo negativo tem seu maior destaque por demonstrar efeito bactericida (Kincaid e Lavoil, 1989), além de ser responsável pela migração de fibroblastos e, conseqüentemente, a síntese de colágeno (Erickson e Nuccitelli, 1984; Mehmandoust et al., 2007; Jünger et al., 2008); migração de neutrófilos (Jünger et al., 2008) e restrição da infiltração de moléculas proteicas, limitando a formação de edema no local da lesão (Bettany, Fish e Mendel, 1990).

Há poucos estudos sobre o efeito da intervenção eletrotermofototerapêutica em feridas cutâneas de modelos desnutridos. Pinheiro et al. (2006) e Pinheiro et al. (2009) estudaram o efeito do laser na cicatrização de feridas cutâneas em ratos nutridos e desnutridos, porém não apresentaram análise quantitativa das variáveis histológicas analisadas, minimizando o poder científico de seus achados.

Contudo, o papel da eletroestimulação de alta voltagem em feridas cutâneas de tecidos atingidos pela desnutrição, ainda é desconhecido. Nesse sentido, é importante compreender se existe falha no processo de atração e migração celular quando estimulada eletricamente em um quadro proteico desfavorável e como progride associando-a com dieta normoproteica.

Com isso, sustenta-se a hipótese que a desnutrição afeta a capacidade de regeneração adequada da pele, ao passo que a terapia de eletroestimulação de alta voltagem pode agir positivamente nesse quadro, mas sua associação com dieta normoproteica pode minimizar de forma significativa os efeitos da desnutrição no processo cicatricial de feridas cutânea.

2 OBJETIVOS

Geral: Analisar os efeitos da desnutrição na regeneração cutânea de ratas, do seu tratamento com estimulação elétrica de alta voltagem com polos alternados, bem como a associação com dieta normoproteica.

Específicos:

- Determinar a massa corporal grupos de todos os grupos experimentais
- Analisar a área da lesão, comparando os tempos pós-operatórios: 4º e 8º dias
- Analisar a re-epitelização da lesão cutânea
- Analisar a espessura da epiderme e da derme da pele regenerada
- Quantificar leucócitos e fibroblastos na derme regenerada
- Determinar a densidade de área de vasos na derme regenerada
- Analisar a birrefringência das fibras colágenas na derme regenerada

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), sob protocolo n° 08/2013 (Anexo 1).

3.2 Amostra

Foram utilizadas 35 ratas da linhagem Wistar, desmamadas no 21° dia de vida, provenientes da empresa ANILAB® (Paulínia-SP). Os animais foram mantidos em biotério, em condições ambientes padronizadas de período claro/escuro 12/12 horas e temperatura ambiente de 23° C, recebendo água e alimentação *ad libitum* de acordo com o grupo experimental, separados em gaiolas coletivas, contendo 10 animais em cada. Durante o período de tratamento, os animais foram mantidos em caixas individuais.

Os animais foram distribuídos igual e aleatoriamente em cinco grupos, com n=7:

C - controle (animais com dieta normoproteica, com lesão cutânea);

CT - controle tratado (animais com dieta normoproteica, com lesão cutânea e submetidos à EEAV polo alternado);

DC – desnutrido controle (animais com dieta hipoproteica, com lesão cutânea);

DT - desnutrido tratado (animais com dieta hipoproteica, com lesão cutânea e submetidos à EEAV polo alternado);

DTR – desnutrido tratado e em recuperação nutricional (animais desnutridos por dieta hipoproteica, com lesão cutânea, tratados concomitantemente com EEAV polo alternado e dieta normoproteica).

Um resumo dos procedimentos realizados durante todo o período experimental e a esquematização da aplicação das dietas em cada fase está apresentado na figura 1.

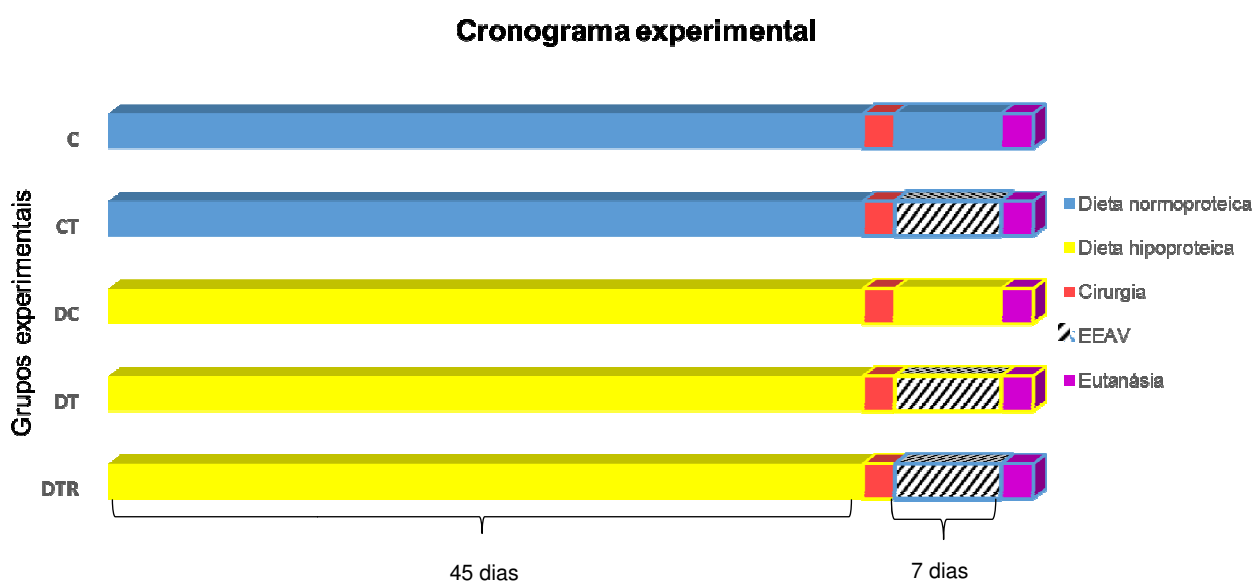


Figura 1 – Resumo esquemático do cronograma experimental dos grupos: C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR- Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.

3.3 Dieta experimental

Durante 45 dias, os animais dos grupos C e CT, receberam dieta normoproteica, contendo 14% de proteína, enquanto os animais dos grupos DC, DT e DTR foram alimentados com dieta hipoproteica, correspondente a 6%

de proteína. Após esse período e até o final do protocolo experimental, os grupos C, CT, DC e DT continuaram recebendo suas respectivas dietas, enquanto os animais do grupo DTR passaram a ser alimentados com dieta normoproteica, durante sete dias, que correspondeu ao período de intervenção com eletroestimulação.

Foram empregadas dietas de composições controladas, correspondentes às dietas normoproteica (AIN 93M - 14%) e hipoproteica (AIN 93 - 6%) como propostas por Reeves, Nielsen e Fahey (1993) e reproduzidas e comercializadas por PragSoluções Serviços e Comércio Ltda - ME - Jaú - SP; CNPJ: 03.420.938/0001-59/IE: 401.091.476.112 (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das dietas utilizadas pelos grupos experimentais.

Ingredientes	Dieta AIN 93M – 14% proteína (g/1 Kg)	Dieta AIN – 6% proteína (g/1 Kg)
Amido de milho	465,7	508,0
Caseína	140,0	66,0
Amido dextrinizado	155,0	166,5
Sacarose	100,0	121,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Fibra (Cel. Microcrist.)	50,0	50,0
L-cistina	1,8	1,0
Cloreto colina	2,5	2,5
Mix mineral G	35,0	35,0
Mix vitamínico	10,0	10,0
TOTAL	1000,0	1000,0
Kcal/Kg	3601	3601

Fonte: PragSoluções Serviços e Comércio Ltda - ME.

3.4 Determinação da massa corporal

A massa corporal foi verificada após o primeiro dia da chegada dos animais ao biotério e repetida a cada sete dias, até o fim de todo período experimental, por meio de uma balança digital calibrada, da marca Gehaka® (modelo BG1000, 2004 – São Paulo-SP).

3.5 Indução da ferida

O procedimento cirúrgico consistiu da remoção de 1 cm² de pele incluindo o tecido adiposo subcutâneo, na região interescapular (Figura 2). Para isso, utilizou-se um gabarito vazado milimetrado e bisturi de lâmina 11, sob anestesia intramuscular composta de uma mistura de Dopalen® (Cloridrato de Cetamina) e Rompun® (Cloridrato de Xilazina) 2g/100mL, na proporção 3:2, em dose de 0,09 mL/100g e 0,06mL/100g de massa corporal, respectivamente, após tricotomia manual da região.

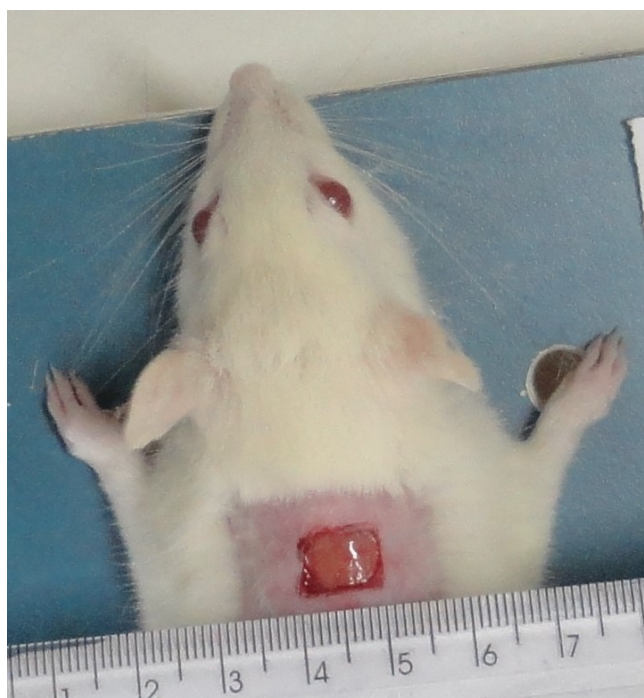


Figura 2 - Indução da ferida na região interescapular do animal, após tricotomia manual

3.6 Intervenção terapêutica

A intervenção terapêutica consistiu na utilização do equipamento de estimulação elétrica de alta voltagem, modelo Neurodyn High Volt® – ANVISA 10360310008 (IBRAMED®) (Figura 3), com início após 24 horas do procedimento cirúrgico, durante 30 minutos, por sete dias consecutivos, nos seguintes parâmetros: frequência de 100 Hz, com polaridade alternada a cada dia, iniciando com o polo negativo como eletrodo ativo e intensidade em limiar motor, reajustada afim de evitar acomodação da corrente. A terapia foi realizada sob anestesia intramuscular afim de manter o animal imóvel. Para isso, foi utilizado uma mistura de Dopalen® (Cloridrato de Cetamina) e Rompun® (Cloridrato de Xilazina) com a metade da dose utilizada para o procedimento cirúrgico, já que esse procedimento consistia em menor tempo e



a repetitividade de sete dias fragilizaria o animal.

Figura 3 – Equipamento Neurodyn High Volt® utilizado para estimulação elétrica de alta voltagem.

Para a disposição dos eletrodos foi realizada tricotomia da região a ser aplicada, sendo o eletrodo ativo de silicone-carbono, medindo 4 cm², posicionado sobre a lesão e outro, dispersivo de silicone-carbono, medindo 16 cm², sobre a região abdominal (Figura 4). Como meio de contato entre o eletrodo ativo e a ferida foi utilizada gaze estéril, umedecida com soro fisiológico a 0,9% e gel estéril para o eletrodo dispersivo.

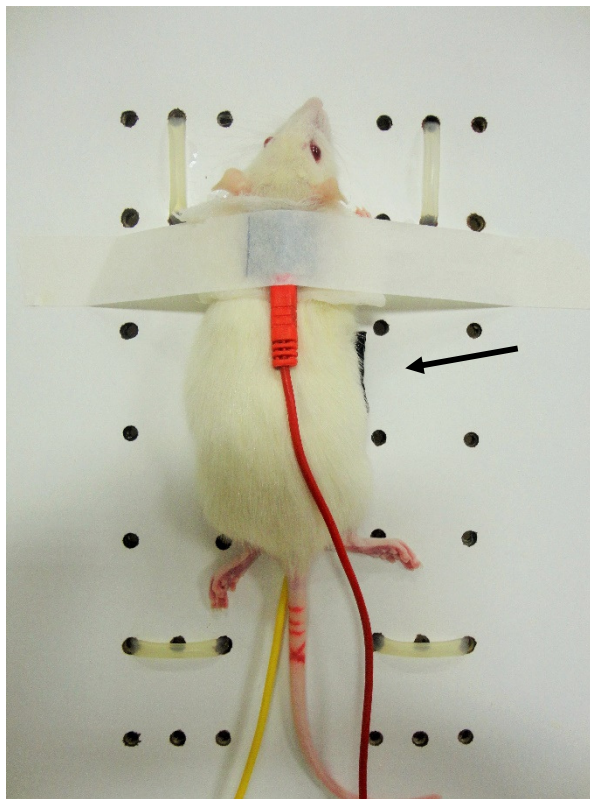


Figura 4 – Disposição dos eletrodos durante a aplicação de EEA (eletrodo dispersivo = seta).

3.7 Área da ferida

Registros fotográficos padronizados foram obtidos de todas as feridas, por meio de câmera digital (SONY® Cyber-Shot DCM-W570, 16.1 megapixels), nos seguintes dias: imediatamente após a cirurgia, no 4º dia de tratamento e no 8º

dia, com a câmera sempre posicionada a 40 cm, por meio de tripé, perpendicularmente à superfície da ferida, incluindo na imagem a identificação do animal e uma régua, para possibilitar a calibração do software de análise de imagens, posteriormente.

As imagens foram usadas para mensurar a área da ferida em cm^2 por meio do software Image Pró-Plus 6.2 (MediaCybernetics® - n° de série: 41N62000-54695; Bethesda-USA). À partir dos dados referentes às áreas, foi calculado o Índice de Cicatrização da Úlcera (ICU), que consiste no valor da área inicial da ferida subtraído pelo valor da área final, e por sua vez, dividido pela área inicial (Robson et al., 2000).

Os valores gerados no ICU foram interpretados segundo estudo de Minatel et al. (2009), que considera ICU=1 (epitelização total), ICU=0 (sem sinal de epitelização), ICU >0 até 0,99 (redução da área da lesão) e ICU<0 (aumento da área da lesão).

3.8 Processamento histológico

Após eutanásia dos animais em câmara de CO_2 , as lesões foram removidas, contendo pele intacta ao redor das mesmas. A fixação das peças foi feita em solução tamponada de formol a 10% por 48 horas e, posteriormente, tratadas para inclusão em paraplast. Cortes não seriados de 6 μm de espessura foram obtidos e corados por Hematoxilina-Eosina (HE).

Cortes do mesmo padrão foram corados por uma solução de Picrosirius em uma concentração de 1% (Sirius red em solução saturada de ácido pícrico) para o exame da birrefringência, possibilitando a análise histométrica do colágeno.

3.9 Mensuração da epiderme e derme na ferida

Para análise da re-epitelização (em μm), as medidas lineares do centro da ferida, sem epitélio, foram obtidas em 10 cortes não seriados por animal, utilizando-se ocular milimetrada Zeiss KF (10x18), em objetiva de 4x.

Procurando novos indicadores de regeneração e a fim de quantificar a qualidade do epitélio regenerado, foram medidas as espessuras do epitélio em sua porção mais distal em relação ao tecido saudável, desconsiderando a camada córnea desprendida da epiderme e evitando irregularidades no tecido e papilas dérmicas. Nos animais com epitelização completa, a medida foi feita no centro do epitélio. Para isso, utilizou-se ocular milimetrada Zeiss KF (10x18), em objetiva de 10x, em cinco cortes não seriados, obtendo duas medidas em cada um, totalizando 10 medidas.

A espessura da derme no tecido de granulação foi analisada em cinco cortes não seriados por animal, e de cada um deles obtidas 10 medidas, utilizando-se ocular milimetrada Zeiss KF (10x18), em objetiva de 4x.

As análises foram feitas segundo técnicas histomorfométricas e adequadas segundo o coeficiente macrométrico (Mandarim-de-Lacerda, Fernandes-Santos e Aguilá, 2010).

3.10 Perfil numérico de fibroblastos e leucócitos

A quantificação de células por unidade de área foi realizada em três cortes não seriados por animal, nos quais foram analisados uma área de 1000 μm^2 por corte, para determinação de fibroblastos e leucócitos. Foi utilizado microscópio de luz com ocular quadriculada Zeiss KF (10X18), em objetiva de 100x, segundo técnica histomorfométrica (Mandarim-de-Lacerda, Fernandes-Santos e Aguila, 2010).

3.11 Densidade de área de vasos

Para a determinação da densidade de área de vasos utilizou-se uma ocular Nikon (OPI 10X/20) em microscópio de luz. Foram examinados oito cortes não seriados e três áreas de 200 μm^2 em cada um deles, sendo duas laterais (próximo às bordas da ferida) e uma central, totalizando 24 áreas por animal, em objetiva de 40x, segundo técnica histomorfométrica (Mandarim-de-Lacerda, Fernandes-Santos e Aguila, 2010).

3.12 Birrefringência das fibras colágenas

Utilizou-se microscópio de polarização (Leica - DMPLP) em objetiva de 40x, acoplado à uma microcâmera digital (Leica DFC/280), responsável pela digitalização das imagens histológicas. Foram capturadas três áreas de 10.000 μm^2 cada, em cinco cortes não seriados, sendo duas áreas próximas às bordas e uma central, totalizando 15 áreas por animal. Para a quantificação do colágeno foi utilizado o software Image Pró-Plus 6.2.

3.13 Análise Estatística

Inicialmente, foram analisados a normalidade e homocedasticidade dos dados, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene.

Para análise do comportamento da massa corporal entre os grupos antes e após o período de implementação das dietas, foi utilizado teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, assim como para observar a diferença entre os grupos após a intervenção nutricional do grupo DRT.

A área da ferida dos períodos PO, 4º dia e 8º dia foram processados pela análise da variância para medidas repetidas, pelo teste de Friedman. Para a comparação do ICU entre grupos, utilizou-se teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

Os dados referentes à epitelização foram processados por teste T de Student para amostras independentes, cruzando os resultados de cada grupo. Para a espessura do epitélio foi utilizado teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, e da mesma forma para a espessura da derme.

Os dados referentes ao número de leucócitos foram analisados segundo o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

As análises da densidade da área de vasos e do número de fibroblastos foram processadas por Anova One-Way, seguido do pós-teste de Tukey.

A análise da birrefringência das fibras colágenas foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn.

Após a realização dos testes citados, buscou-se complementar a compreensão dos resultados analisando o tamanho do efeito (effect size), por meio da medida de Hedges, que expressa a magnitude da diferença entre as populações.

A medida de Hedges foi calculada da seguinte forma (Durlak, 2009):

$$g = \frac{Me - Mc}{SD \text{ pooled}} \times \left(\frac{N - 3}{N - 2.25} \right) \times \sqrt{\frac{N - 3}{N}}$$

onde, M é igual à média, no qual E e C se referem à experimental e controle, respectivamente; SD pooled é o desvio padrão ajustado; N se refere ao tamanho total da amostra.

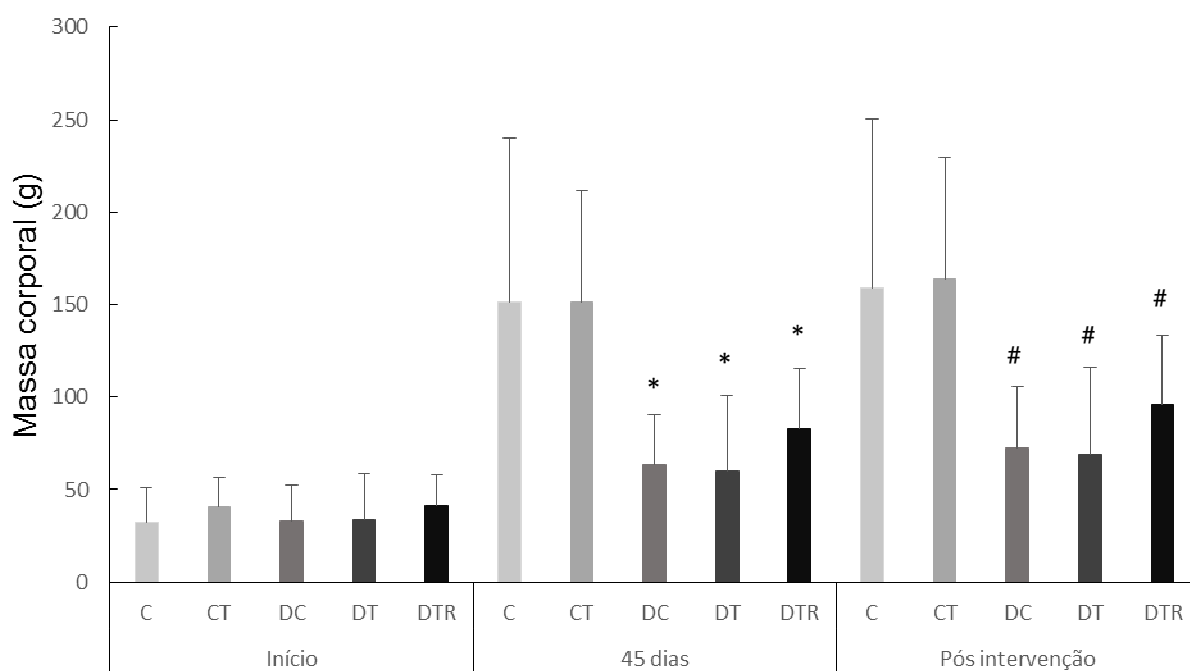
Para interpretação dos resultados, foram utilizados pontos de corte segundo a proposta de Lipsey e Wilson (1992), que assumem o tamanho do efeito maior que 0,56 como grande, 0,33 – 0,55 como moderado e tamanhos de efeito de 0 – 0,32 como pequeno. Um efeito negativo indica a orientação do resultado (efeito) para o grupo controle.

Para todas as análises descritas foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$ e utilizado para o desenvolvimento dos dados os softwares SPSS 17.0 e Bioestat 5.0.

4 RESULTADOS

A perda amostral foi de 30%, fato considerado desde o início do projeto experimental, dadas as condições impostas aos animais, de desnutrição e anestesia diária (durante os 7 dias de intervenção terapêutica).

A massa corporal média de todos os animais antes do início da dieta, foi de $44,98 \pm 0,97$ g. Os valores médios de cada grupo, de forma a configurar a



sua homogeneidade estão apresentadas na figura 4.

Figura 5 - Média \pm desvio padrão da massa corporal dos animais em cada grupo experimental, nos respectivos tempos de aferição, sendo “início” correspondente ao período antes da indução da dieta, “45 dias” se refere ao período após o fim da primeira etapa da dieta e “pós-intervenção” referente ao período após eletroestimulação e da intervenção nutricional. C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR- Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.

* Difere dos grupos controle com 45 dias de dieta (C e CT); # difere dos grupos controle (C e CT) pós-intervenção.

A análise descritiva associada à análise estatística dos dados de massa corporal, mostram que não houve diferença entre os grupos controle (C e CT) após 45 dias de dieta, confirmando que os animais estavam na mesma situação nutricional. Da mesma forma, os 3 grupos experimentais alimentados com dieta hipoproteica não apresentaram diferença estatística (DC e DT; DC e DTR; DT e DTR). No entanto, a massa corporal média dos animais submetidos à dieta hipoproteica foi menor em 54,6%, em relação à média dos animais com dieta normoproteica nesse período ($p < 0,05$).

Ao final da intervenção nutricional, o grupo DTR apresentou maior ganho ponderal quando comparado aos grupos DC e DT, em 21,2% e 12,7% respectivamente, porém os valores não foram significativos e se manteve diferente estatisticamente em relação aos grupos controle (C e CT).

Os resultados do ICU não revelaram diferença significativa entre os grupos estudados. Na análise do tempo por medidas repetidas, há diferença em todos os grupos nos valores de área da ferida ao final do período de intervenção (8º dia) quando comparados aos valores iniciais, pré-intervenção (PO). Apenas o grupo C apresentou diferença nos valores de área da ferida entre os dias 4 e 8 (Tabela 2).

Tabela 2 - Média \pm desvio padrão da área da ferida (cm^2), nos períodos pós-operatório (PO), 4º dia após a cirurgia e 8º dia após a cirurgia, correspondente ao final da intervenção elétrica. A medida de Hedges mostra o tamanho do efeito nas análises intergrupo para o ICU, sendo C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR - Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.

Grupos	PO	4º dia	8º dia	ICU	Análise intergrupo	Hedges'g
C	0,93 \pm 0,11	0,81 \pm 0,28	0,11 \pm 0,03* §	0,88 \pm 0,04	C x CT	-1,16 [#]
					C x DC	-0,82 [#]
					C x DT	-1,05 [#]
					C x DTR	-0,84 [#]
CT	0,95 \pm 0,21	0,65 \pm 0,15	0,22 \pm 0,27*	0,78 \pm 0,24	CT x DC	0,22 [†]
					CT x DT	0,06 [†]
DC	0,98 \pm 0,15	0,62 \pm 0,16	0,16 \pm 0,13*	0,84 \pm 0,13	CT x DTR	0,55 [‡]
					DC x DT	-0,21 [†]
DT	0,88 \pm 0,16	0,56 \pm 0,14	0,19 \pm 0,19*	0,80 \pm 0,18	DC x DTR	-0,05 [†]
					DT x DTR	0,41 [‡]
DTR	1,08 \pm 0,10	0,64 \pm 0,12	0,18 \pm 0,07*	0,83 \pm 0,06		

* Difere do PO; § difere do 4º dia.

efeito grande; ‡ efeito moderado; † efeito pequeno.

A medida de Hedges aplicada para o ICU mostrou efeito grande quando comparados os valores dos grupos CT, DC, DT e DTR em relação ao grupo controle, indicando que o grupo C apresentou maior cicatrização, apontada pelos valores negativos de g. Efeito moderado foi encontrado no grupo DTR em relação ao CT e ao DT. O efeito entre DC e CT, DT e CT, assim como entre DT e DC, DTR e DT foi classificado como pequeno.

A análise da re-epitelização, de acordo com a medida do centro da ferida sem epitélio, mostrou que o grupo controle tratado com eletroestimulação (CT) apresentou maior epitelização em relação ao grupo controle que não recebeu qualquer tratamento (C) ($p < 0,05$). Da mesma forma, os grupos desnutridos eletroestimulados (DT e DTR) em relação ao grupo C ($p < 0,05$). Os

demais grupos não apresentaram diferença estatística significativa nessa análise, mas nota-se a tendência dos grupos desnutridos apresentarem maior epitelização, seja na situação de intervenção terapêutica (DT/DTR comparados ao CT) ou não (DC comparado ao C), como mostra a tabela 3.

Tabela 3 - Média \pm desvio padrão (DP) da distância central entre as bordas da ferida (μm), referente aos grupos experimentais C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR- Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional, e o tamanho do efeito das variáveis na análise intergrupo (Hedges'g).

Grupos	Média	DP	Análise intergrupo	Hedges'g
C	2244,97	526,23	C x CT	-1,63 [#]
			C x DC	-0,66 [#]
			C x DT	-1,33 [#]
			C x DTR	-1,46 [#]
CT	1081,68*	648,66	CT x DC	0,25 [†]
DC	1386,01	1386,93	CT x DT	-0,20 [†]
			CT x DTR	-0,10 [†]
			DC x DT	-0,33 [‡]
DT	881,58*	1049,34	DC x DTR	-0,29 [†]
			DTR	996,77*

* Difere estatisticamente do grupo C.

efeito grande; [‡] efeito moderado; [†] efeito pequeno.

A medida de Hedges aponta exatamente o observado. Nos grupos não estimulados, a desnutrição (grupo DC) teve efeito grande em relação à situação controle (C) no que diz respeito à epitelização, assim como os demais grupos em relação ao grupo C. Efeito médio teve a intervenção terapêutica na desnutrição (DT em relação ao DC). Por fim, foram encontrados efeitos pequenos para a comparação entre os grupos desnutridos em relação ao grupo CT, assim como na comparação do DTR com os grupos DT e DC.

A análise da espessura do epitélio regenerado permitiu observar que quando comparados os grupos controle em relação aos desnutridos, os desnutridos apresentam a espessura do epitélio 83,5% (DC), 58,8% (DT) e 36,5% (DTR) menor em relação ao grupo C, e 82,1% (DC), 55,1% (DT) e 30,8% (DTR) menor em relação ao grupo CT, porém apenas DC e DT diferem estatisticamente de C e CT. Complementando, quando comparados os grupos desnutridos, a espessura do epitélio foi 150% maior quando aplicado a eletroestimulação e 285,7% quando associado eletroestimulação e intervenção nutricional ($p < 0,05$), comparados, portanto, com o grupo DC. O grupo DTR apresentou espessura 54,3% maior que o grupo DT, porém não diferem estatisticamente.

A espessura da derme foi menor no grupo DC em relação aos grupos C e CT ($p < 0,05$), o qual apresentou redução de 45,3% e 51,5%, respectivamente a estes. Entretanto, as intervenções empregadas no grupo desnutrido, por meio de eletroestimulação somado ou não à intervenção nutricional, mostraram ser capazes de recuperar a espessura da derme no tempo estabelecido, equivalendo-se estatisticamente aos grupos C e CT. Apesar dos grupos DT e DTR não diferirem estatisticamente do DC, o aumento médio encontrado nesses grupos foi de 53,5% e 51,5%, respectivamente.

As diferenças estão representadas pelas figuras 5 e 6. Observa-se na figura 6, sob uma análise qualitativa, que os adipócitos dos grupos desnutridos apresentam-se muito menores, comparados aos grupos controle, embora não mensurados, pois não era o objetivo deste trabalho.

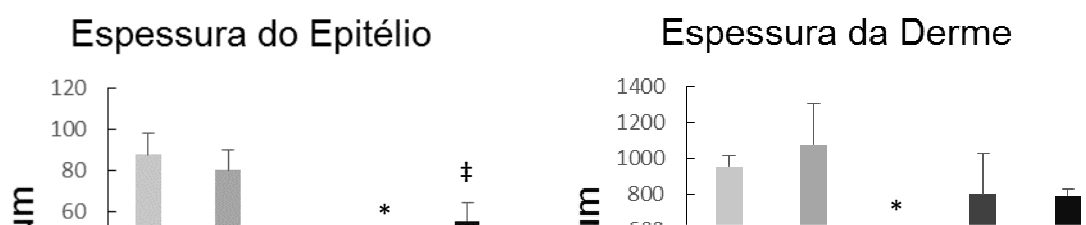
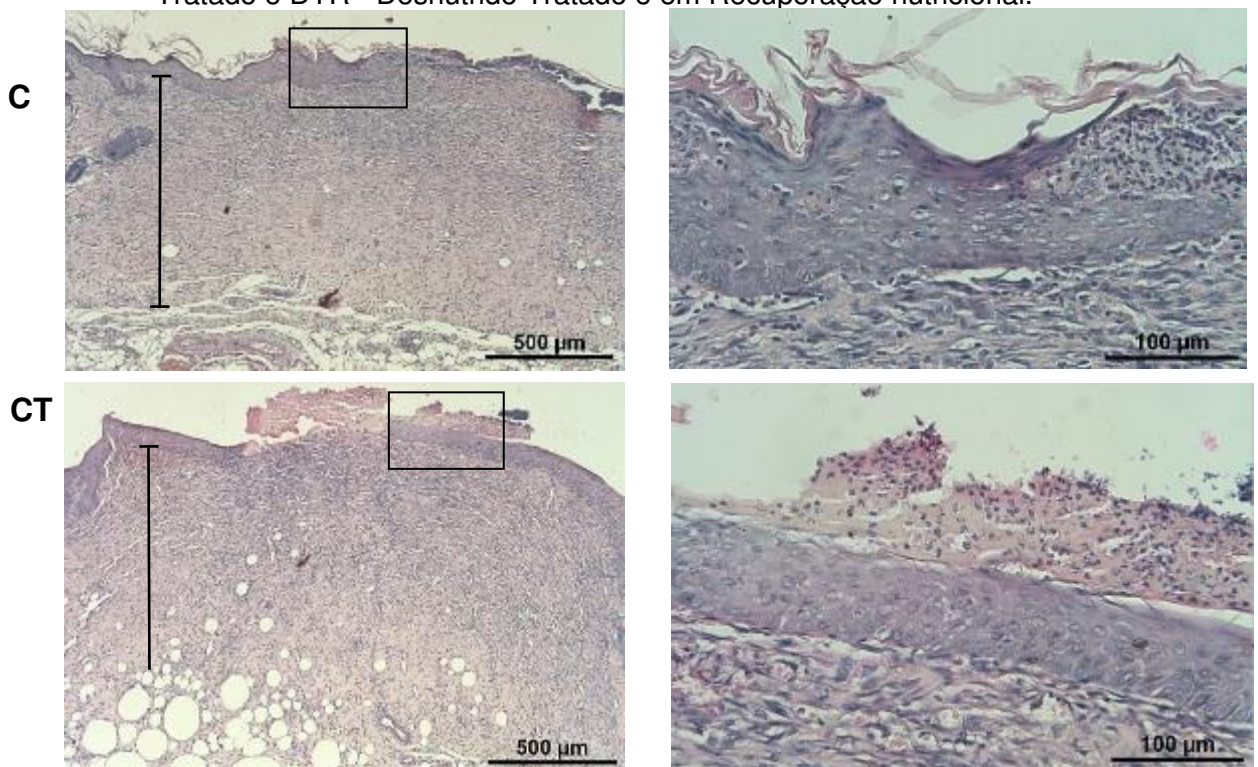
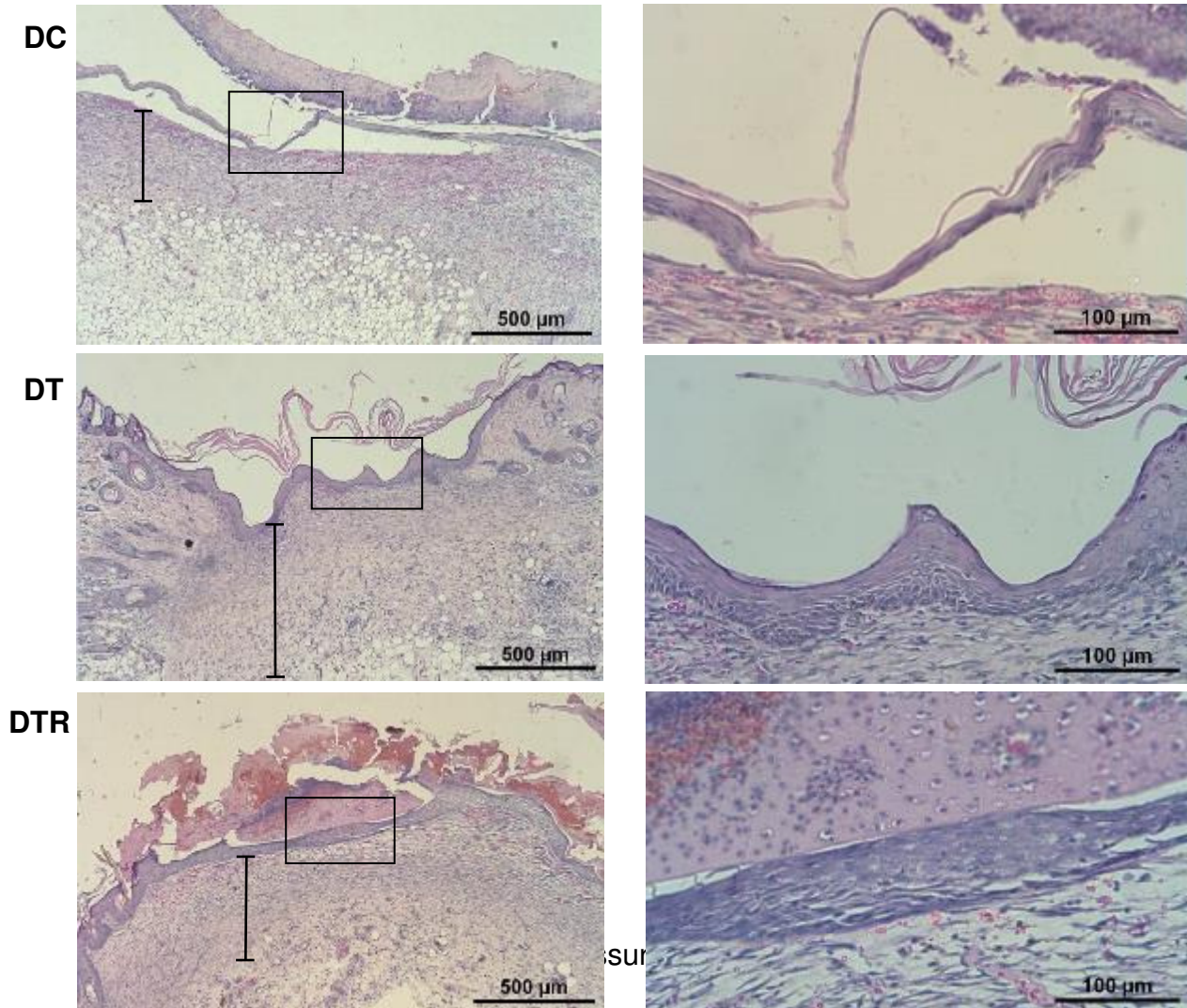


Figura 6 - Média \pm desvio padrão da espessura do epitélio e da derme na área da ferida (μm) de cada grupo experimental: C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR - Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.
* Difere do C e do CT; ‡ difere do DC.

Figura 7 - Micrografia da espessura do epitélio na área da ferida, HE, 4x (barra = 500 μm) à esquerda e sua respectiva área em 20x (barra = 100 μm) à direita. O símbolo () indica a espessura da derme nos respectivos grupos: C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR - Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional. I





apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Medida de Hedges na análise intergrupo da espessura do epitélio e da derme para os grupos C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR- Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.

Análise intergrupo	Hedges'g Epitélio	Hedges'g Derme
C x CT	-0,28 [†]	0,92 [#]

C x DC	-7,68 [#]	-7,71 [#]
C x DT	-4,25 [#]	-1,19 [#]
C x DTR	-2,66 [#]	-2,74 [#]
CT x DC	-7,80 [#]	-4,30 [#]
CT x DT	-4,13 [#]	-0,97 [#]
CT x DTR	-2,47 [#]	-2,20 [#]
DC x DT	2,45 [#]	2,23 [#]
DC x DTR	5,20 [#]	6,51 [#]
DT x DTR	1,90 [#]	-0,08 [†]

[#] efeito grande; [†] efeito pequeno.

As espessuras do epitélio e da derme apontam efeitos grandes para os grupos controle (C e CT) em relação aos grupos desnutridos (DC, DT e DTR), assim como dos desnutridos tratados (DT e DTR) em relação ao respectivo controle (DC). O grupo DTR apresenta efeito grande somente na epiderme em relação ao DT.

O grupo CT apesar de não ter sido melhor significativamente, apresentou efeito grande sobre o C, na derme. Entretanto, para o epitélio o efeito entre esses grupos foi pequeno.

A análise da densidade de vasos mostrou diferença quando comparados os grupos experimentais. Os grupos DT e DTR apresentaram maior densidade de vasos em relação ao grupo C ($p < 0,05$), enquanto os demais grupos não diferiram entre si.

De acordo com a medida de Hedges, os grupos CT, DC, DT e DTR apresentaram efeito grande na densidade de área de vasos em relação ao grupo C. Além disso, os grupos DC, DT e DTR apresentam efeito grande sobre o CT. As relações entre os grupos desnutridos apresentaram efeito pequeno (Tabela 5).

Tabela 5 - Média \pm desvio padrão da densidade de área de vasos para os grupos C - Controle, CT - Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR - Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional, e a medida de Hedges (Hedges'g) para as relações intergrupo.

Grupos	Média	DP	Análise intergrupo	Hedges'g
C	6	2,1	C x CT	1,08 [#]
			C x DC	1,76 [#]
			C x DT	2,12 [#]
			C x DTR	1,98 [#]
CT	8,4	1,6	CT x DC	1,06 [#]
			CT x DT	1,36 [#]
DC	11,4	3,1	CT x DTR	1,34 [#]
			DC x DT	0,19 [†]
DT	12,4*	5,9	DC x DTR	0,30 [†]
			DT x DTR	0,01 [†]
DTR	12,5*	3,3		

* Difere estatisticamente do grupo C.

efeito grande; † efeito pequeno.

A figura 8 representa as características histológicas referentes ao número de leucócitos, fibroblastos e da densidade de vasos apresentadas em cada grupo.

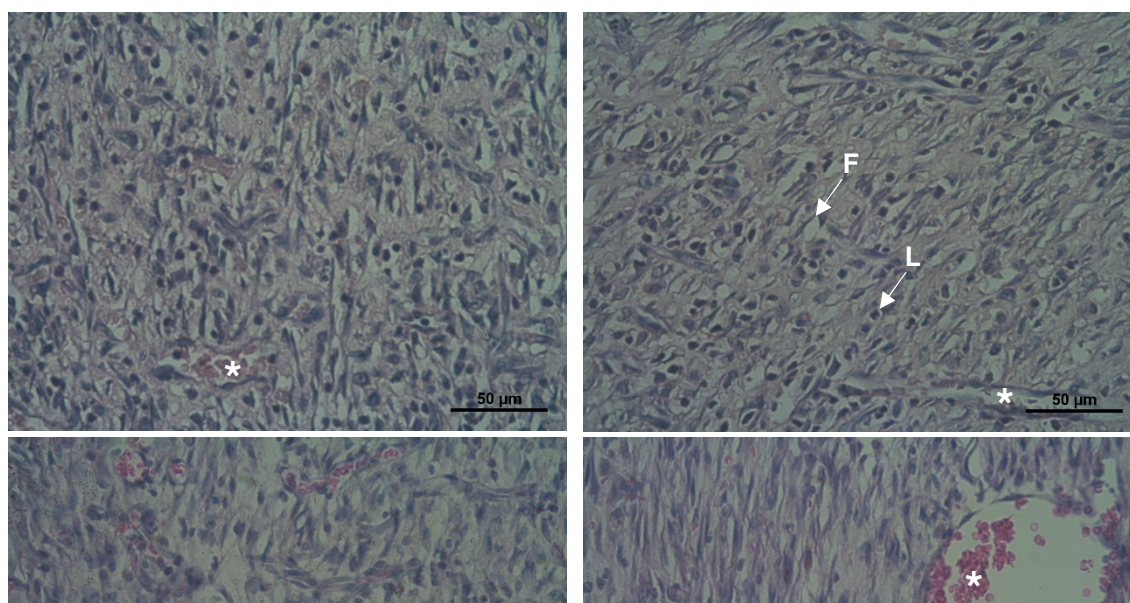


Figura 8 - Fotomicrografia da derme para análise de leucócitos (L), fibroblastos (F) e vasos sanguíneos (*) dos grupos C - Controle, CT - Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT - Desnutrido Tratado e DTR - Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional. Nota-se densidade de vasos aparentemente maior nos grupos desnutridos em relação aos demais, assim como números de fibroblastos aparentemente maior nos grupos controle (C e CT) e no grupo DRT, HE, 40x (barra = 50 μ m).

A determinação do número de células por unidade de área do tecido de granulação resultou em números de leucócitos estaticamente iguais nos grupos estudados, como pode ser observado na figura 9. Porém, a análise do tamanho do efeito direciona a análise e mostra que o grupo DC apresenta efeito grande em relação ao grupo controle C e moderado ao CT. O grupo DTR mostrou efeito grande em relação ao CT, apresentando maiores números de leucócitos, e moderado em relação ao DT e ao C. Efeitos pequenos foram observados na relação entre DT e C, DT e CT, DT e DC, DTR e DC, C e CT. Os valores estão descritos na tabela 6.

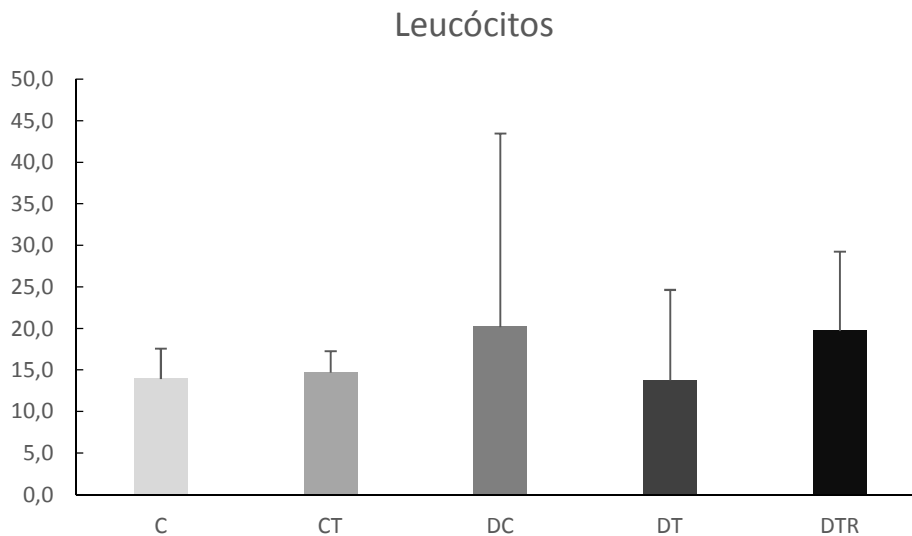


Figura 9 - Média e desvio padrão do número de leucócitos no tecido de granulação de cada grupo experimental: C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR- Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.

Quanto ao número de fibroblastos, nota-se aumento do número de fibroblastos nos grupos que receberam eletroestimulação e diminuição nos grupos desnutridos. No entanto, o grupo DTR recupera os valores do grupo CT, os quais apresentam diferença significativa em relação ao grupo DC ($p > 0,05$) (Figura 9). O Hedges'g confirma e complementa essa análise, mostrando que os grupos DTR e CT apresentam efeito grande sobre os grupos C, DC e DT. Além disso, quando analisado os dois grupos, o DTR representou efeito pequeno sobre o CT. O grupo DT apesar de não ter sido diferente estatisticamente do DC, apresentou efeito moderado em relação a esse. Na comparação entre os grupos DC e DT com o grupo C, foi encontrado efeito grande, porém inverso, mostrando a superioridade do grupo controle ao desnutrido.

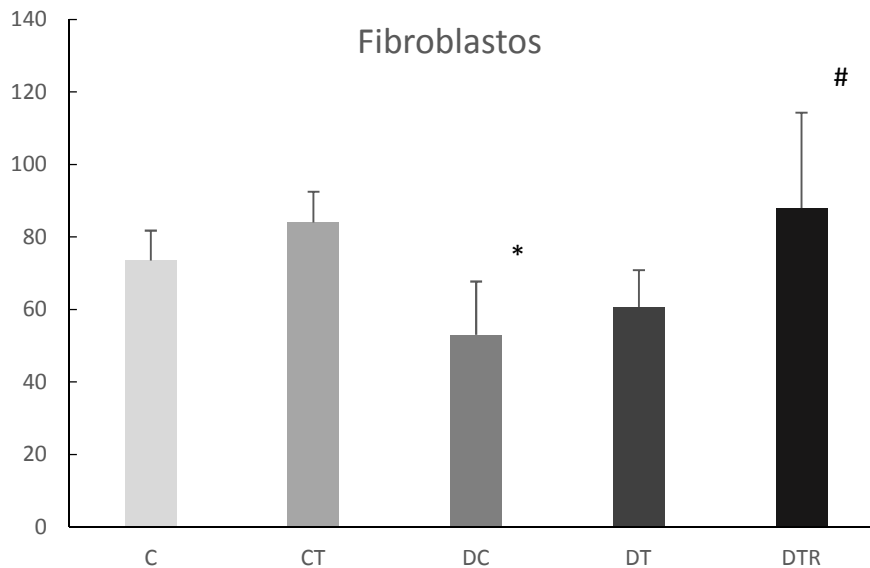


Figura 10 - Média e desvio padrão do número de leucócitos e fibroblastos no tecido de granulação de cada grupo experimental: C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR- Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.

* Difere do CT; # difere do DC.

Tabela 6 - Análise intergrupo do número de leucócitos e fibroblastos dado pela medida de Hedges na comparação entre os grupos C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR- Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.

Análise intergrupo	Hedges'g Leucócitos	Hedges'g Fibroblastos
C x CT	0,20 [†]	1,01 [#]
C x DC	0,59 [#]	-1,38 [#]
C x DT	-0,01 [†]	-1,12 [#]
C x DTR	0,52 [‡]	0,60 [#]

CT x DC	0,52 [‡]	-2,08 [#]
CT x DT	-0,15 [†]	-2,01 [#]
CT x DTR	0,88 [#]	0,17 [†]
DC x DT	-0,29 [†]	0,49 [‡]
DC x DTR	-0,13 [†]	1,32 [#]
DT x DTR	0,41 [‡]	1,10 [#]

[#] efeito grande; [‡] efeito moderado; [†] efeito pequeno.

Analisando quantitativamente as fibras colágenas foi possível detectar uma diminuição da birrefringência no grupo desnutrido controle e um aumento da mesma nos grupos tratados por eletroestimulação, com e sem intervenção nutricional. Assim, o grupo DC apresentou diferença significativa em relação aos grupos CT e DTR ($p < 0,05$), que pode ser observado na figura 9. A tabela 7 complementa essa análise, apresentando a medida de Hedges para esses dados.

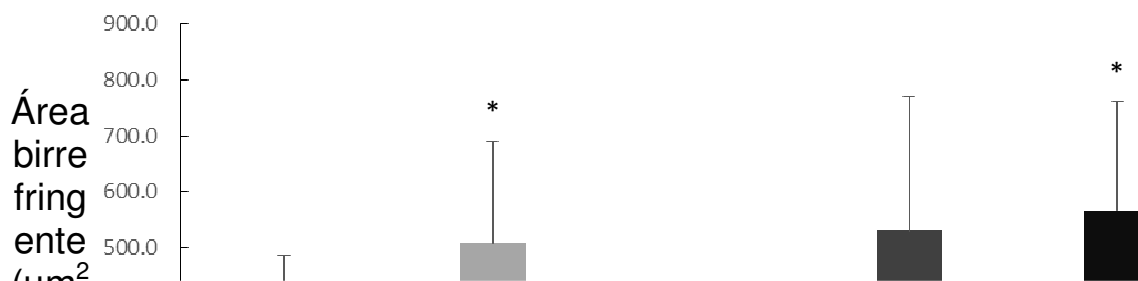
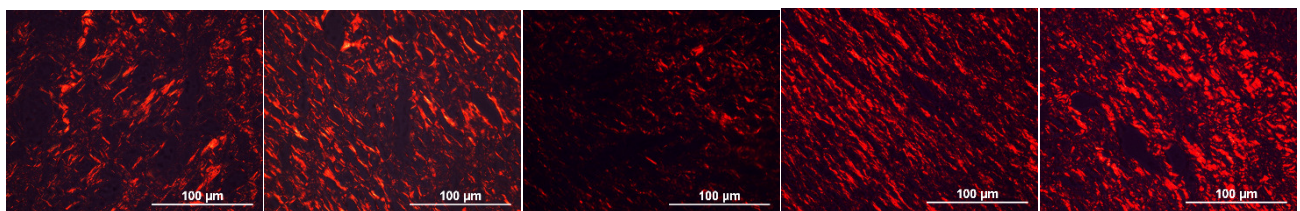


Figura 11 - Imagens da birrefringência do colágeno evidenciada pela coloração por Picrosirius, em microscópio de polarização, 40x (barra = 50 μm) e as respectivas áreas (μm^2), nos grupos C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR- Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.
 *Difere do DC.

Tabela 7 - Birrefringência das fibras colágenas pela análise da medida de Hedges para os grupos C - Controle, CT- Controle Tratado, DC - Desnutrido Controle, DT- Desnutrido Tratado e DTR - Desnutrido Tratado e em Recuperação nutricional.

Análise Intergrupo	Hedges'g Birrefringência do colágeno
C x CT	1,66 [#]
C x DC	-0,57 [#]
C x DT	1,60 [#]
C x DTR	2,34 [#]

CT x DC	-1,05 [#]
CT x DT	0,09 [†]
CT x DTR	0,26 [†]
DC x DT	2,34 [#]
DC x DTR	1,30 [#]
DT x DTR	0,13 [†]

[#] efeito grande; [†] efeito pequeno.

Foi encontrado efeito grande para os grupos que receberam tratamento (eletroestimulação e intervenção nutricional) em relação ao grupo controle (C), assim como para os desnutridos tratados (DT e DTR) em relação ao seu grupo controle (DC). Os grupos CT e C apresentaram efeito grande e moderado, respectivamente, quando comparados ao DC. Os grupos DT e DTR apresentaram efeito pequeno em relação ao grupo CT, assim como do DTR em relação ao grupo DT.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, optou-se pela pesquisa em fêmeas, tendo em vista a falta de dados com este gênero na literatura atual, que diversas vezes padroniza a utilização de animais machos.

Apesar da suposição habitual de que ratas podem influenciar os resultados dada a fisiologia hormonal específica das fêmeas, não encontramos na literatura estudos mostrando sua influência na regeneração de feridas

cutâneas. Além disso, o presente estudo comparou resultados entre grupos de animais com as mesmas condições de linhagem, idade e gênero.

Utilizando uma dieta considerada por Reeves, Nielsen e Fahey (1993) como ideal para o estudo da desnutrição em roedores, composta por nutrientes essenciais e de composições específicas, as análises de massa corporal nos períodos estudados apontaram menor ganho ponderal nos grupos desnutridos quando comparados aos grupos controle.

A restrição proteica mostrou os efeitos deletérios da desnutrição no aspecto físico do rato, caracterizando a perda de 54,6% de massa corporal, se comparados aos ratos de mesma idade e de nutrição proteica adequada.

Vários trabalhos mostram que a dieta hipoproteica não oferece suprimento apropriado para a manutenção de um metabolismo eficiente, especificamente para a formação de hormônios e enzimas responsáveis pelo ganho ponderal e crescimento, assim como para a integridade da pele, devido à redução de síntese proteica nesse tecido dada pela desnutrição (Wykes et al., 1996; Neiva, Gueruino e Mello, 1999). Dessa forma, Pezolato et al. (2013) apresentaram reduções significativas na massa corporal de ratos desnutridos com a dieta AIN 93 (6% proteína) quando comparados aos animais alimentados com dieta AIN 93M (14% proteína) no período de 45 dias, como utilizado no presente estudo.

O incremento nutricional recebido pelo grupo DTR, mostrou ganho ponderal superior do que o obtido nos grupos que se mantiveram em desnutrição proteica, porém o curto período de tempo dessa intervenção não possibilitou a proximidade dos valores encontrados nos grupos controle, que receberam dieta normoproteica durante todo o experimento. Esse resultado

concorda com os de Nunes et al. (2002), que encontraram ganho ascendente de massa corporal em 15 dias, mas sem significância estatística. O estudo de Komesu et al. (2003) aponta que a recuperação do desenvolvimento da massa corporal em animais desnutridos é dada após 90 dias de normalização da dieta.

A cicatrização de feridas é um processo complexo, que envolve múltiplos componentes celulares, que se organizam e se ativam de forma dependente, sendo o desempenho e o sucesso da reparação diretamente relacionados à fatores intrínsecos e extrínsecos (Arnold e Barbul, 2006; Wild et al., 2010). Portanto, a eliminação de fatores que podem afetar negativamente o desenvolvimento de todas as fases necessárias para a finalização de um quadro de lesão cutânea, é de extrema importância, a fim de evitar a cronicidade do problema.

Como visto por Komesu et al. (2003), a recuperação física após desnutrição não indica que as demais alterações em tecidos e sistemas estejam em sua normalidade fisiológica. Dessa forma, é relevante a investigação do desempenho de tratamentos já estabelecidos como efetivos no tratamento de feridas cutâneas agudas e crônicas, em quadros metabólicos desfavoráveis e seu resultado numa proposta de adequação proteica.

Pouco é explorado sobre o efeito da desnutrição proteica na pele e principalmente sobre a recuperação nutricional, porém Wykes et al. (1996) apontaram que a pele é um dos principais tecidos acometido pela redução da síntese proteica. Esses autores encontraram 66% de redução da síntese proteica na pele em porcos submetidos à desnutrição por oito semanas, enquanto na mucosa jejunal, músculo masseter e fígado houve,

respectivamente, 50%, 40% e 25% de redução. Os autores ainda reforçam que esses resultados demonstram o quanto a síntese proteica na pele é sensível à diminuição na ingestão proteica e que possivelmente a pele em condições normais, ou seja, sem necessidade de reparo, num organismo em desnutrição proteica pode ser poupada desse nutriente, a fim de garantir a disponibilidade de aminoácidos necessários para órgãos vitais.

Entretanto, a maioria dos estudos mostram os efeitos da desnutrição na pele sadia, sem necessidade de reparação ou ainda da alteração do status de micronutrientes em pacientes com lesões cutâneas, mas sem mensurar a evolução da cicatrização e a implementação de tratamentos para esse fim. Portanto, não está claro a forma como o organismo desnutrido se comporta quando há uma lesão desse tecido, e quais são os resultados frente a um tratamento (Wykes et al., 1996; Oishi et al., 2002; Raffoul et al., 2006; Sugiyama, Fujita e Kobayashi, 2011).

Por meio do Índice de Cicatrização da Úlcera pôde-se observar a equidade no processo de cicatrização entre os grupos, com resultados positivos na área final da ferida quando relacionado à área inicial de cada um deles. Por outro lado, a medida de Hedges aponta melhor cicatrização no grupo C em relação aos demais. Entretanto, este tipo de mensuração da área da ferida para o acompanhamento do processo de cicatrização ao longo de um tratamento estabelecido, apesar de ser um norteador dos resultados alcançados e determinar a porcentagem de redução ou aumento da ferida, pode ser influenciada por fatores que dificultam a identificação exata da margem da ferida, como o delineamento das bordas feita de forma subjetiva pelo analisador.

No presente estudo, o software marcava de forma automática a área da ferida, sem interferência do pesquisador. Porém, como no modelo experimental de feridas em ratos não é realizado a higienização e debridamento da ferida, comum no tratamento em humanos, a identificação precisa de suas margens pode estar prejudicada pela crosta formada, pelo excesso de exsudato e presença de infecções, diminuindo a confiabilidade dos resultados encontrados. Todavia, essa é uma análise válida para a avaliação do tratamento de feridas cutâneas em humanos, nos quais esses fatores são minimizados, com potencial para determinar precisamente a porcentagem de alterações sucedidas (Shaw e Bell, 2011).

Confirmando isso, o grupo C foi o que apresentou pior resultado na análise histológica da epitelização da ferida.

A análise da epitelização permite observar detalhadamente a reparação, avaliando histometricamente o avanço do epitélio. Por meio desta, foi possível observar a tendência dos desnutridos apresentarem maior epitelização quando comparados aos controle de dieta normoproteica, confirmado pela medida de Hedges que aponta efeito grande de todos os grupos em relação ao grupo C, mostrando que a desnutrição e a terapia de eletroestimulação tiveram efeitos positivos na re-epitelização da lesão. Entretanto, a literatura aponta o oposto, sobre um possível atraso no processo cicatricial de feridas em quadros de desnutrição proteica, dada a importância desse nutriente para o seu desenvolvimento (Oishi et al., 2002; Legendre et al., 2008; Wild et al., 2010).

Esse fato pode ser explicado e sustentado pelos resultados encontrados de aumento da densidade de área de vasos sanguíneos e do número de leucócitos nos grupos desnutridos quando comparados aos grupos que

receberam dieta normoproteica, que indicam inflamação acentuada no sítio da ferida dada não só pela lesão mas também pela desnutrição. Os leucócitos em suas diversas formas celulares, tem um importante papel na cascata de cicatrização tecidual, já que liberam fatores de crescimento, favorecendo a ativação celular e a re-epitelização, direcionando o fechamento da ferida (Martin e Leibovich, 2005). Segundo Lucas et al. (2010), especificamente os macrófagos exercem papel fundamental na reparação tecidual e estão presentes durante todo o processo. Esses resultados concordam ainda com o exposto por Wild et al. (2010) que apontam prolongada fase inflamatória em animais desnutridos.

Os resultados de aumento do número de leucócitos e da densidade de área de vasos encontrados neste estudo concordam com o apresentado por Lucas et al. (2010), que afirmam que a vascularização da ferida é controlada pelo influxo de macrófagos durante a fase inflamatória da reparação tecidual. Além disso, os autores relatam que os macrófagos recrutados durante essa fase, influenciam não só na fase inicial, mas também nas fases seguintes do processo de cicatrização, no que diz respeito à formação do tecido de granulação e epitelização, mediados pela proliferação celular resultante, assim como na contração da ferida, já que os autores relacionam a atuação do macrófago com a diferenciação do miofibroblasto pela presença do TGF- β 1 e VEGF-A.

No presente estudo pôde-se ressaltar também a importância da eletroestimulação na aceleração de mecanismos que envolvem a epitelização, com resultados significativos dos grupos eletroestimulados em relação ao respectivo controle, mesmo quando a desnutrição se fazia um fator negativo

para isso. Esses resultados sustentam os encontrados por estudos que observam o aumento da migração de células epiteliais para o sítio da ferida quando tratadas por EEAV, especificamente com campo elétrico positivo, já que essas células apresentam polaridade oposta (Chu et al., 1990; Mertz, Davis e Cazzaniga, 1993). No entanto, Mertz, Davis e Cazzaniga (1993) demonstraram que a utilização dos dois polos em um período de sete dias promoveu epitelização 20% maior comparado à feridas tratadas com um polo específico.

No presente trabalho foi observado também que a EEAV aumenta a densidade de área de vasos, como já reportada por outros autores, que indicam aumento da microcirculação local e sugerem um estímulo à angiogênese (Sebastian et al., 2011; Ud-Din et al., 2012). Neste estudo não foi analisado a formação de novos vasos, mas a área ocupada por eles num espaço pré-determinado, indicando de forma geral o aumento de área ocupada pela microcirculação local.

A espessura da epiderme foi avaliada com vistas à analisar a qualidade da re-epitelização. Com isso, pôde-se observar que apesar da maior epitelização nos grupos desnutridos, a espessura desse epitélio é inferior. O grupo DC obteve o menor valor, apresentando um epitélio delgado e frágil que, como o grupo DT, diferiu estatisticamente dos controle (C e CT).

O grupo DTR mostrou aumento expressivo na espessura do epitélio, inclusive em relação ao DT, destacando e confirmando a importância da nutrição adequada somada à eletroestimulação, para que essa possa desempenhar seu melhor papel e apresentar uma cicatrização ideal. No entanto, a medida de Hedges aponta efeito grande tanto do grupo DT como do

DTR em relação ao DC, mostrando que mesmo sem a intervenção nutricional, a corrente elétrica apresenta um efeito importante na qualidade do epitélio.

O estudo de Sugiyama, Fujita e Kobayashi (2011) demonstrou que a desnutrição proteica causa diminuição da atividade proliferativa de células epidermais, inferindo que essa condição afeta negativamente a estrutura da epiderme. Assim, pode-se concluir que mesmo o organismo restaurando o tecido dadas as condições inflamatórias e de crescimento locais, a presença da desnutrição afetou a migração adequada dessas células, resultando em um tecido pouco estruturado. A EEAV foi capaz de minimizar essa situação, mas somente a associação com a dieta normoproteica mostrou um resultado significativamente melhor, alcançando os valores encontrados nos grupos controle.

Os grupos que receberam dieta hipoproteica por todo o período experimental e, em especial, o grupo DC, apresentaram diminuição no número de fibroblastos, porém apenas o DC teve redução significativa em relação ao CT, mostrando que a terapia de eletroestimulação tanto no CT quanto no DT, causou um impacto positivo na atração dessa célula. Estudos já demonstraram que a aplicação de polaridade negativa promove a atração de fibroblastos para o sítio da ferida, concordando com os achados deste estudo (Bourguignon et al., 1986).

Houghton et al. (2010) demonstraram que a estimulação elétrica induz ações celulares em quase todas as fases da cascata de cicatrização de feridas, incluindo a estimulação de várias atividades de fibroblastos, tais como a síntese de colágeno e de DNA, de adenosina trifosfato (ATP), influxo de cálcio, e um aumento no número de receptores para fator de crescimento. Resultados

semelhantes foram observados por Recio et al. (2012) que reportaram a eficácia da EEAV na cicatrização de feridas que não respondiam a tratamento padrão, como úlceras de pressão.

O presente trabalho confirma estes dados da literatura. Porém, apesar do efeito estimulante da EEAV sobre o número de fibroblastos, o protocolo de eletroestimulação utilizado não foi suficiente para compensar os efeitos da desnutrição. Quando os níveis de proteína foram adequados com dieta 14%, este recurso promoveu aumento do número de fibroblastos, alcançando os valores encontrados no grupo CT.

Esses resultados estão diretamente relacionados aos encontrados para a birrefringência do colágeno, considerando que estas células são responsáveis pela síntese de matriz extracelular, do qual o colágeno é um importante elemento. Assim, os resultados mostram diminuição no grupo DC e aumento gradativo com a aplicação de EEAV e de EEAV somado à dieta normoproteica, os quais alcançaram os valores apresentados pelo CT.

Os achados corroboram com o exposto por Wild et al. (2010), que afirmam a diminuição de fibroblastos encontrada na falta de proteína e, por sua vez, Tsai, Lin e Chao (2013), relatam que a aplicação de campos elétricos aumenta e direciona a migração fibroblástica e a produção de colágeno e que a polaridade específica é essencial para esse resultado. Especificamente, há na literatura consideráveis evidências de que os fibroblastos se direcionam para o campo elétrico carregado negativamente (Erickson e Nuccitelli, 1984; Bourguignon et al., 1986; Tsai, Lin e Chao, 2013).

Ao observar os resultados de epiderme e derme, entretanto, é notório a diferença de comportamento dessas camadas quando submetidas à

desnutrição e re-nutrição proteica. A epiderme tem um impacto maior no déficit proteico, com diminuição mais acentuada do que a derme. Assim, quando observamos a recuperação da derme com as intervenções, não há diferença estatística, já que a variação de espessura inicial, foi menor, diferente da epiderme. Isso pode estar relacionado ao fato que na derme houve maior densidade de área ocupada por vasos sanguíneos e leucócitos, influenciando na espessura do grupo desnutrido controle, que não apresentou redução tão acentuada quanto a epiderme nesse grupo. Além disso, a epiderme tem uma taxa de renovação mais rápida do que as proteínas da derme, principalmente do colágeno. Isso explica porque a recuperação da epiderme foi mais significativa do que da derme.

Os dados de áreas birrefringentes encontradas em cada grupo podem ser comparados com a análise da espessura da derme. Os grupos desnutridos apresentaram em consequência à diminuição de fibras colágenas, menor espessura da derme quando comparados aos grupos controle, porém os grupos DT e DTR mostraram aumento da espessura, com efeito grande sobre o grupo DC, em provável decorrência ao aumento do colágeno encontrado nesses grupos. A recuperação nutricional, no entanto, não mostrou qualquer superioridade nesse aspecto, talvez devido ao pouco tempo de dieta normoproteica (7 dias).

Oishi et al. (2002) investigaram as consequências diretas no colágeno, dada pela privação de proteína por oito dias e concluíram que essa condição afeta a síntese de tropocolágeno tipo I e III, mais acentuadamente do tipo III, assim como sua degradação pela colagenase. A colagenase tem sua importância no processo cicatricial por promover o processo de lise do

colágeno tipo III, menos estruturado, mediando a síntese do colágeno tipo I, sendo um importante aspecto da qualidade da cicatrização (Kirsner e Bogensberger, 2002).

No presente estudo não foi avaliada a proteína sintetizada pelos fibroblastos, tropocolágeno, como no trabalho de Oishi et al. (2002) e sim o colágeno já estruturado, por meio da sua birrefringência. Neste caso, a birrefringência está relacionada ao aumento de ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno, aumentando a cristalinidade e a agregação ordenada do colágeno tipo I (Vidal, 2010). Todo este processo demanda um tempo maior, motivo pelo qual pode-se pensar que resultados mais significativos poderiam ser alcançados com tempo maior de recuperação nutricional.

O trabalho de Costa et al. (2003) reforça este argumento, pois demonstrou melhora da resistência à ruptura da ferida e aumento nos níveis de colágeno maduro, por meio da suplementação oral de glutamina em ratos adultos durante 10 dias e, mais acentuadamente, por 15 dias, mas que não foram submetidos à desnutrição prévia.

Dos resultados aqui obtidos, pode-se concluir que a desnutrição proteica afeta significativamente a capacidade de regeneração tecidual da pele, promovendo uma cicatrização inadequada em relação à qualidade do tecido regenerado. Além disso, a desnutrição influencia o desenvolvimento das fases da cicatrização, imprescindíveis para a finalização adequada do quadro.

A terapia de eletroestimulação de alta voltagem firma seu importante papel na aceleração do processo de cicatrização ao proporcionar um ambiente celular adequado, mesmo num quadro proteico-energético insuficiente, promovendo a formação de um tecido mais estruturado e, portanto, de

qualidade. Porém, alguns aspectos, como a estruturação do epitélio regenerado, mostra a importância do quadro nutricional, especificamente proteico, no sentido de favorecer a terapia aplicada. Portanto, a EEAV e a intervenção nutricional não só minimizaram os efeitos na pele e no processo cicatricial dados pela desnutrição, mas também alcançaram os resultados obtidos no grupo controle tratado.

Esse estudo foi realizado em feridas cutâneas, sem quadros de doenças circulatórias adjacentes, comuns nos pacientes encontrados em clínicas e hospitais. Isso é devido à inviabilidade de indução de outras afecções concomitantemente à desnutrição, que já é um quadro bastante debilitante para o estudo em roedores, assim como da extensão dessa condição por mais de 7 dias. Além disso, o recurso utilizado, EEAV, para ser aplicado em animais, necessita de anestesia diária, o que provocaria uma perda amostral considerável, considerando este modelo experimental de organismo desnutrido. Com isso, o tratamento, bem como a intervenção nutricional foi realizada num curto período de tempo seguindo as condições de sobrevivência do animal e, dessa forma, aproximando-se mais da aplicabilidade clínica com a recuperação nutricional concomitante à fisioterapêutica.

Os resultados obtidos com este recurso fisioterapêutico em feridas neste estudo sugerem sua aplicação em pesquisas futuras em humanos, no que diz respeito ao conhecimento do estado nutricional dos pacientes, o qual pode alterar os resultados de terapias intervencionais e, que se adequado, pode otimizar ainda mais os resultados esperados e minimizar as complicações decorrentes.

CONCLUSÃO

Os resultados aqui obtidos permitem confirmar a hipótese de que a desnutrição influencia negativamente o processo de cicatrização, resultando em atrofia da epiderme e derme em regeneração. Além disso, a EEAV favorece esse processo, mas a intervenção nutricional proteica associada a este recurso mostrou-se ainda mais importante para a adequação do tecido neoformado, do ponto de vista histológico, apontando a importância de um tratamento interdisciplinar que propicie tais intervenções.

REFERÊNCIAS *

Amirkalali B, Sharifi F, Fakhrzadeh H, Mirarefein M, Ghaderpanahi M, Badamchizadeh Z et al. Low serum leptin serves as a biomarker of malnutrition in elderly patients. *Nutrition Research*. 2010; 30(5): 314-9.

Araújo MBS, Rocha PM. Trabalho em equipe: um desafio para a consolidação da estratégia de saúde da família. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*. 2007; 12(2): 455-464.

Arnold M, Barbul A. Nutrition and wound healing. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2006; 117(7 Suppl): 42S-58S.

Barker LA, Gout BS, Crowe TC. Hospital malnutrition: prevalence, identification and impact on patients and the healthcare system. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 2011; 8: 514-27.

Bavelaar JW, Otter CD, van Bodegraven AA, Thijs A, van Bokhorst-de van der Schueren MAE. Diagnosis and treatment of (disease-related) in-hospital malnutrition: The performance of medical and nursing staff. *Clinical Nutrition*. 2008; 27(3): 431-8.

Bettany JA, Fish DR, Mendel FC. Influence of cathodal high voltage pulsed current on acute edema. *Journal of Clinical Electrophysiology*. 1990; 2: 5-8.

Bouillanne O, Golmard JL, Coussieu C, Noël M, Durand D, Piette F et al. Leptin a new biological marker for evaluating malnutrition in elderly patients. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 61: 647-54.

Bourguignon G, Bergouignan M, Khorshed A et al. Effect of high voltage pulsed galvanic stimulation on human fibroblasts in cell culture. *The Journal of Cell Biology*. 1986; 103:344.

* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005.

Brown M, McDonnell MK, Menton DN. Polarity effects on wound healing using electric stimulation in rabbits. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 1989 Aug; 70(8): 624-7.

Brown M, Gogia PP, Sinacore DR, Menton DN. High voltage galvanic stimulation on wound healing in guinea pigs: Longer-term effects. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 1995; 76(12): 1134-7.

Coleman S, Gorecki C, Nelson EA, Closs SJ, Defloor T, Halfens F et al. Patient risk factors for pressure ulcer development: Systematic review. International Journal of Nursing Studies. 2013; 50: 974-1003.

[Correia MITD, Campos ACL. Prevalence of hospital malnutrition in Latin America: The multicenter ELAN study. Nutrition. 2003; 19\(10\): 823-5.](#)

Costa MA, Campos AC, Coelho JC, Barros AM, Matsumoto HM. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 2003; 27(3): 182-5.

Chu C-S, McManus A, Mason AJr, Okerberg C, Pruitt BJr. Multiple graft harvestings from deep partial-thickness scald wounds healed under the influence of weak direct current. The Journal of Trauma. 1990; 30(8): 1044-9.

Durlak JA. How to select, calculate, and interpret effect sizes. Journal of Pediatric Psychology. 2009; 34(9): 917-28.

Edington J, Boorman J, Durranat ER, Perkins A, Giffin CV, James R et al. Prevalence of malnutrition on admission to four hospitals in England. Clinical Nutrition. 2000; 19(3): 191-5.

Erickson CA, Nuccitelli R. Embryonic fibroblast motility and orientation can be influenced by physiological electric fields. The Journal of Cell Biology. 1984; 98(1): 296-307.

Gout, B.S.; Barker, L.A.; Crowe, T.C. Malnutrition identification, diagnosis and dietetic referrals: Are we doing a good enough job. *Nutrition & Dietetics*. 2009; 66: 206-11.

Houghton PE, Campbell KE, Fraser CH, Harris C, Keast DH, Potter PJ et al. Electrical stimulation therapy increases rate of healing of pressure ulcers in community-dwelling people with spinal cord injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2010; 91: 669-78.

Jünger M, Arnold A, Zuder D, Stahl HW. Local therapy and treatment costs of chronic, venous leg ulcers with electrical stimulation (Dermapulses): A prospective, placebo controlled, double blind trial. *Wound Repair and Regeneration*. 2008; 16: 480-7.

Kincaid CB, Lavoil KH. Inhibition of bacterial growth in vitro following stimulation with high voltage, monophasic, pulsed current. *Physical Therapy*. 1989; 69(8):651-5.

Kirsner RS, Bogensberger G. The normal process of healing. In: Kloth LC, McCulloch JM. *Wound Healing: Alternatives in Management*, Philadelphia: F.A. Davis Company. 2002, p. 3-30.

Kloth LC, McCulloch JM. Promotion of wound healing with electrical stimulation. *Advances in Skin & Wound Care*. 1996; 9(5): 42-5.

Komesu MC, Cavenaghi FM, di Matteo MAS, Dekker NP, Moraes EAS. Long-term effect of early protein/calorie malnutrition on bFGF availability in rat skin. *Nutrition Research*. 2003; 23: 1555-67.

Kuzuya M, Izawa S, Enoki H, Okada K, Iguchi A. Is serum albumin a good marker for malnutrition in the physically impaired elderly? *Clinical Nutrition*. 2007; 26: 84-90.

Legendre C, Debure C, Meaume S, Lok C, Golmard JL, Senet P. Impact of protein deficiency on venous ulcer healing. *Journal of Vascular Surgery*. 2008; 48(3): 688-93.

Lim Y, Levy MA, Bray TM. Dietary supplementation of N-acetylcysteine enhances early inflammatory responses during cutaneous wound healing in protein malnourished mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2006; 17: 328-36.

Lipsey MW, Wilson DB. The efficacy of psychological, educational and behavioural treatment: confirmation from meta-analysis. *The American of Psychiatry*. 1993; 48(12):1181–209.

Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *The Journal of Immunology*. 2010; 184: 3964-77.

Mandarim-De-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. In: Hewitson TD, Darby JA (Editors), *Histology protocols: methods in molecular biology*. New Jersey: Humana Press. 2010; 211-25.

[Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar. Brasília DF: Ministério da Saúde; 2005.](#)

[Martin P, Leibovich JS. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*. 2005; 15\(11\): 599-607.](#)

Matos LS, Duarte NLV, Minetto RC. Incidência e prevalência de úlcera por pressão no CTI de um Hospital Público do DF. *Revista Eletrônica de Enfermagem*. 2010; 12(4): 719-26.

Mechanick JI. Practical aspects of nutrition for wound healing patients. *The American Journal of Surgery*. 2004; 188 (1A Suppl): 52-6.

Mehmandoust FG, Torkaman G, Firoozabadi M, Talebi G. Anodal and cathodal pulsed electrical stimulation on skin wound healing in guinea pigs. *Journal of Rehabilitation Research & Development*. 2007; 44(4): 611-8.

Mello ED, Beghetto MG, Teixeira LB, Luft VC. Desnutrição hospitalar cinco anos após o IBRANUTRI. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. 2003; 18(2): 65-9.

Mertz P, Davis S, Cazzaniga A, et al. Electrical stimulation: acceleration of soft tissue repair by varying the polarity. *Wounds*. 1993; 5(3): 153-9.

Minatel DG, Enwemeka CS, França SC, Frade MA. Phototherapy (LEDs 660/890nm) in the treatment of leg ulcers in diabetic patients: case study. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2009; 84(3): 279-83.

Modolin M, [Bevilacqua RG](#), [Margarido NF](#), [Lima-Gonçalves E](#). The effects of protein malnutrition on wound contraction: an experimental study. *Annals of Plastic Surgery*. 1984; 12: 428-30.

Moore Z, Cowman S. Pressure ulcer prevalence and prevention practices in care of the older person in the Republic of Ireland. *Journal of Clinical Nursing*. 2011; 21: 362-71.

Neiva CM, Guerino MR, Melo MAR. Análise dos efeitos da desnutrição proteico-calórica sobre as respostas ao exercício agudo (single session) parâmetros metabólicos. *Motriz*. 1999; 1(1): 32-7.

Nishimura KY, Isseroff RR, Nuccitelli R. Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds. *Journal of Cell Science*. 1996; 109: 199-207.

Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistela V. Effects of early malnutrition and nutrition rehabilitation in rats. *Journal of Pediatrics*. 2002; 77: 39-44.

Oishi Y, Zhengwei F, Ohnuki Y, Kato H, Noguchi T. Effects of protein deprivation on $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(III)$ collagen and its degrading system in rat skin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2002; 66: 117-26.

Onis M, Frongillo EA, Blössner M. Is malnutrition declining? An analysis of changes in levels of child malnutrition since 1980. *Bull World Health Organ*. 2000; 78(10): 1222-33.

Otero UB, Rozenfeld S, Gadelha AMJ, Carvalho MS. Mortalidade por desnutrição em idosos, região Sudeste do Brasil, 1980-1997. *Revista de Saúde Pública*. 2002; 36(2): 141-8.

Pezolato VA, Mascarin AL, Paulino PC, Silva CA. Padrão eletrocardiográfico de ratos após recuperação nutricional. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2013; 46(3): 281-8.

Pinheiro ALB, Meireles GCS, Carvalho CM, Vieira ALB, Santos JN, Ramalho LMP. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished wistar rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2006; 24(5): 616–24.

Pinheiro ALB, Meireles GCS, Carvalho CM, Santos JN, Ramalho LMP. Biomodulative effects of visible and ir laser light on the healing of cutaneous wounds of nourished and undernourished wistar rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009; 27(6): 947-57.

[Pirlich M, Schütz T, Norman K, Gastell S, Lübke HJ, Bischoff SC et al. The German hospital malnutrition study. *Clinical Nutrition*. 2006; 25\(4\): 563-72.](#)

Raffoul W, Far MS, Cayeux MC, Berger MM. Nutritional status and food intake in nine patients with chronic low-limb ulcers and pressure ulcers: importance of oral supplements. *Nutrition*. 2006; 22: 82-8.

Recio AC, Felter CE, Schneider AC, McDonald JW. High voltage electrical stimulation for the management of stage III and IV pressure ulcers among adults with spinal cord injury: demonstration of its utility for recalcitrant wounds below the level of injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine*. 2012; 35(1): 58-63.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*. 1993; 123(11): 1939-51.

Reid CL, Campbell IT. Metabolic physiology. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2004; 15: 209-17.

Rezende IFB, Oliveira VS, Kuwano EA, Leite APB, Rios I, Dórea YSS et al. Prevalência da desnutrição hospitalar em pacientes internados em um hospital filantrópico em Salvador (BA), Brasil. *Revista de Ciências Médicas Biológicas*. 2004; 3(2): 194-200.

Robson MC, Hill D, Woodske ME, Steed DL. Wound healing trajectories as predictors of effectiveness of therapeutic agents. *Archives of Surgery*. 2000; 135: 773-7.

Rogenski NMB, Santos VLCG. Estudo sobre a incidência de úlceras por pressão em um hospital universitário. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 2005; 13(4): 474-80.

Rogenski NMB, Kurcgant P. Incidência de úlceras por pressão após a implementação de um protocolo de prevenção. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 2012; 20(2): [07 telas].

Saúde nutricional: saúde e estado nutricional de crianças menores de cinco anos. [homepage na internet]. Ministério da Saúde: Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher 2006. [Acesso 2014 Ago 28]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/pnds/saude_nutricional.php

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

Sebastian A, Syed F, Perry D, Balamurugan V, Colthurst J, Chaudhry IH et al. Acceleration of cutaneous healing by electrical stimulation: Degenerate electrical waveform down-regulates inflammation, up-regulates angiogenesis and advances remodeling in temporal punch biopsies in a human volunteer study. *Wound Repair and Regeneration*. 2011; 19: 693-708.

Shaw J, Bell PM. Global perspective on diabetic foot ulcerations. In: DINH, Thanh. *Wound measurement in diabetic foot ulceration*. United Kingdom, p.71-82, 2011.

Silva EWNL, Araújo RA, Oliveira EC, Falcão VTFL. Aplicabilidade do protocolo de prevenção de úlcera de pressão em unidade de terapia intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2010; 22(2): 175-85.

Silva DP, Barbosa MH, Araújo DF, Oliveira LP, Melo AF. Úlcera por pressão: avaliação de fatores de risco em pacientes internados em um hospital universitário. *Revista Eletrônica de Enfermagem*. 2011; 13(1): 118-23.

Stratton RJ, Ek AC, Engfer M, Moore Z, Rigby P, Wolfe R. Enteral nutritional support in prevention and treatment of pressure ulcers: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*. 2005; 4(3): 422-50.

Sugiyama A, Fujita Y, Kobayashi T. Effect of protein malnutrition on the skin epidermis of hairless mice. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2011; 73(6): 831-5.

The State of Food Insecurity in the World 2013: The multiple dimensions of food security. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013.

Thomas, D.R. Improving outcome of pressure ulcers with nutritional interventions: a review of the evidence. *Nutrition*. 2001; 17: 121-5.

Tsai CH, Lin BJ, Chao PHG. $\alpha 2\beta 1$ integrin and RhoA mediates electric field-induced ligament fibroblast migration directionality. *Journal of Orthopaedic Research*. 2013; 31: 322-7.

Vidal B C. Form birefringence as applied to biopolymer and inorganic material supraorganization. *Biotechnic & Histochemistry*. 2010; 85(6): 365-78.

Ud-Din S, Perry D, Giddings P, Colthurst J, Zaman K, Cotton S et al. Electrical stimulation increases blood flow and haemoglobin levels in acute cutaneous wounds without affecting wound closure time: evidenced by non-invasive assessment of temporal biopsy wounds in human volunteers. *Experimental Dermatology*. 2012; 21: 758-64.

Waitzberg DL, Caiaffa WT, Correia ITD: Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): A study of 4000 patients. *Nutrition*. 2001; 17(7/8): 573-80.

Waitzberg DL, Caiaffa WT, Correia MI. Inquérito brasileiro de avaliação nutricional hospitalar (IBRANUTRI). *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. 1999; 14: 124-34.

Wild T, Rahbarnia A, Kellner M, Sobotka L, Eberlein T. Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition*. 2010; 26: 862-6.

Williams JZ, Barbul A. Nutrition and wound healing. *Surgical Clinics of North America*. 2003; 83: 571-96.

Wykes LJ, Fiorotto M, Burrin DG, DelRosario M, Frazer ME, Pond WG et al. Chronic Low Protein Intake Reduces Tissue Protein Synthesis in a Pig Model of Protein Malnutrition. *Journal of Nutrition*. 1996; 126(5): 1481-8.

ANEXO 1

Universidade Metodista de Piracicaba
Comissão de Ética sobre o Uso de Animais



Piracicaba, 18 de setembro de 2013

Para: Profa. Maria Luiza Ozores Polacow
De: Comissão de Ética no Uso de Animais
Ref.: Aprovação do protocolo de pesquisa nº 08/2013

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba **APROVOU** o protocolo de aula prática nº 08/13 intitulado "*Estimulação elétrica de alta voltagem em úlceras cutâneas de ratos desnutridos e recuperados*" analisado por esta comissão.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "Carlos Alberto da Silva".

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva