

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem com alternância de polaridade na lesão tegumentar: análise histopatológica em ratos

Lara Duarte de Figueiredo Arrais

2011

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LARA DUARTE DE FIGUEIREDO ARRAIS

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE
ALTA VOLTAGEM COM ALTERNÂNCIA DE
POLARIDADE NA LESÃO TEGUMENTAR:
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM RATOS

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Elaine Caldeira de Oliveira Guirro

PIRACICABA
2011

Arrais, Lara Duarte de Figueiredo.

Efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem com alternância de polaridade na lesão tegumentar: análise histopatológica em ratos / Lara Duarte de Figueiredo Arrais – Piracicaba, 2011.

51 f.

Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia - Faculdade de Ciências da Saúde / Universidade Metodista de Piracicaba.

Orientador: Profa. Dra. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro.

I. Fisioterapia. 2. Cicatrização. 3. Estimulação elétrica. I. Guirro, Elaine Caldeira de Oliveira. II. Título.

CDU: 615.8

Dedico este trabalho a Deus. Não a um Deus distante, mas a um Deus que se fez e se faz presente em todos os momentos. Deus que cuida, ensina e ama.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo Seu infinito amor e proteção, que sempre me iluminou e guiou meu caminho. Agradeço, Senhor, por tudo que já recebi e reconheço que tudo o que eu possa conquistar vem de Ti.

Aos meus amados pais, **Lourenço e Ana Maria**, por sempre buscarem o meu melhor, abrindo mão de tantas coisas em favor de mim, da minha formação. Obrigada por me ensinarem tudo que sou hoje. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, **Lourenço Filho e Lissa**, companheiros (mesmo que distante) em todos os momentos.

A minha avó **Luiza**, por abrir mão da sua casa para acompanhar meus estudos ainda criança. Sua convivência foi essencial para o meu crescimento.

As queridas primas, **Fernanda, Mônica, Carol, Natália, Luiza e Ailana**, vocês são mais que isso, são irmãs, amigas! Obrigada por tantas alegrias proporcionadas. Vocês, mesmo que distantes, participaram desta conquista.

Ao meu noivo, **Leonardo**, obrigada pelo apoio, ajuda, paciência e compreensão ao longo desta caminhada. Por sempre acreditar em mim, por sempre almejar meu crescimento profissional. Obrigada por tudo. Eu te amo muito!

Aos meus queridos amigos, em especial...

A **Cecília Costa**, minha amiga de colégio e da vida toda. Obrigada por desculpar minha ausência durante todo esse período. Por sempre me dar força e nunca me deixar desanimar. Sua alegria é contagiante.

A **Amanda Lobão**, minha eterna dupla. Agradeço pelo seu carinho e atenção, por cultivar nossa amizade, por torcer pelas minhas vitórias.

A **Alice Carneiro, Fabrine Lago, Fernanda Martins, Mariana Celedônio, Nathália Vasconcelos, Priscilla Sá e Sarah Oliveira**, o convívio com vocês deixou a faculdade mais divertida. Amigas, vocês ajudaram em cada degrau dessa conquista.

A **Jalda (Nenem)** pelo convívio diário durante todos esses anos. Obrigada pela dedicação e companhia.

A **dona Terezinha**, um anjo que Deus colocou na minha vida! Você foi minha família em Piracicaba. Obrigada pelo carinho, cuidado e dedicação dados a mim. Você não poupou esforços para me deixar a vontade e sua bondade tornou os meus dias longe de casa mais fáceis. Muito obrigada!

Aos amigos do Mestrado em especial...

A **Teresa Carmelita (Carmê)**, que me ajudou literalmente do primeiro ao último dia! Seu carinho e alegria foram fundamentais. Sua convivência me ensinou muito. Você foi e é importante demais para mim. Eu te amo e te admiro.

A **Camila Pacheco** por me fazer sentir a vontade num mundo tão estranho para mim! Cabelinho, obrigada por tudo!

A **Elvyna Rego** por não medir esforços para me ajudar, abrindo as portas da sua casa e seu coração. Obrigada pelo convívio diário, pelas caronas, pelas risadas e tudo mais. Elvis, Deus diz que há amigos mais chegados que um irmão e você é uma dessas!

A **Aline Macedo**, pela companhia, por compartilhar comigo a saudade, as alegrias, as angústias, os passeios. Ali, muito obrigada!

A **Almir Dibai**, por compartilhar todo seu conhecimento nas mais diversas áreas, por toda ajuda na composição desta dissertação, pelo convívio e pelas lembranças nordestinas. Ai, você é demais.

A **Michelle do Ouro**, por toda ajuda dada neste período, pelas conversas e conselhos. Mi, obrigada por tudo.

A **Vanessa Feitosa, Carolina Ribeiro, Ana Cláudia, Bruna Junqueira** e todos os amigos que colaboram durante esta etapa. Obrigada a cada um de vocês pelo convívio e ajuda.

A **Cris**, pelo bom convívio e por disponibilizar parte do seu tempo para me ajudar.

A todos os professores do PPG – Fisioterapia, em especial...

A **professora Maria Luiza**, participação fundamental neste trabalho. Obrigada por toda ajuda e dedicação. Foi uma honra tê-la como mestre. Seus ensinamentos, conversas, apoio e carinho me ajudaram a prosseguir. Você foi parte importante desta caminhada.

Aos **professores Carlos Silva, Maria Imaculada e Rosana Teodori** por colaborarem para o enriquecimento deste trabalho e para a minha formação como mestre. Vocês são exemplos de docentes.

A **professora Elaine Guirro**, por transmitir conhecimentos tão importantes. Sua ajuda e disposição tornaram o meu sonho real. Obrigada por toda orientação.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento”

RESUMO

A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) tem demonstrado ser uma boa opção no reparo de lesões cutâneas, porém parâmetros ideais para a estimulação não estão estabelecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da EEAV com alternância de polaridade sobre as características morfométricas da regeneração tegumentar aguda. Para tanto, foram utilizados 21 ratos Wistar com peso médio de $261,2 \pm 36,5$ gramas, distribuídos em três grupos: controle (GC), animais com lesão, porém não tratados; sham (GS), animais com lesão e submetidos ao tratamento placebo; e eletroestimulado (GE), animais com lesão e tratados com EEAV. Os animais foram submetidos a remoção cirúrgica de 1 cm^2 de pele da região dorsal mediana. Após 24 horas foram submetidos a EEAV catódica no primeiro dia, anódica no segundo dia, alternando-se sucessivamente, diariamente, durante 30 minutos (por 7 dias), frequência de 100 Hz, tensão mínima de 100 V. As medidas lineares (em μm) da reepitelização foram obtidas a partir do bordo da lesão até a extremidade do epitélio em regeneração. Para as análises histométricas foram captadas imagens de três áreas em cada corte, além de ser obtida a densidade de área de vasos sanguíneos. A área da lesão foi avaliada por meio de três registros fotográficos e posteriormente avaliada por um programa computacional (Area[®]). A análise estatística foi realizada através do software STATISTICA – versão 10. As variáveis reepitelização, densidade da área dos vasos sanguíneos e contagem de células foram avaliadas por análises não paramétricas de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas de Dunn. A variável área da lesão foi avaliada por análises paramétricas para modelos de dois fatores cruzados e interação e análises de variâncias para modelos com um fator. As comparações múltiplas foram obtidas através do critério paramétrico de Tukey HSD. Adotou-se o nível de significância $p \leq 0,05$. A reepitelização foi superior ($p < 0,0001$) no grupo eletroestimulado e não houve diferença significativa entre o grupo controle e sham. A densidade de área dos vasos sanguíneos não foi diferente entre os grupos. Quanto ao número de fibroblastos, constatou-se que os grupos controle e sham não diferiram entre si, entretanto foram numericamente maiores ($p < 0,0001$) que o grupo eletroestimulado. Em relação aos leucócitos, os resultados apontam que os grupos controle e sham não diferiram entre si e apresentaram números menores ($p < 0,0001$) que o grupo eletroestimulado. Não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos para o número de fibrócitos. Para a variável área da lesão, houve diferença significativa entre os efeitos de grupos imediatamente após a lesão ($p = 0,0262$) e após 7 dias ($p = 0,0002$) sendo que o GS obteve uma área significativamente maior, mas não houve diferença após 4 dias ($p = 0,1374$) e entre os efeitos de datas em todos os grupos, sempre com $p < 0,0001$. Conclui-se que, nas condições experimentais utilizadas, a intervenção terapêutica com EEAV alternando-se a polaridade contribuiu positivamente para cicatrização da ferida.

Palavras-chave: cicatrização, estimulação elétrica, fisioterapia

ABSTRACT

The high-voltage stimulation (HVS) has proven to be a good option for repairing skin lesions. However ideal parameters for the stimulation are not established. The purpose of this study was to evaluate the effects of HVS with alternating polarity on the morphometric characteristics of acute cutaneous regeneration. For this purpose, we used 21 male Wistar rats average weight of 261.2 ± 36.5 grams, divided into three groups: control (CG), animals with lesions, but not treated, sham group (SG), animals with lesions and subjected to placebo treatment, and stimulated (EG), animals with lesions and treated with HVS. The animals underwent surgical removal of 1 cm^2 of skin of the dorsal median region. After 24 hours they were subjected to cathodic EEAV the first day, anode on the second day, alternating successively daily for 30 minutes (for 7 days), frequency of 100 Hz, minimum voltage of 100 V. Linear measurements (in μm) of reepithelialization were obtained considering the edge of the lesion until the end of the regenerating epithelium. In order to obtain histometric analysis, images of three areas in each section were obtained. In addition, it was obtained the density of blood vessels area. The area of injury was assessed by three photographic records and subsequently evaluated by a computer program (Area[®]). Statistical analysis was performed using the STATISTICA software - version 10. The variables reepithelialization, density of blood vessels area and cell count analysis was performed nonparametric Kruskal-Wallis and Dunn multiple comparison. The variable area of the lesion it was performed parametric analysis for models of two crossed factors, interaction and analysis of variance for models with one factor. The multiple comparisons were obtained by parametric Tukey HSD test. It was adopted the significance level of $\alpha=0.05$. The reepithelialization was higher ($p<0.0001$) in the stimulated group. There was no significant difference between the control and sham groups. The density of blood vessels area was not different amongst groups. Regarding the number of fibroblasts, it was found that the control and sham groups did not differ, but were numerically higher ($p<0.0001$) than the stimulated group. Considering the leukocytes, the results indicate that the control and sham groups did not differ and have a number ($p<0.0001$) smaller than the stimulated groups. There were no significant differences amongst groups for the number of fibrocytes. For the variable area of the lesion there was significant difference in the effect amongst groups immediately after injury ($p=0.0262$) and after 7 days ($p=0.0002$) being that the SG has had a greater area significative, but no difference after 4 days ($p=0.1374$) and amongst the effects of dates in all groups, always with $p<0.0001$. We conclude that the therapeutic intervention used with alternating polarity HVS contributed positively to the resolution of the wound.

Keywords: wound healing, electric stimulation, physical therapy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 AMOSTRA	18
3.1.1 Animais	18
3.1.2 Grupos experimentais	18
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	18
3.2.1 Procedimento cirúrgico	18
3.2.2 Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV)	19
3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	21
3.3.1 Análise histológica	21
3.3.2 Registro fotográfico	23
3.4 ANÁLISE DOS DADOS	25
4 RESULTADOS	26
4.1 REEPITELIZAÇÃO	26
4.1.1 Aspectos descritivos	26
4.1.2 Avaliação dos efeitos de grupos	26
4.2 DENSIDADE DE ÁREA DOS VASOS SANGUÍNEOS	28
4.2.1 Aspectos descritivos	28
4.2.2 Avaliação dos efeitos de grupos	28
4.3 CONTAGEM DE CÉLULAS	30
4.3.1 FIBROBLASTOS	30
4.3.1.1 Aspectos descritivos	30

4.3.1.2 Avaliação dos efeitos de grupos	30
4.3.2 LEUCÓCITOS	32
4.3.2.1 Aspectos descritivos	32
4.3.2.2 Avaliação dos efeitos de grupos	32
4.3.3 FIBRÓCITOS	34
4.3.3.1 Aspectos descritivos	34
4.3.3.2 Avaliação dos efeitos de grupos	34
4.4 ÁREA DA LESÃO	36
4.4.1 Aspectos descritivos	36
4.4.2 Efeitos de grupos <i>versus</i> momentos	36
4.4.3 Avaliação dos efeitos por momento e por grupo	37
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO	51

1 INTRODUÇÃO

Manter a integridade da pele é um processo complexo e a perda dessa integridade constitui-se de uma ferida de pele, que pode ser causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica. Sem tratamento adequado, incisões cirúrgicas, ferimentos e queimaduras podem ter graves consequências (Waldron e Trevor, 1998; Blanes, 2004; Wysocki, 2007).

Uma lesão de pele caracteriza-se então pela interrupção da continuidade de proteção corporal e perda da integridade do tegumento deixando-o exposto a qualquer tipo de contaminação e, quando ocorre, é instalada uma ferida e se inicia o processo de cicatrização (Hess, 2002; Byl, 2003; Meneghin, Vattimo, 2003).

Tendo em vista a importância da fase de contração da ferida no fechamento da lesão tegumentar, se torna viável a possibilidade de acelerar a cicatrização e o fechamento destas lesões através de recursos quimio-medicamentosos ou físicos (Araújo, 1997; Anastácio, 2000; Ferreira, 2005).

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos e danos tissulares de qualquer natureza desencadeiam de imediato uma série de eventos que caracterizam o processo cicatricial. Diversos fatores estão envolvidos neste processo, porém existe a possibilidade de acelerá-lo através da estimulação elétrica (Cotran, Kumar, Collins, 2001; Frank et al. 1995; Balbino, Pereira, Curi, 2005).

Uma lesão que interrompe a camada epitelial instantaneamente gera campos elétricos endógenos e estes desempenham um papel primordial na condução da migração celular na cicatrização epitelial. Os campos elétricos

são, portanto um sinal fundamental que orienta a migração celular na cicatrização de feridas (Zhao, 2009).

O uso da estimulação elétrica na cicatrização de feridas baseia-se no fato de que a mesma pode incrementar o fluxo sanguíneo (Mohr, Akers, Wessman, 1987) e resistência elástica da ferida (Brown et al., 1995), estimular a síntese de proteínas e DNA em fibroblastos humanos (Bourguignon, Bourguignon, 1987), ajudar na redução de edema (Reed, 1988), inibir o crescimento bacteriano (Kincaid, Lavoie, 1989) e promover migração epitelial (Alvarez et al., 1983; Brown, McDonnell, Menton, 1989).

Sabe-se que potenciais elétricos endógenos desempenham um papel significativo nos principais processos biológicos, como embriogênese, cicatrização de feridas e regeneração de tecidos, sendo um dos seus principais efeitos a galvanotaxia, que é o movimento direcional de células no sentido do cátodo ou do ânodo em resposta a correntes elétricas aplicadas no local. Porém o efeito de correntes exógenas sobre o ferimento pode aumentar este efeito de “bateria” da pele, incrementando a cicatrização (Feeder, Kloth, Gentzkow, 1991; Mycielska, Djamgoz, 2004).

Dentro desse contexto, a estimulação elétrica tem demonstrado ser uma boa opção no reparo de lesões cutâneas, sendo fundamentada por evidências científicas. A EEAV vem também ganhando aceitação tanto na pesquisa quanto na área clínica (Brown e Gogia, 1987; Peters et al., 2001; Garcia e Guirro, 2005).

Por possuir baixa amperagem, baixa densidade de corrente e curta duração de pulso, a EEAV é usualmente bem tolerada pelo paciente (Brown e Gogia, 1987; Byl, 2003; Davini et al., 2005).

Embora existam muitas formas de onda disponíveis em equipamentos de eletroterapia, o mais detalhado e constantemente avaliado *in vitro*, em estudos animais e em ensaios clínicos controlados é a forma monofásica da EEAV. Dispositivos de EEAV também permitem a seleção da polaridade a ser utilizada e a variação nas taxas de pulso, o que parece ser importante na cicatrização de feridas (Gentzkow, 1993).

Atribui-se à polaridade negativa a estimulação do tecido de granulação, incremento do fluxo sanguíneo, diminuição de edema e de tecido necrosado, proliferação de fibroblastos e produção de colágeno e migração de leucócitos e células epidérmicas. Os efeitos apontados como inerentes à estimulação com a polaridade positiva são o estímulo à epitelização, indução da coagulação sanguínea, desnaturação protéica, redução de mastócitos na ferida e indução da migração de macrófagos para o leito da ferida, além de um efeito bactericida indireto que é então esperado da estimulação elétrica (Brown, McDonnell e Menton, 1988; Gentzkow, 1993; Cukjati, Savrin, 2004).

Merriman et al. (2004) encontraram efeito inibitório para o crescimento bacteriano com a utilização da EEAV com polaridade positiva e negativa e este efeito foi maior do que o encontrado com os demais tipos de corrente utilizadas no estudo. Entretanto, não houve diferença significativa entre os dois pólos e seus resultados sugerem que o efeito inibitório bacteriano possa contribuir reforçando a cicatrização de feridas.

Estudando seis tipos de bactérias patogênicas comuns em feridas crônicas, Daeschlein et al. (2007) concluíram que a polaridade positiva da corrente de baixa voltagem teve um maior efeito bactericida quando comparada à negativa. Kincaid e Lavoie (1989) verificaram a inibição do crescimento

bacteriano *in vitro* utilizando EEAV e constataram inibição do crescimento, tanto com a polaridade positiva quanto com a negativa.

Brown, McDonnell e Menton (1989) sugerem que há uma maior taxa de epitelização em coelhos tratados com EEAV quando comparados a animais controle. Griffin et al. (1991) observaram redução significativa no tamanho de úlceras de pressão tratadas com EEAV quando comparadas as que tiveram tratamento placebo. Brown et al. (1995) verificaram os efeitos da mesma corrente a longo prazo em feridas de pele em cobaias e sugerem uma tendência maior à resistência elástica na pele das feridas tratadas.

Na maioria dos estudos, a polaridade do eletrodo usado no ferimento é trocada periodicamente. Embora não haja concordância sobre os efeitos inerentes as polaridades, muitos autores sugerem que estimulação elétrica alternada produz fechamento mais rápido e com maior resistência do tecido à tração (Brown, McDonnell, Menton, 1989; Feeder, Kloth, Gentzkow, 1991; Karnes et al., 1995; Santos, Nascimento, Andrade, 2009).

Kloth e McCulloch (1996) apontaram que a mudança de polaridade é especialmente importante na cicatrização de feridas quando esta está diminuída ou ocorrendo de forma lenta. Geralmente o tratamento é iniciado com a polaridade negativa e esta é mantida por sete dias e em seguida é usada a polaridade positiva por pelo menos três dias ou alterna-se a polaridade (Feeder, Kloth, Gentzkow, 1991; Sussman, Byl, 1998).

Embora a estimulação elétrica seja utilizada com sucesso em lesões de diferentes etiologias, parâmetros ideais de estimulação para a EEAV não têm sido estabelecidos, portanto não existe consenso sobre os parâmetros físicos mais eficientes, visto que estudos indicam que a cicatrização de feridas pode

ou não ser melhorada dependendo da polaridade do eletrodo ativo (Brown, McDonnell, Menton, 1989). Justifica-se então a importância da investigação dos efeitos de procedimentos com parâmetros físicos diferentes no tratamento de lesões cutâneas agudas.

Diante do exposto, a hipótese do estudo configura-se na possibilidade da EEAV com pólos alternados abreviar o processo de regeneração tecidual nas características morfométricas da lesão aguda em ratos.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da EEAV com alternância de polaridade sobre as características morfométricas da regeneração tegumentar aguda em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

3.1.1 Animais

Foram utilizados 21 ratos *Wistar* com idade entre 3 e 4 meses e peso médio de $261,2 \pm 36,5$ gramas. Os animais foram confinados em gaiolas individuais, alimentados com ração e água *ad libitum*, período claro/escuro de 12/12 horas e temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos sob o protocolo nº 002/2010 (ANEXO).

3.1.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: controle (GC), animais com lesão, porém não tratados ($n=7$); sham (GS), animais com lesão e submetidos ao tratamento placebo ($n=7$) e eletroestimulado (GE), animais com lesão e tratados com EEAV ($n=7$).

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Dopalen[®] (Cloridrato de Cetamina) 1,16g/10mL e Rompun[®] (Cloridrato de Xilazina) 2g/100mL, na proporção 3:2, em dose de 0,09mL/100g e 0,06mL/100g de massa corporal, respectivamente, via intramuscular e tiveram o dorso (GC, GS e GE) e o abdome (GS e GE) tricotomizados para serem submetidos à incisão

cirúrgica. Foi removido 1 cm² de pele (região dorsal mediana, próximo ao plexo cervical) incluindo a hipoderme, utilizando um gabarito vazado milimetrado de plástico e bisturi de lâmina 11 (Figura 1).

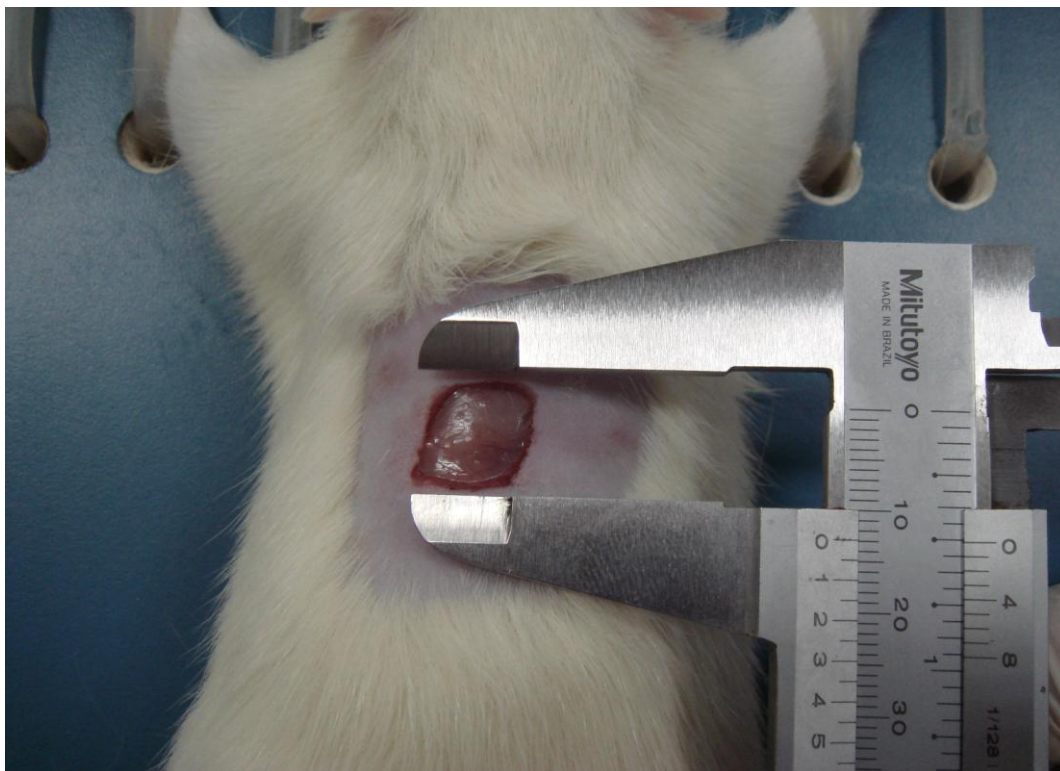


Figura 1 – Lesão cirúrgica medindo 1 cm², incluindo hipoderme, efetuada na região dorsal dos animais dos grupos controle (GC), sham (GS) e eletroestimulado (GE) medida com paquímetro Mitutoyo®.

3.2.2 Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV)

Os animais foram estimulados de forma consecutiva e ininterrupta, iniciando-se 24 horas após a cirurgia, no mesmo período do dia, com o equipamento Neurodyn High Volt – ANVISA 10360310008 - IBRAMED® (Figura 2) devidamente calibrado. O tratamento foi feito mediante anestesia intramuscular com metade da dose utilizada para o procedimento cirúrgico e teve início com estimulação catódica no primeiro dia, anódica no segundo dia e assim sucessivamente, atingindo sempre o limiar motor, sendo realizado

diariamente, durante 30 minutos (por 7 dias), frequência de 100 Hz, tensão mínima de 100 V. O eletrodo ativo de silicone-carbono, medindo 2x2 cm, foi posicionado sobre a lesão cirúrgica e outro, dispersivo, medindo 4x4 cm, foi posicionado no abdome. Utilizou-se gaze estéril embebida em soro fisiológico sob o eletrodo ativo e gel estéril como meio de acoplamento sob o eletrodo dispersivo.



Figura 2 – Equipamento de EEAU utilizado para estimulação do grupo eletroestimulado (GE).

O GS também foi anestesiado e devidamente preparado para receber a estimulação elétrica, porém o equipamento não foi ligado (tratamento placebo) e os animais do GC foram mantidos em biotério.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.3.1 Análise histológica

Após a eutanásia dos animais, que ocorreu no 8º dia de experimento, as lesões foram removidas com uma fração de pele intacta ao redor das mesmas e preparadas para análise histológica.

Os procedimentos realizados para preparação das amostras envolveram a fixação, desidratação, diafanização, embebição e a inclusão ou emblocagem. Na fixação, os segmentos de pele foram fixados em solução tamponada de formol a 10% por 48 horas. A desidratação consistiu-se na passagem da peça em concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 90% e 100%) com o objetivo de eliminar toda a água contida no material. O processo de diafanização consistiu-se em 3 trocas de xilol para retirada do álcool da etapa anterior e preparo da peça para a imersão em parafina líquida. Na embebição colocou-se a peça em um recipiente com parafina líquida à temperatura de 56°C e realizou-se 3 trocas para que a parafina se infiltrasse em todo o interior da peça e na inclusão ou emblocagem, que foi realizada após a embebição, o material foi incluído em parafina líquida. Em seguida, a peça foi encaminhada para microtomia e cortes transversais não seriados com 6 µm de espessura foram corados por Hematoxilina-Eosina.

As medidas lineares (em µm) da reepitelização foram obtidas a partir do bordo da lesão até a extremidade do epitélio em regeneração em ambos os bordos. Os valores das duas bordas foram somados em 15 cortes não seriados por animal com auxílio de uma ocular milimetrada Zeiss utilizando objetiva de 4X. Com o objetivo de corrigir a distorção do aumento, ao final da

análise foi realizada a calibração da objetiva por meio do coeficiente micrométrico, segundo Mandarin de Lacerda (1994).

Para as análises histométricas foram captadas imagens de três áreas em cada corte (em cinco cortes não seriados por animal) com dimensões sempre iguais e conhecidas ($10.772,96 \mu\text{m}^2$): duas áreas próximas aos bordos laterais e uma central, totalizando 15 áreas por animal, onde foram computados os números de fibroblastos, leucócitos e fibrócitos obtidas pelo sistema de análise de imagens *Software Image- ProPlus*® Media Cybernetics versão 6.2 (Figura 3).

Nas mesmas áreas foram obtidas a densidade de área de vasos sanguíneos (Figura 4) por planimetria por contagem de pontos, segundo Mathieu et al. (1981) e Mandarin de Lacerda (1994).

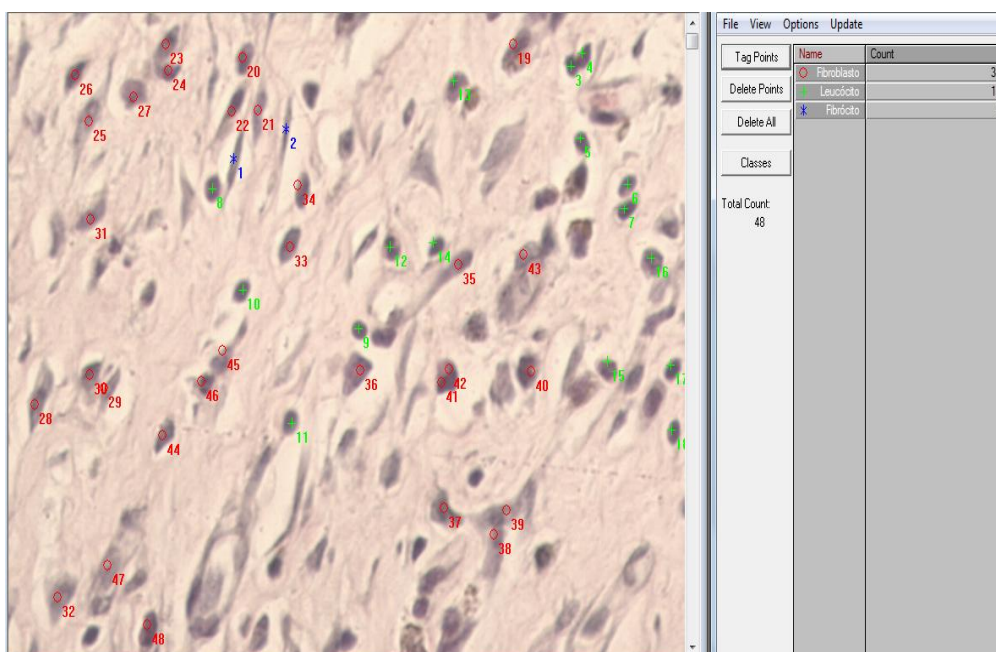


Figura 3 – Contagem de células realizada por meio do *Software Image-ProPlus*® Media Cybernetics versão 6.2.

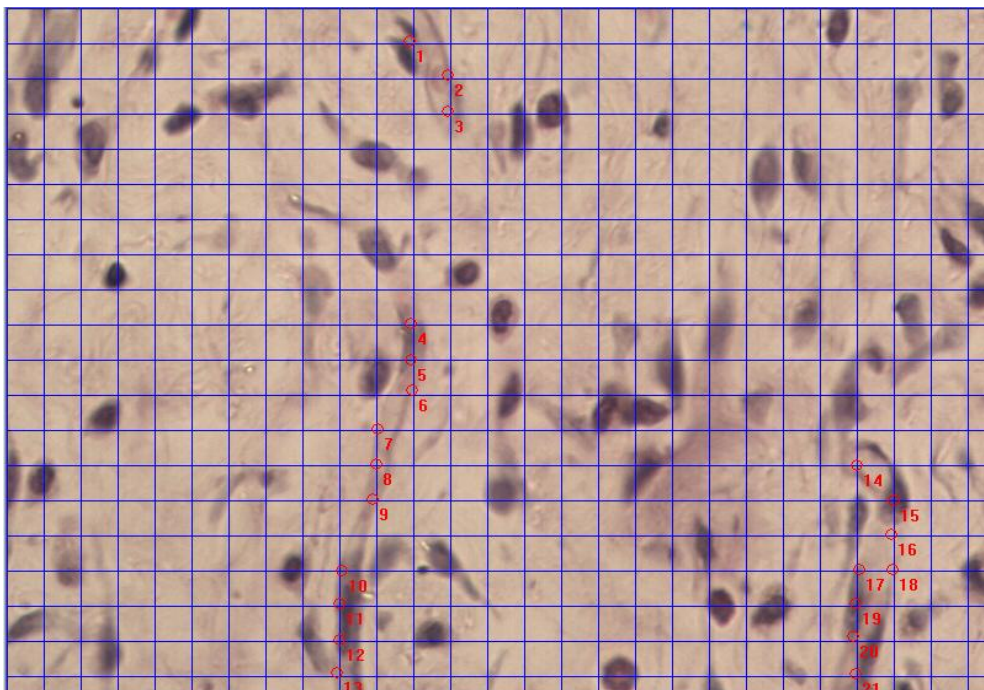


Figura 4 – Mensuração da densidade de área de vasos sanguíneos por planimetria por contagem de pontos.

3.3.2 Registro fotográfico

Visando a documentação mais detalhada dos resultados, foram realizados três registros fotográficos padronizados da ferida com uma câmera digital Sony® Cybershot 8.1, que posteriormente foram avaliados por um programa computacional desenvolvido especificamente para esse fim (Area®). O primeiro registro fotográfico foi realizado após o procedimento cirúrgico, sendo os seguintes realizados no quarto e sétimo dia após o referido procedimento.

A área da lesão foi mensurada por meio de registros fotográficos padronizados mantendo-se a câmera posicionada a 40 cm perpendicularmente à superfície da lesão, incluindo na imagem um dispositivo graduado.

O *software* Area® calcula automaticamente a distância em pixels (DPixels), referente a distância de 1cm na régua fotografada junto a lesão. Para

a mensuração da área da lesão, o registro fotográfico referente ao leito da ferida ainda não cicatrizado foi marcado na cor preta, para cálculo automático do número pixels pretos na imagem (NPixels). Para o cálculo, a área de 1 pixel (APixel) é dada pela fórmula $(1/(DPixels)) \times (1/(DPixels))$, onde 1 corresponde a 1cm da régua na fotografia. Para o cálculo da área da lesão, o programa aplica a seguinte fórmula: $NPixels \times APixel$ (Figura 5).

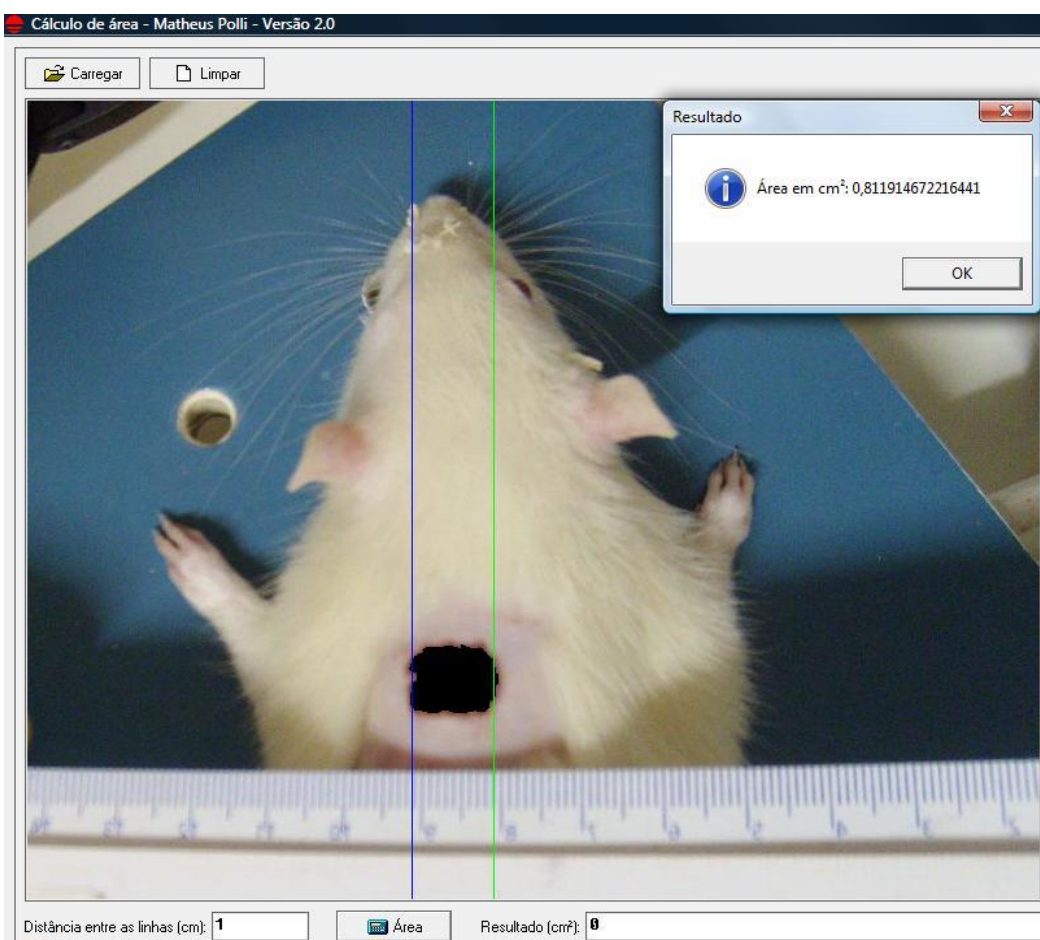


Figura 5 – Medida da área da lesão (em cm²) feita pelo *software* Area[®].

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística foi realizada através do software STATISTICA – Data Analysis Software System – versão 10 (2011) e todos os procedimentos inferenciais, isto é, os testes de hipóteses e as estimativas por intervalo foram precedidos por testes de homogeneidade de variâncias (Cochran) e de normalidade (Kolmogorov-Smirnov).

De acordo com estudos preliminares, com exceção da variável área da lesão, todas as demais apresentaram violações às pressuposições do modelo paramétrico quanto à homogeneidade de variâncias, quanto à normalidade ou à ambas.

Nesse contexto optou-se por adotar, para a análise da área da lesão, métodos da estatística paramétrica e para as demais, métodos da estatística não paramétrica.

Assim, para as variáveis reepitelização, densidade da área dos vasos sanguíneos e contagem de células (fibroblastos, leucócitos e fibrócitos) foram realizadas análises de variâncias não paramétricas de Kruskal-Wallis e testes não paramétricos de comparações múltiplas de Dunn. Para a variável área da lesão foram realizadas, num primeiro momento, análises de variâncias paramétricas para modelos de dois fatores cruzados e interação (dito modelo completo) e, a seguir análises de variâncias para modelos com um fator. As comparações múltiplas foram obtidas através do critério paramétrico de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*).

Adotou-se neste estudo o nível de significância $p \leq 0,05$. Assim, foram considerados significativos os parâmetros e/ou funções lineares de seus níveis, tais que $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 REEPITELIZAÇÃO

4.1.1 Aspectos descritivos

As respostas da variável reepitelização, obtidas segundo os procedimentos descritos em 3.4, estão expostas na tabela 1.

Tabela 1 – Aspectos descritivos da variável reepitelização (μm), segundo o grupo.

PARÂMETROS	GRUPO			TODOS OS GRUPOS
	Controle	Sham	Eletroestimulado	
N	90	105	105	300
Mínimo	289.30	710.10	499.70	289.30
Mediana	2064.55	1446.50	2893.00	2011.95
Máximo	6049.00	7101.00	6180.50	7101.00
Média	2115.54	2017.33	3068.76	2414.80
Desvio Padrão	1250.37	1672.82	1585.08	1595.37

4.1.2 – Avaliação dos efeitos de grupos

Observa-se na tabela 2 que o teste de Kruskal-Wallis detectou efeito diferencial significativo de grupo ($p < 0.0001$).

Tabela 2 – Reepitelização – Resultados da análise de variância de Kruskal- Wallis e do teste de comparações múltiplas de Dunn.

Teste de KRUSKAL-WALLIS			
H = 39.91	GL = 2	P < 0.0001	
Teste de DUNN ($\alpha = 0.05$)			
Grupos	Controle	Sham	Eletroestimulado
Postos Médios	142.35 ^a	116.72 ^a	191.27 ^b

(*) Letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos comparados. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos comparados. Teste de Dunn ($\alpha = 0.05$)

Como pode ser constatado através do teste de Dunn, a reepitelização foi superior ($p < 0.05$) no grupo eletroestimulado ($3068.76 \pm 1585.08 \mu\text{m}$) e não houve diferença significativa entre o grupo controle ($2115.54 \pm 1250.37 \mu\text{m}$) e o grupo sham ($2017.33 \pm 1672.82 \mu\text{m}$).

4.2 DENSIDADE DE ÁREA DOS VASOS SANGUÍNEOS

4.2.1 Aspectos descritivos

Os resultados referentes à densidade de área dos vasos sanguíneos estão expostos na tabela 3.

Tabela 3 – Descrição da densidade de área dos vasos sanguíneos, segundo o grupo – dados em porcentagem.

Parâmetros	Grupo			Todos os Grupos
	Controle	Sham	Eletroestimulado	
N	90	105	105	300
Mínimo	0	0	0	0
Mediana	6.00	7.00	6.00	6.00
Máximo	33	39	53	53
Média	7.47	8.96	7.83	8.12
Desvio Padrão	7.80	7.61	7.70	7.70

4.2.2 – Avaliação dos efeitos de grupos

A tabela 4 aponta que a análise de variância de Kruskal-Wallis não detectou diferença significativa entre os grupos ($p=0.1710$). Esse resultado foi confirmado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($p>0.05$).

Tabela 4 – Densidade de área dos vasos sanguíneos – resultados da análise de variância de Kruskal-Wallis e do teste de comparações múltiplas de Dunn.

Teste de KRUSKAL-WALLIS			
H = 3.53	GL = 2	P = 0.1710	
Teste de DUNN ($\alpha = 0.05$)			
Grupos	Controle	Sham	Eletroestimulado
Postos Médios	139.29 ^a	162.33 ^a	148.28 ^a

(*) Letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos comparados. Teste de Dunn ($\alpha = 0.05$)

Não há evidências que a densidade de área dos vasos sanguíneos foi diferente, segundo os grupos: controle ($7.47 \pm 7.80\%$), sham ($8.96 \pm 7.61\%$) e eletroestimulado ($7,83 \pm 7.70\%$).

4.3 CONTAGEM DE CÉLULAS

4.3.1 FIBROBLASTOS

4.3.1.1 Aspectos descritivos

Os resultados da contagem do número de fibroblastos estão descritos na tabela 5

Tabela 5 - Descrição do número de fibroblastos, segundo o grupo.

Parâmetros	Controle	Sham	Eletroestimulado	Todos os Grupos
N	90	105	105	300
Mínimo	45	38	36	36
Mediana	96.50	89.00	78.00	86.50
Máximo	163	135	117	163
Média	96.23	89.50	78.06	87.52
Desvio Padrão	23.46	23.14	17.12	22.53

4.3.1.2 – Avaliação dos efeitos de grupos

Observa-se na tabela 6, que a análise de variância de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa entre os grupos ($p < 0.0001$).

Tabela 6 – Fibroblastos – Resultados da análise de variância de Kruskal-Wallis e do teste de comparações múltiplas de Dunn.

Teste de KRUSKAL-WALLIS			
H = 30.25	GL = 2	P < 0.0001	
Teste de DUNN ($\alpha = 0.05$)			
Grupos	Controle	Sham	Eletroestimulado
Postos Médios	182.07 ^b	158.73 ^b	115.21 ^a

(*) Letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos comparados. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos comparados. Teste de Dunn ($\alpha = 0.05$)

Por meio do teste de comparações múltiplas de Dunn, constatou-se que os grupos controle (96.23 ± 23.46) e sham (89.50 ± 23.14) não diferiram significativamente entre si ($p > 0.05$) e apresentaram números médios de fibroblastos significativamente ($p < 0.05$) maiores que o do grupo eletroestimulado (78.06 ± 17.12).

4.3.2 – LEUCÓCITOS

4.3.2.1 – Aspectos descritivos

Os resultados da contagem do número de leucócitos estão expostos na tabela 7.

Tabela 7 - Descrição do número de leucócitos, segundo o grupo.

Parâmetros	Controle	Sham	Eletroestimulado	Todos os Grupos
N	90	105	105	300
Mínimo	2	1	1	1
Mediana	9.50	10.00	13.00	11.00
Máximo	40	35	32	40
Média	10.46	11.39	14.12	12.07
Desvio Padrão	6.52	7.00	6.41	6.81

4.3.2.2 – Avaliação dos efeitos de grupos

Observa-se na tabela 8, que a análise de variância de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa entre os grupos ($p < 0.0001$).

Tabela 8 – Leucócitos – Resultados da análise de variância de Kruskal-Wallis e do teste de comparações múltiplas de Dunn.

Teste de KRUSKAL-WALLIS			
H = 24.01	GL = 2	P < 0.0001	
Teste de DUNN ($\alpha = 0.05$)			
Grupos	Controle	Sham	Eletroestimulado
Postos Médios	125.58 ^a	139.32 ^a	183.03 ^b

(*) Letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos comparados. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos comparados. Teste de Dunn ($\alpha = 0.05$)

Por meio do teste de comparações múltiplas de Dunn, constatou-se que os grupos controle (10.46 ± 6.52) e sham (11.39 ± 7.00) não diferiram significativamente entre si ($p > 0.05$) e apresentaram números médios de leucócitos significativamente ($p < 0.05$) menores que o grupo eletroestimulado (14.12 ± 6.41).

4.3.3 – FIBRÓCITOS

4.3.3.1 – Aspectos descritivos

Os resultados da contagem do número de fibrócitos estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Descrição do número de fibrócitos, segundo o grupo.

Parâmetros	Controle	Sham	Eletroestimulado	Todos os Grupos
N	90	105	105	300
Mínimo	0	0	0	0
Mediana	0.00	0.00	0.00	0.00
Máximo	3	2	2	3
Média	0.27	0.13	0.10	0.16
Desvio Padrão	0.61	0.39	0.36	0.47

4.3.3.2 – Avaliação dos efeitos de grupos

Observa-se na tabela 10, que a análise de variância de Kruskal-Wallis não detectou diferença significativa entre os grupos ($p=0.4229$).

Tabela 10 – Fibrócitos – Resultados da análise de variância de Kruskal-Wallis e do teste de comparações múltiplas de Dunn.

Teste de KRUSKAL-WALLIS			
H = 1.74	GL = 2	P = 0.4229	
Teste de DUNN ($\alpha = 0.05$)			
Grupos	Controle	Sham	Eletroestimulado
Postos Médios	163.03 ^a	139.32 ^a	125.58 ^a

(*) Letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos comparados. Teste de Dunn ($\alpha = 0.05$)

Analogamente, através do teste de comparações múltiplas de Dunn, não foram constatadas diferenças significativas ($p>0.05$) entre os grupos

controle (0.27 ± 0.61), sham (0.13 ± 0.39) e eletroestimulado (0.10 ± 0.36). Tais resultados estão descritos na tabela 9.

4.4 ÁREA DA LESÃO

4.4.1 Aspectos descritivos

As respostas da variável área da lesão, obtidas segundo os procedimentos listados em 3.4, estão descritas na tabela 11.

Tabela 11 – Aspectos descritivos da variável área da lesão, segundo o momento e o grupo.

Momento	Grupo	n	Mínimo	Mediana	Máximo	Média	Desvio Padrão
Imediatamente após a lesão	Controle	21	0.99	1.19	1.47	1.21	0.14
	Sham	21	1.06	1.35	1.67	1.35	0.20
	Eletroestimulado	21	0.83	1.29	1.46	1.22	0.20
	Geral	63	0.83	1.28	1.67	1.26	0.19
4 dias após a lesão	Controle	21	0.56	0.85	1.02	0.81	0.14
	Sham	21	0.43	0.71	1.13	0.75	0.20
	Eletroestimulado	21	0.57	0.71	0.89	0.71	0.11
	Geral	63	0.43	0.76	1.13	0.76	0.15
7 dias após a lesão	Controle	21	0.16	0.42	0.58	0.39	0.15
	Sham	21	0.35	0.44	0.74	0.49	0.14
	Eletroestimulado	21	0.15	0.27	0.47	0.30	0.10
	Geral	63	0.15	0.38	0.74	0.39	0.15
Todos os Momentos	Controle	63	0.16	0.85	1.47	0.80	0.37
	Sham	63	0.35	0.74	1.67	0.86	0.40
	Eletroestimulado	63	0.15	0.71	1.46	0.75	0.40
	Total	189	0.15	0.76	1.67	0.80	0.39

4.4.2 Efeitos de grupos *versus* momentos

O estudo dos efeitos de momentos e de grupos sobre a área lesada, conforme comentado anteriormente, foi realizado através da análise de variância do modelo de dois fatores completos e interação.

Os resultados estão descritos na tabela 11. Observa-se que a interação foi significativa ($p=0.0298$) e, sendo assim, nada se pode concluir sobre os efeitos dos fatores principais: momento e grupo.

Nesse contexto, foram realizadas as partições do modelo de modo a viabilizar a comparação entre efeitos de grupos em cada momento e entre efeitos de momentos em cada grupo.

Tabela 12 – Análise de variância da variável área da lesão.

Variações Consideradas	GL	Somas de Quadrados	Quadrados Médios	F _{Calculado}	P - Valor
Entre Momentos	2	23.8869	11.9434	484.50	< 0.0001
Entre Grupos	2	0.4442	0.2221	9.01	0.0002
Momentos <i>versus</i> Grupos	4	0.2710	0.0677	2.75	0.0298
Resíduo	180	4.4372	0.0247	-	-
Total	188	29.0393	-	-	-

4.4.3 Avaliação dos efeitos por momento e por grupo

Foram efetuados os estudos dos efeitos dos grupos em cada momento e dos momentos em cada grupo. Um resumo dos resultados pode ser observado na tabela 13 e visualizado nas figuras 6 a e b.

Tabela 13 – Resumos das análises de variâncias e respectivas comparações múltiplas de Tukey HSD.

MOMENTOS	ANOVA		GRUPOS		
	Entre Grupos por Momento	Entre Momentos por Grupo	Controle	Sham	Eleto estimulado
Imediatamente após a lesão	0.0262	< 0.0001	1.21 ^{a, C}	1.35 ^{b, C}	1.22 ^{a, C}
4 dias após a lesão	0.1374	< 0.0001	0.81 ^{a, B}	0.75 ^{a, B}	0.71 ^{a, B}
7 dias após a lesão	0.0002	< 0.0001	0.39 ^{a, A}	0.49 ^{b, A}	0.30 ^{a, A}

(*) Letras minúsculas diferentes em cada linha representam áreas médias diferentes de grupos, em cada momento correspondente. Letras maiúsculas diferentes em cada coluna representam áreas médias diferentes de momentos, em cada grupo correspondente – Teste de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$)

Efeitos de Grupos em cada Momento

Como pode ser constatado, houve diferença significativa entre os efeitos de grupos imediatamente após a lesão ($p=0.0262$) e após 7 dias ($p=0.0002$), mas não houve após 4 dias ($p=0.1374$).

Observa-se, ademais, através das letras minúsculas do teste de Tukey HSD, que:

- Imediatamente após a lesão, a área média correspondente ao grupo sham (1.35 ± 0.20) foi superior ($p<0.05$) às áreas inerentes ao grupo controle (1.21 ± 0.14) e ao grupo eletroestimulado (1.22 ± 0.20) e que estes não apresentaram diferença significativa entre si;

- 4 dias após a lesão não houve diferença significativa entre efeitos de grupos: controle (0.81 ± 0.14), sham (0.75 ± 0.20) e eletroestimulado (0.71 ± 0.11);

- 7 dias após a lesão, o comportamento das áreas foi semelhante ao encontrado imediatamente após a lesão: a área média correspondente ao grupo sham (0.49 ± 0.14) foi superior ($p<0.05$) às áreas inerentes ao grupo controle (0.39 ± 0.15) e ao grupo eletroestimulado (0.30 ± 0.10) e estes não apresentaram diferença significativa entre si.

Efeitos de Momentos em cada Grupo

Como pode ser observado na tabela 13, houve diferença significativa entre os efeitos de momentos em todos os grupos, sempre com $p<0.0001$.

Conforme esperado, o teste de Tukey – letras maiúsculas por coluna – constatou que os valores médios das áreas, em cada grupo, foram sempre superiores ($p<0.05$) aos observados nos momentos subseqüentes.

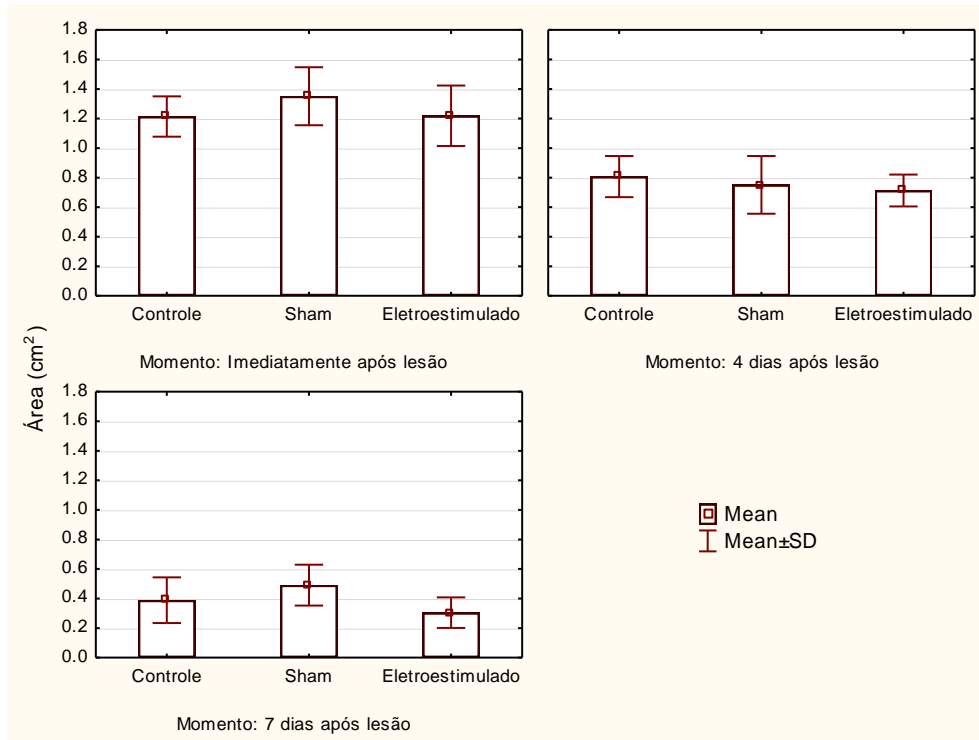


Figura 6 a – Distribuição da área da lesão em cada momento, segundo o grupo.

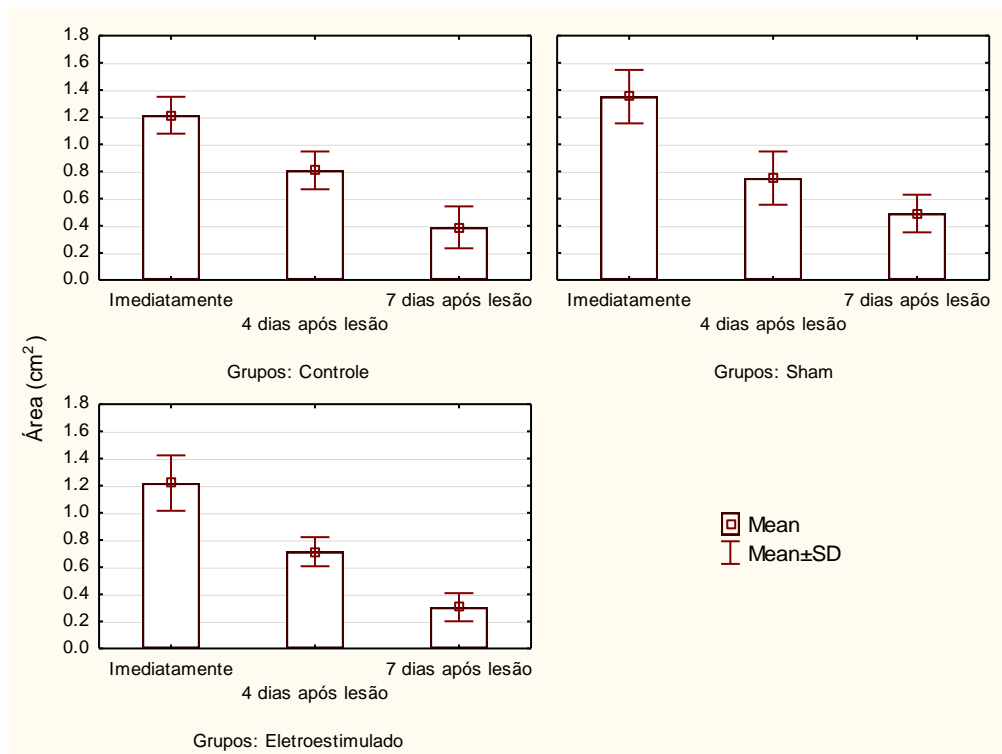


Figura 6 b – Distribuição da área da lesão em cada grupo, segundo o momento.

5 DISCUSSÃO

A aceitação clínica da EEAV tem excedido em muito a documentação objetiva da sua eficácia e parâmetros ideais de estimulação para a EEAV ainda não foram estabelecidos. Os efeitos independentes de cada polaridade estão praticamente estabelecidos (Brown e Gogia, 1987; Brown, McDonnell, Menton, 1988; Szuminsky et al., 1994; Kloth, 2005), entretanto o efeito da alternância de polaridade na cicatrização de feridas ainda é pouco estudado. Pesquisas que utilizam ratos como modelo experimental para cicatrização ainda são raras.

Com o objetivo de determinar se a EEAV melhora a cicatrização de feridas, Brown e Gogia (1987) realizaram um estudo utilizando 40 coelhas divididas em grupos controle e experimental e acompanhadas durante quatro ou sete dias. Os animais do grupo experimental foram anestesiados e tiveram 3,5 centímetros de pele retirada por um bisturi estéril e receberam EEAV com a polaridade negativa durante duas horas, duas vezes ao dia, por quatro ou sete dias. A tensão variou de 30 a 60 V. Os resultados indicaram um percentual de fechamento maior da ferida, porém não significativo para os animais do grupo controle sete dias. O presente estudo não concorda com tais dados, no qual a reepitelização obtida pelo grupo eletroestimulado foi significativamente maior que a obtida pelo grupo controle e sham, sugerindo assim que a EEAV promove a proliferação do estrato basal e preenche parcialmente a lesão, reduzindo a área da ferida.

Utilizando o mesmo modelo experimental, Brown, McDonnell e Menton (1988) avaliaram os efeitos da EEAV com polaridade positiva na cicatrização de feridas. Os autores verificaram que o fechamento da ferida foi significativamente menor no grupo experimental quatro dias (50%) quando

comparado ao grupo controle quatro dias (78%). No entanto, após sete dias, os valores de fechamento da ferida eram semelhantes entre os grupos (80% e 82% respectivamente). Os dados do presente estudo não corroboram com esses achados, uma vez que se encontrou diferença significativa na comparação da reepitelização entre os grupos estudados.

Alvarez et al. (1983) analisaram os efeitos da corrente direta (50-300 μ A) anódica na cicatrização de feridas em 11 porcos divididos em grupos controle, placebo e estimulado. Tais autores encontraram uma taxa de reepitelização significativamente acelerada, o que sugere que a proliferação ou capacidade migratória das células epiteliais na reparação e regeneração pode ser afetada por campos elétricos. O presente estudo, mesmo tendo utilizado outro modelo experimental, concorda com tais dados, já que também foi encontrada diferença significativa na taxa de reepitelização nos grupos estudados.

Brown, McDonnell e Menton (1989) realizaram um estudo com o objetivo de examinar os efeitos da EEAV sobre o fechamento de feridas e para isso utilizaram 36 coelhos divididos em grupo experimental e controle. O grupo experimental foi estimulado 24 horas após a lesão durante duas horas, duas vezes ao dia por sete dias consecutivos. A polaridade negativa foi usada nos três primeiros dias e a positiva nos dias restantes. Todos os coelhos do grupo experimental tiveram suas feridas completamente fechadas e os valores de fechamento para o grupo controle foram significativamente menores do que para o grupo tratado.

Os dados de reepitelização do presente estudo corroboram com o estudo apontado acima, já que a taxa de reepitelização foi significativamente

superior no grupo eletroestimulado, não havendo diferença entre os grupos controle e sham. Tais dados sugerem que a EEAV acelera o fechamento da ferida.

No presente estudo, a densidade de área de vasos sanguíneos também foi analisada e não apresentou diferença significativa na comparação entre os grupos. Tal fato pode ter ocorrido devido ao pouco tempo de tratamento (7 dias) ou as diferenças na estrutura da pele do modelo estudado, já que estudos que obtiveram significância em tal parâmetro foram feitos com outros modelos e em um maior período de tempo.

Sabe-se que um dos efeitos inerentes à EEAV catódica é o aumento circulatório. Visando analisar a capacidade da EEAV em aumentar a microcirculação em úlceras cutâneas crônicas isquêmicas, Goldman et al. (2004) investigaram a pressão transcutânea de oxigênio em lesões cutâneas não tratadas cirurgicamente. Para isso utilizaram estimulação catódica, frequência de 100 pulsos por segundo, limiar sensitivo ou até atingir o máximo de 360 V, uma hora por dia durante 14 semanas. Os resultados sugeriram que a EEAV pode melhorar a microcirculação ao redor da úlcera, pois a pressão transcutânea de oxigênio apresentou um aumento significativo. Esses achados sugerem que a EEAV pode promover vasodilatação arteriolar e neovascularização.

Karnes et al. (1995) investigaram os efeitos da aplicação catódica e anódica de EEAV sobre o diâmetro de arteríolas em hamster e verificaram que não houve diferença entre o diâmetro das arteríolas entre os grupos tratados e não tratados com EEAV catódica. No entanto, o diâmetro das arteríolas tratadas com EEAV anódica diminuiu significativamente ao longo dos 30

minutos de tratamento. Outros estudos do mesmo laboratório indicam que a EEAV catódica reduziu a formação de edema pós-traumático em diversos modelos animais. Porém, a EEAV anódica não reduziu a formação de edema. Supõe-se assim que EEAV (nas duas polaridades) possa promover uma diminuição do fluxo sanguíneo local por vasoconstrição das arteríolas (Taylor et al. 1997).

Mohr, Akers e Wessman (1987) estudaram o efeito da EEAV na velocidade do fluxo sanguíneo no membro posterior de ratos. Os animais foram estimulados com diferentes voltagens e mudanças de polaridade e a velocidade do fluxo sanguíneo foi avaliada por meio de Doppler. Foi observado que a velocidade do fluxo sanguíneo foi incrementada com o aumento da voltagem nos dois polos, entretanto, com efeito maior com o pólo negativo. A mudança na velocidade do fluxo sanguíneo começou já no primeiro minuto de aplicação e permaneceu por cerca de 14 minutos cessado o estímulo. Os resultados desse estudo indicaram que a EEAV pode incrementar o fluxo sanguíneo e apresentar efeito residual. Este efeito também pode estar relacionado à contração muscular.

Sendo o aumento da microcirculação regional e a formação de novos vasos uma das hipóteses prováveis para a melhora da cicatrização com o uso da EEAV, o presente estudo não concorda com os resultados do estudo acima, uma vez que a densidade de área de vasos sanguíneos não mostrou diferença significativa entre os grupos, não havendo evidências de neovascularização. Entretanto, o procedimento de avaliação utilizado não detecta mudanças na velocidade do fluxo nem determina alterações circulatórias. Sugere-se então, para novos estudos, aprofundar a questão e avaliar outros parâmetros, já que

os estudos encontrados avaliaram o fluxo sanguíneo utilizando outros métodos de aferição (Dooley, Kasprak, 1976; Mohr, Akers e Wessman, 1987).

Leffmann et al. (1994) examinaram a cicatrização de feridas cutâneas após estimulação com microamperagem em doze ratas, que foram divididas em grupo controle e tratado. O grupo tratado recebeu corrente com uma frequência de 0.3 Hz, ciclo de trabalho de 50% durante duas horas diárias por quatorze dias. Para avaliação dos resultados foi feita uma análise histológica, incluindo a medida da espessura epitelial, densidade de vasos sanguíneos e de fibroblastos e medição da área da ferida. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre os grupos em nenhuma das variáveis estudadas e esta diferença ocorreu somente quando se comparou o tamanho da lesão no mesmo grupo com o passar dos dias.

Mehmandoust et al. (2007) investigaram os efeitos da estimulação elétrica catódica e anódica na cicatrização de feridas utilizando 42 cobaias divididos em grupos controle (C1 e C2) e eletroestimulado (E1 à E4). Os animais foram submetidos a incisão de 3 cm na região dorsal. Os grupos foram estimulados uma hora por dia com um pulso unidirecional de 0.3 ms, frequência de 80 Hz e intensidade entre 300 e 600 μ A. Nos grupos E1 e E3 a polaridade positiva foi aplicada nos três primeiros dias e a polaridade negativa nos dias restantes (até completar 14 ou 21 dias de tratamento, respectivamente). Nos outros grupos experimentais a polaridade negativa foi aplicada nos três primeiros dias e a anódica nos dias restantes. Os grupos E1, E2 e C1 foram eutanasiados no 14^o dia e os demais no 21^o dia.

Foram mensurados o percentual de redução da área da ferida e a força à tração. Os resultados indicaram que ambos os estímulos aumentaram

significativamente a taxa de fechamento da ferida. Com isso, os autores concluíram que a estimulação elétrica, independente do regime de polaridade, pode levar a uma diminuição significativa da superfície da ferida. Já no presente estudo, a área da ferida foi significativamente menor tanto no grupo controle quanto no grupo eletroestimulado quando comparados ao grupo sham.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo a alternância de polaridade da EEAV acelerou o fechamento da ferida e não causou diferença na densidade de área de vasos sanguíneos nos grupos estudados. As características morfométricas estudadas na regeneração tegumentar aguda também mostraram alterações e a área da lesão foi afetada apenas pelo fator tempo.

REFERÊNCIAS *

Alvarez OM, Mertz PM, Smerbeck RV, Eaglstein WH. The healing of superficial skin wounds is stimulated by external electrical current. *J Invest Dermatol*. 1983; 81 (2): 144-8.

Anastácio MADJ. Reparação epitelial em úlceras vasculares após estimulação do ultrassom pulsado de baixa intensidade [dissertação]. São Carlos; 2000.

Araújo ID. Fisiologia da cicatrização. In: Petroianu A. Lições de cirurgia. Rio de Janeiro: Interlivros, cap. 11, p. 101-9, 1997.

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005; 41 (1): 27-51.

Blanes L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. *Cirurgia vascular: guia ilustrado*. São Paulo: 2004. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>

Bourguignon GJ, Bourguignon LYW. Electric stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblast. *FASEB j*. 1987; 1(5): 398-402.

Brown M, Gogia PP, Sinacore DR, Menton DN. High-voltage galvanic stimulation on wound healing in guinea pigs: longer-term effects. *Arch Phys Med Rehabil*. 1995; 76: 1134-7.

Brown M, Gogia PP. Effects of high voltage stimulation on cutaneous wound healing in rabbits. *Phys Ther*. 1987; 67 (5): 662-7.

Brown M, McDonnell MK, Menton DN. Electrical stimulation effects on cutaneous wound healing in rabbits: a follow-up study. *Phys Ther*. 1988; 68 (6): 955-60.

Brown M, McDonnell MK, Menton DN. Polarity effects on wound healing using electric stimulation in rabbits. *Arch Phys Med Rehabil*. 1989; 70: 624-27.

Byl NN. Estimulação elétrica para a reparação tecidual: informações básicas. In: Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Eletroterapia clínica*. São Paulo: Manole; 2003. p. 183-44.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins: *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 44-100.

Cukjati D, Savrin R. Electric current wound healing. In: Rosch PJ, Markov MS. *Bioelectromagnetic Medicine*. New York: Arcel Dekker; 2004. p. 485-505.

* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

Daeschlein G, Assadian O, Kloth LC, Meinel C, Ney F, Kramer A. Antibacterial activity of positive and negative polarity low-voltage pulsed current (LVPC) on six typical Gram-positive and Gram-negative bacterial pathogens of chronic wounds. *Wound Repair Reg.* 2007; 15: 399-403.

Davini R, Nunes CV, Guirro ECO, Guirro RRJ. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. *Rev Bras Fisioter.* 2005; 9: 249-256.

Dooley DM, Kasprak M. Modification of wood flow to the extremities by electrical stimulation of the nervous system. *South Med J.* 1976; 69: 1309-11.

Feedar JA, Kloth LC, Gentzkow GD. Chronic dermal ulcer healing enhanced with monophasic pulsed electrical stimulation. *Phys Ther.* 1991; 71 (9): 639-49.

Ferreira AS. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segundas intenções de lesões cutâneas totais em ratos, mediante avaliação por planimetria [dissertação]. São Paulo; 2005.

Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Grenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem.* 1995; 270: 12607-13.

Garcia LB, Guirro ECO. Efeitos da estimulação de alta voltagem no linfedema pós-mastectomia. *Rev Bras Fisioter.* 2005; 9: 243-248.

Gentzkow GD. Electrical stimulation to heal dermal wounds. *J Dermatol Surg Oncol.* 1993; 19 (8): 753-8.

Goldman R, Rosen M, Brewley B, Golden M. Electrotherapy promotes healing and microcirculation of infrapopliteal ischemic wounds: a prospective pilot study. *Adv skin wound care.* 2004; 17 (6): 284-94.

Griffin JW, Tooms RE, Mendius RA, Clift JK, Zwaag RV, El-Zeky F. Efficacy of high voltage pulsed current for healing of pressure ulcers in patients with spinal Cord injury. *Phys Ther.* 1991; 71 (6): 433-44.

Hess CT. Tratamento de feridas e úlceras. 4ª ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores; 2002. 225p.

Karnes JL, Mendel FC, Fish DR, Burton HW. High-Voltage Pulsed Current: its influence on diameters of histamine-dilated arterioles in hamster cheek pouches. *Arch Phys Med Rehabil.* 1995; 76: 381-6.

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

Kloth LC. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *Int J Low Extrem Wounds*. 2005; 23 (4): 23-44.

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

Leffmann DJ, Arnall DA, Holmgren PR, Cornwall MW. Effect of microamperage stimulation on the rate of wound healing in rats: a histological study. *Phys Ther*. 1994; 74 (3): 195-200.

Mandarim de Lacerda CA. Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria, estereologia. Rio de Janeiro: Cébio, 2ª ed., 83 p., 1994.

Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J microsc*. 1981; 121 (1): 75-88.

Mehmandoust FG, Torkaman G, Firoozabadi M, Talebi G. Anodal and cathodal pulsed electrical stimulation on skin wound healing in guinea pigs. *J Rehabil Res Dev*. 2007; 44 (4): 616-8.

Meneghin P, Vattimo MFF. Fisiopatologia do processo cicatricial. In: Jorge AS, Dantas SRPE. *Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas*. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 11-31.

Merriman HL, Hegyi CA, Albright-Overton CR, Carlos J, Putnam RW, Mulcare A. A comparison of four electrical stimulation types on *Staphylococcus aureus* growth in vitro. *J Rehabil Res Dev*. 2004; 41 (2): 139-46.

Mohr T, Akers TK, Wessman HC. Effect of high voltage stimulation on blood flow in the rat hind limb. *Phys Ther*. 1987; 67 (4): 526-33.

Mycielska ME, Djamgoz MBA. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Sci*. 2004; 117 (9): 1631-39.

Peters EJ, Lavery LA, Armstrong DG, Fleischli JG. Electric stimulation as an adjunct to heal diabetic foot ulcers: a randomized clinical trial. *Arch Phys Med Rehabil*. 2001; 82: 721-5.

Reed BV. Effect of high voltage pulsed electrical stimulation on microvascular permeability to plasma proteins. *Phys Ther*. 1988; 68 (4): 491-5.

Santos RP, Nascimento CA, Andrade EN. Uso da eletroestimulação de alta voltagem na cicatrização de úlceras venosas. *Fisioter Mov*. 2009; 22 (4): 615-23.

Sussman C, Byl N. Electrical stimulation for wound healing. In: Sussman C. Wound Care Collaborative Practice Manual for Physical Therapists and Nurses. Aspen Publishers; 1998.

Szminsky NJ, Albers AC, Unger P, Eddy JG. Effect of narrow, pulsed high voltages on bacterial viability. *Phys Ther.* 1994; 74 (7): 660-7.

Taylor K, Mendel FC, Fish DR, Hard R, Burton HW. Effect of high-voltage pulsed current and alternating current on macromolecular leakage in hamster cheek pouch microcirculation. *Phys Ther.* 1997; 77 (12): 1729-40.

Waldron DR, Trevor P. Tratamento dos ferimentos superficiais. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. São Paulo: Manole, 2 V. v. 1, cap. 25, p. 334-47, 1998.

Wysocki AB. Anatomy and Physiology of Skin and Soft Tissue. In: Bryant RA, Nix DP. Acute e Chronic Wounds. St. Louis: Elsevier; 2007. p. 39-16.

Zhao M. Electrical fields in wound healing – an overriding signal that directs cell migration. *Semin cell dev bil.* 2009; 20 (9): 674- 82.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351 8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propq@power.ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº. 09/2010

Protocolo nº. 002/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – **APROVOU** o projeto intitulado “*Efeito da estimulação elétrica de alta voltagem em diferentes parâmetros na lesão tegumentar. Análise histopatológica em rato.*” apresentado pelo pesquisador (a) Maria Luiza Ozores Polacow.

São Carlos, 30 de março de 2010.

Profª. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal