

GRAZIELA CHACON BORBA

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA PRÉ-INCISIONAL
NA CICATRIZAÇÃO EM PELE DE RATO**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2009**

GRAZIELA CHACON BORBA

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA PRÉ-INCISIONAL
NA CICATRIZAÇÃO EM PELE DE RATO**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador : Prof. BERNARDO HOCHMAN

Co-Orientador : Prof. RICHARD ELOIN LIEBANO

**São Paulo
2009**

Borba, Graziela Chacon

Estimulação elétrica pré-incisional na cicatrização em pele de rato./ Graziela Chacon Borba. -- São Paulo, 2009.
xvii, 73f.

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

Título em inglês: *Preincisional electric stimulation on healing in rat's skin.*

1. Estimulação Elétrica. 2. Cicatrização de Feridas. 3. Mastócitos. 4. Colágeno.
5. Pele. 6. Ratos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENAÇÃO: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto

Prof^a Dr^a Lydia Masako Ferreira

Aos meus pais, *João e Miralva (in memoriam)*,
pela oportunidade de ter o estudo como
prioridade em nossas vidas,
pelo amor e pela dedicação eterna.

Ao meu marido *Geraldino*, pela
paciência dedicada a mim sempre que
precisei, pela ausência que soube
compreender nos momentos difíceis,
divididos entre o estudo e trabalho.

Aos meus filhos *Gustavo e Gabriel*
pelo amor e atenção, dedicados a
mim. Sempre me ensinando nas
tarefas mais difíceis.

A minha irmã *Julieta*, sempre presente em
minha vida, com carinho e atenção.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, na pessoa da PROF^a. DR^a. **LYDIA MASA KO FERREIRA**, minha orientadora acadêmica, pela competência e humildade de uma verdadeira Líder.

Ao meu Orientador, PROF. **BERNARDO HOCHMAN**, pelo ser maravilhoso que tive a oportunidade de conhecer, por sua brilhante sabedoria e seus primordiais ensinamentos na elaboração deste estudo.

Ao CO-ORIENTADOR,
Prof. **RICHARD ELOIN LIEBANO**,
pela inalterável paciência e pela valorização de meu estudo.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica e Programa de Pós-graduação, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA** e **SANDRA DA SILVA** e **SILVANA APARECIDA COSTA**, pela ajuda nas formalidades e dedicação para conosco nesta jornada.

Aos colegas da pós-graduação, pelo companheirismo e força nos momentos difíceis do curso, em especial a **JULIETA CHACON** na correção desta dissertação, **FABIANNE MAGALHÃES** e **SORAIA FERRARA** pela ajuda na pesquisa; **TIAGO SILVEIRA** e **MAÍRA COSTA** pelo auxílio no laboratório experimental e na formatação desta dissertação.

À Professora **MILVIA M. S. S. ENOKLHARA**, da disciplina de Dermatopatologia do Departamento de Patologia da UNIFESP, pela paciência e disponibilidade de seu tempo para me ensinar durante o estudo.

À Profa. **CELINA OSHIMA**, da Disciplina de Histologia da UNIFESP do Departamento de Morfologia, pela atenção e ensino com as lâminas histológicas.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pelo apoio financeiro econômico dado por meio do Programa de Pós-Graduação da UNIFESP.

À empresa Quark, pela cessão do aparelho de eletroestimulação, modelo Nemesys[®].

Meu mais profundo agradecimento aos pequenos animais de experimentação, que abriram o caminho das possibilidades e das descobertas deste estudo.

*“Mandaram-me na frente para fazer fogo,
vindo eles atrás, para se aquecerem”.*

(William Shakespeare)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
LISTAS	ix
RESUMO	xvii
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVO	04
3 LITERATURA	06
4 MÉTODOS	16
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	41
NORMAS ADOTADAS	48
ABSTRACT	50
APÊNDICES	52
ANEXOS	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Área com epilação manual do dorso do rato, com 4cm de largura e 10cm de comprimento	18
FIGURA 2.	Aplicação do eletrodo positivo no dorso do rato (cabo cor vermelha)	19
FIGURA 3.	Aplicação do eletrodo negativo no abdome do rato (cabo cor preta)	19
FIGURA 4.	Aparelho de eletroestimulação	20
FIGURA 5.	Área com demarcação da incisão de 6cm, distância da incisão ao ponto mediu 0,5cm e distância entre os pontos foi de 1,5cm	22
FIGURA 6.	Delinhamento da sutura mediu que 6cm e dos pontos separados	23
FIGURA 7.	Aspecto final da sutura	23
FIGURA 8.	Marcação entre os pontos 2 e 3 para a remoção da amostra	24
FIGURA 9.	Retirada da amostra final entre o segundo e terceiro ponto	24
FIGURA 10.	Biopsia da pele	25

FIGURA 11.	Gráfico <i>Box-plot</i> da mediana do 1º e 2º quartil, no 7º dia, do Grupo Estimulado ($P=0,0090^*$)	30
FIGURA 12.	Gráfico <i>Box-plot</i> da mediana do 1º e 2º quartil, no 7º dia, do Grupo Estimulado ($P=0,0060^*$)	30
FIGURA 13.	Fotomicrografia da cicatriz e pele adjacente no dorso do rato do Grupo Controle (C) e do Grupo Estimulado (E), apresentando aumento de vasos no 7º dia do grupo Estimulado, quando comparados com o grupo Controle. Setas indicam vasos dilatados e congestos	31
FIGURA 14.	Na fotomicrografia da cicatriz e pele adjacente no dorso do rato do Grupo Controle (C) e do Grupo Estimulado (E) do 7º dia, observou-se aumento de tecido de granulação e fibroblastos. Setas indicam a presença de fibroblastos fusiformes com núcleos achatados. O 14º dia não apresentou diferenças histológicas entre os grupos Controle e Estimulado	31
FIGURA 15.	Na fotomicrografia da cicatriz e pele adjacente no dorso do rato houve diminuição na densidade das fibras de colágeno tipo III no 7º dia, do Grupo Estimulado (E) comparados com o 7º dia do Grupo Controle (C). As setas indicam um menor número de fibras de colágeno tipo III nas margens da cicatriz em relação à periferia. O 14º dia não apresentou diferenças histológicas entre os grupos Controle e Estimulado	31

FIGURA 16.	Gráfico <i>Box-plot</i> da área total das fibras de colágeno, dos Grupos Controle e Estimulado	58
FIGURA 17.	Gráfico <i>Box-plot</i> da área total das fibras de colágeno, dos Grupos Controle e Estimulado	58
FIGURA 18.	Gráfico <i>Box-plot</i> da densidade das fibras de colágeno tipo III dos Grupos Controle e Estimulado.....	59
FIGURA 19.	Gráfico <i>Box-plot</i> explicativo entre os Grupos Controle e Estimulado dos linfócitos	59
FIGURA 20.	Gráfico <i>Box-plot</i> explicativo dos mastócitos dos Grupos Controle e Estimulado	61
FIGURA 21.	Gráfico <i>Box-plot</i> explicativo entre os Grupos Controle e Estimulado dos linfócitos	61
FIGURA 22.	Gráfico <i>Box-plot</i> dos Eosinófilos não apresentou resultado com significância estatística, entre os Grupos Controle e Estimulado	61
FIGURA 23.	Gráfico <i>Box-plot</i> do Grupo Controle e Estimulado no 7º e 14º dia, para a variável Neutrófilo	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACROGRAMAS

BIREME	Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EPM	Escola Paulista de Medicina
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

LETRA GREGA

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta

EXPRESSÃO

<i>et al.</i>	Entre outros (Originada do Latim)
---------------	-----------------------------------

UNIDADES DE MEDIDA

μA	Microampere
μC	Microcolumb
μS	Microsssegundo
A	Área
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro Quadrado
cm^3	Centímetro Cúbico
dB	Decibel
F	Frequência
g	Gramma
Hz	Hertz (Unidade de Frequência)
Kg	Quilograma
m^2	Metro Quadrado
mA	Miliampere
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro(s)
ms	Milissegundo
°C	Grau Célsius
Q	Carga de Fase
R	Intervalo entre os Pulsos
t	Tempo
V	Volts

ABREVIATURA

ATP	Adenosina Trifosfato
CA	Corrente Alternada
CBI	Corrente de Baixa Intensidade
CD	Corrente Direta
CMV	Citomegalovírus
CP	Corrente Pulsada
D	Densidade
FGF-β	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fator de Crescimento de Fibroblastos)
HVPC	<i>High Voltage Pulsed Current</i> (Corrente Pulsada de Alta Voltagem)
I	Intensidade
I_{RMS}	<i>Root Mean Square</i> (Média da Raiz Quadrada)
LVPC	<i>Low Voltage Power Converter</i> (Corrente Pulsada de Baixa Potência)
MEC	Matriz Extracelular
HVPGS	<i>High voltage pulsed galvanic stimulation</i> (galvânica pulsada de alta voltagem),
TENS	<i>Transcutaneous Electrical Nerve Stimulator</i> (Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea ou Corrente Bifásica Simétrica)
TEPS	<i>Trans-Epithelial Potential</i> (Potências Epiteliais e Transepiteliais)

SÍMBOLOS

(*)	Significância Estatística
%	Porcentagem
<	Menor
≤	Menor ou Igual
±	Mais ou Menos
D	Densidade
n	Amostra

RESUMO

RESUMO

INTRODUÇÃO: Pesquisas *in vitro* evidenciam que a diferença de potencial bioelétrico de uma corrente elétrica pode influenciar a proliferação de fibroblastos e a síntese de fibras colágenas de uma incisão. **OBJETIVO:** Investigar o efeito da corrente elétrica pré-operatória na cicatrização, em pele de ratos. **MÉTODOS:** Quarenta ratos foram distribuídos em: Grupo Controle, 20 ratos foram anestesiados e submetidos a uma incisão no dorso, sem a aplicação da corrente. O Grupo Estimulado, 20 ratos foram estimulados eletricamente (corrente elétrica pulsada retangular, com frequência de 7,7Hz e intensidade de 8mA) no dorso durante 30 minutos, no pré-operatório, cuja incisão foi realizada dois minutos após o término da estimulação. O eletrodo com polaridade positiva foi colocado no dorso do rato, e o eletrodo negativo na parede abdominal. Nos 7º e 14º dias foram coletadas a pele do rato e o tecido cicatricial, sendo os animais submetidos à eutanásia. Foi realizada histomorfometria para infiltrado inflamatório, vasos neoformados, fibroblastos, para colágeno tipos I e III. **RESULTADOS:** O Grupo Estimulado, no 7º dia, apresentou maior quantidade de vasos sanguíneos e fibroblastos, assim como diferença estatística com menor densidade do colágeno tipo III, mas não revelou diferença estatística, quanto aos mastócitos e às fibras de colágeno tipo I. **CONCLUSÃO:** A estimulação elétrica com polaridade positiva, no pré-operatório, aumentou a quantidade de fibroblastos e de vasos sanguíneos e diminuiu a densidade do colágeno tipo III na cicatriz no 7º dia pós-operatório.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas *in vitro* evidenciaram que a corrente elétrica pode influenciar a proliferação de fibroblastos e a síntese de fibras de colágenos (BASSETT & HERRMANN, 1968; ALVAREZ *et al.*, 1983; CHU *et al.*, 1990).

Na pele íntegra existe uma diferença de potencial elétrico, denominada bateria cutânea, representada por uma eletronegatividade no nível da camada córnea e uma eletropositividade na camada subdérmica (JAFFE & VANABLE, 1984). Estabeleceu-se, assim, que a maior parte da resistência elétrica da pele ocorre pelo estrato córneo, e que o potencial elétrico é gerado nas camadas profundas da derme (BARKER, JAFFE & VANABLE, 1982).

As propriedades bioelétricas da pele associam-se às contínuas despolarizações e repolarizações dos axônios (BESNÉ, DESCEMBES, BRETON, 2002). As fibras nervosas tipo C e tipo A- δ (amielinizadas e pouco mielinizadas, respectivamente), além de suas funções sensoriais, também são mediadoras primárias do processo cicatricial da pele, por meio das correntes bioelétricas geradas (BECKER, 1961; BARKER, JAFFE & VANABLE, 1982; BORGENS, 1988). Por ocasião de um ferimento cutâneo, a corrente de lesão é oriunda de uma alteração abrupta da diferença de potencial entre a margem da lesão e os tecidos circunjacentes (FOULDS & BARKER, 1983).

As feridas secas apresentam resistência elétrica aumentada e, conseqüentemente, deficiência de Adenosina Trifosfato (ATP). Em contrapartida, microcorrentes com frequência de 900 hertz (Hz) e

intensidade de 500 microampères (μA) estimulam as atividades fisiológicas extracelulares. O ATP é um fator essencial no processo de reparo tecidual, grandes quantidades de ATP são requeridas para controlar funções primárias como o movimento do sódio, potássio, magnésio e cálcio, intra e extracelular sustentando, bem como, o fluxo dos resíduos dos produtos metabólicos para o exterior das células. Tecidos lesionados são deficientes em ATP, e essas disfunções podem alterar o curso da reparação tecidual (CHENG & SNELLEN, 1982).

Em humanos, após a aplicação de corrente de polaridade positiva em feridas, observaram-se cicatrizes de menor espessura. Resultados semelhantes com esse tipo de aplicação também foram observados em cicatrizes fibroproliferativas, como as hipertróficas e quelóide, distúrbios cicatriciais caracterizados pela hiperplasia e hipersecreção dos fibroblastos, com níveis intrínsecos aumentados de ATP (CHENG *et al.*, 1982; WEISS, EAGLESTEIN & FALANGA, 1989; HOCHMAN *et al.*, 2004).

Por conseguinte, mudanças do campo elétrico, após uma lesão cutânea, alteram o processo cicatricial. Sendo os mecanismos bioelétricos responsáveis pela deflagração primária do processo cicatricial, pode-se sugerir que uma mudança do potencial bioelétrico, previamente a uma incisão cutânea, poderia alterar o curso da cicatrização (REINISCH & MYERS, 1974; BECKER, 1982; CHENG & SNELLEN, 1982; WEISS, KIRSNER & EAGLSTEIN, 1990).

Esta pesquisa propõe uma ampla discussão, até agora não explorada, no sentido de modular o processo de cicatrização e alterar a sua evolução antes de um procedimento cirúrgico.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar a estimulação elétrica com polaridade positiva pré-incisional na cicatrização, em pele de rato.

LITERATURA

3 LITERATURA

3.1 BATERIA CUTÂNEA

BARKER, JAFFE & VANABLE (1982) descreveram uma bateria cutânea em cobaia e o comportamento da diferença de potencial cutâneo após realizar uma incisão. Foi estabelecido que a maior parte da resistência elétrica da pele ocorria pelo estrato córneo. Os autores sugeriram que o potencial cutâneo seria capaz de impulsionar substâncias até as feridas, sendo que os gradientes de voltagem da pele das margens lateral da ferida pudessem ser responsáveis pela migração das células epidérmicas por intermédio de uma ferida em processo de cicatrização.

FOULDS & BARKER (1983) mensuraram a bateria cutânea da pele em humanos e animais, selecionaram 17 pacientes com idade de 22 a 70 anos. Um dos eletrodos foi fixado na pele umedecida (tórax, membros inferiores e superiores) com solução salina a 0,9% e o outro ligado a um voltímetro que mede a impedância da pele. Concluíram que a pele sofreu interferências do corpo como suor, idade, gênero e a localização dos dermatômos. Em todas as regiões da pele avaliadas a medida foi de, aproximadamente, -23mV, enquanto que a bateria cutânea dos grupos de anfíbios e salamandras, mediu cerca de 40mV.

JAFFE & VANABLE (1984) preconizaram que o potencial transcutâneo em uma ferida ocorria na epiderme, cuja bateria cutânea era igual a zero, enquanto que a voltagem transcutânea normal da pele é 40-80mV. Portanto, existia um gradiente de voltagem lateral entre o ferimento

e a epiderme adjacente. Quando havia lesão no tecido, com ruptura, o gradiente de voltagem era abrupto, apresentando um valor médio de $140 \pm 20\text{mV}$. Junto à lesão, a epiderme era eletricamente positiva, em relação à pele circunjacente, demonstrando que a corrente elétrica possui a capacidade de normalizar a reparação tecidual.

3.2 CORRENTE DE LESÃO

CHENG *et al.* (1982) relataram o aumento da concentração de ATP, síntese de proteínas e transporte na membrana em nível intracelular, decorrente da aplicação da microcorrente. Utilizou-se a pele de rato *in vivo*, dividindo-a em duas partes iguais; uma para o grupo controle e outra para o grupo experimental, exposto a marcadores radioativos, que detectaram variações; entre $0,1\mu\text{A}$ e $30.000\mu\text{A}$. Porém, correntes de 1 a 5 miliamperes (mA), provocaram a diminuição desses níveis e a síntese de proteína diminuiu em até 50% quando exposta a correntes de 5mA. Correntes de baixa intensidade (CBI) estimularam atividades fisiológicas como o movimento do sódio, do potássio, do magnésio e do cálcio, intra e extracelular, enquanto que estímulos mais altos poderiam inibir ou mesmo abolir essa atividade. Tecidos lesados apresentaram resistências elétricas aumentadas, com conseqüente deficiência de ATP; correntes superiores a $1000\mu\text{A}$ passaram a inibir a síntese de proteínas, demonstrando que disfunções da corrente de lesão poderiam alterar o curso da reparação tecidual.

BALAKATOUNIS & ANGOULES (2008), em estudo randomizado e controlado com placebo, revisaram a eficácia da estimulação elétrica de baixa intensidade, aplicado em feridas, verificando a semelhança da CBI com a corrente de lesão no corpo humano. A análise revelou que a CBI promoveu a cicatrização das feridas, parecendo ser eficaz na faixa de 200-800 μ A. A corrente poderia ser contínua ou pulsada e a polaridade poderia ser ou não invertida. Concluíram que a CBI acelerou a cicatrização das feridas.

3.3 CAMPO ELÉTRICO

BASSETT & HERRMANN (1968) demonstraram em células de humano que fibroblastos expostos *in vitro* a campo elétricos de corrente direta (CD), medindo 1000mV, apresentaram elevação de 20% na síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) e até 100% na síntese de colágeno, após o 14º dia de tratamento. O estudo não menciona qual o tipo de exame aplicado para se medir a CD.

FALANGA, BOURGUIGNON & BOURGUIGNON (1987) mostraram que a eletroestimulação aumentou os receptores do Fator de Crescimento de Fibroblastos beta ($TGF-\beta$) em cultura de fibroblastos da derme, de humanos e suínos. Em humanos as células foram estimuladas por corrente galvânica de 100 pulsos por segundos e 100 volts (V); tiveram níveis de receptores $TGF-\beta$, seis vezes maiores quando comparados o grupo controle e estimulados em humanos. Em suínos essa mesma aplicação foi mensurada 20 e 60 minutos após o término da utilização da corrente, houve

um aumento de 10% da síntese de colágeno, quando comparado aos grupos controle e estimulado destes animais.

MERTZ *et al.* (1993) avaliaram a migração celular na epiderme por sete dias, após duas sessões de 30 minutos de estimulação com corrente pulsada (CP) monofásica, em feridas induzidas em ovinos. Observaram que os ferimentos tratados com catodo (pólo negativo), no mesmo dia, seguidos por um anodo nos dias 1 e 7 demonstraram um índice 20% mais alto de re-epitelização, quando comparados aos ferimentos tratados com alternância de polaridade positiva e negativa que revelou igual aumento de 9% de re-epitelização. Concluíram que a corrente elétrica, com catodo e anodo, foi mais eficaz na re-epitelização em feridas quando aplicado em dias alternados.

KLOTH (2005) realizou uma revisão na literatura sobre mudanças nas células epiteliais e na distribuição de atividade induzidas por campos elétricos constantes. Essa mobilidade celular e a galvanotaxia conduzem a atração de células pelo anodo (pólo positivo) e catodo (pólo negativo), neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e células da crista neural. Os leucócitos migram para o anodo em correntes baixas com 15mV. Os macrófagos migram tanto para o catodo como para o anodo dependendo da força do campo. O autor observou que estímulos elétricos com CP tiveram um efeito mais rápido na re-epitelização e angiogênese precoce, em queimaduras de suínos tratados com polaridade positiva em relação aos tratados com polaridade negativa.

3.4 CORRENTES EM RETALHOS

REINISCH & MYERS (1974) estudaram a viabilidade de dois retalhos cutâneos de suínos. Foram dispostos quatro eletrodos medindo 5 por 16 centímetros (cm) em paralelo à região do dorso superior do pedículo. Os animais foram pré-tradados com correntes elétricas bipolares de baixa intensidade 400, 600 e 800 μ A, durante sete dias, embora não tenha sido mencionado o tempo de aplicação da corrente durante o experimento. O retalho foi analisado sete dias após a sua elevação. Os animais tratados com 400 μ A não obtiveram melhora significativa da viabilidade dos retalhos quando comparados aos animais do grupo controle. Os animais tratados com intensidades de 600 e 800 μ A apresentaram melhor viabilidade no retalho. Os autores concluíram que os animais tratados com intensidades mais altas no pré-operatório, obtiveram melhor viabilidade no retalho cutâneo dos suínos.

3.5 APLICAÇÃO DE CORRENTE ELÉTRICA EM SUÍNOS

ALVAREZ *et al.* (1983) estudaram os efeitos da estimulação com CD em porcos, com intensidade (50-300 μ A). Durante todo o experimento, o eletrodo situado na lesão foi positivo, e o eletrodo negativo (dispersivo) aplicado a 20cm da lesão. Foram comparados os grupos controle e experimental numa avaliação subsequente para a re-epitelização, e síntese de colágeno. O revestimento epitelial foi mais rápido e o colágeno aumentou no grupo de estimulação por CD. De acordo com o resultado pôde-se sugerir que a proliferação e a capacidade de migração do epitélio

envolvendo células do tecido na reparação e regeneração pode ser afetada por campo elétrico.

REICH *et al.* (1991), em seu experimento com quatro suínos aplicando CP monofásica, com intensidade de 35mA, e 128Hz, pulsos de 140 μ s, por 30 minutos, o eletrodo aplicado na ferida, no dorso do animal, foi com polaridade positiva durante todo o estudo. Uma diminuição na quantidade de mastócitos foi observada, sem evidência de que a estimulação elétrica houvesse induzido a degranulação dos mastócitos. Duas explicações foram sugeridas para esse fato: a primeira, de que o estímulo elétrico positivo diminuiu e reduziu a vascularização no ferimento, inibindo a quantidade de mastócitos; a segunda estaria relacionada com a concentração dos íons, pois, o mecanismo primário pelo qual a eletroestimulação afeta o tecido vivo, ocorre por transferência iontoforética do material condutor. Conseqüentemente, retardava a proliferação e a migração de mastócitos.

3.6 CORRENTE ELÉTRICA EM ROEDORES

CHU *et al.* (1990) investigaram os efeitos da CD de baixa intensidade (20-40 μ A) com pólo positivo (anodo) no dorso do rato, 40 μ A por dois dias, e, em cobaia, 20 μ A por três dias. Os 220 animais foram distribuídos em dois grupos (controle e experimental). O resultado mostrou que ocorreu mais revascularização nos ferimentos e menos inflamação no sétimo dia de tratamento, menor proliferação de fibroblastos, na epiderme, e de tecido de granulação e fibrose.

BACH *et al.* (1991) investigaram o efeito da estimulação com CD e corrente alternada (CA), aplicadas no dorso do rato com uma incisão de seis cm. Nos três grupos, igualmente compostos por dez animais, incluindo grupo controle, a CD empregada foi de 20 μ A por 60 minutos e CA 100 μ A por 15 minutos todos os dias. Tanto a CD quanto a CA revelaram aumento significativo do colágeno em torno da incisão, quando comparados com o grupo controle. O aumento do colágeno não intensificou a força tensil na incisão. Concluíram que a estimulação por períodos de pequena duração promoveu resultados significativos na formação de colágeno em lesões cirúrgicas.

MEHMANDOUST *et al.* (2007) compararam os efeitos da estimulação elétrica sobre a atração da positividade ou negatividade que as células carregam em direção a um campo elétrico de polaridade oposta. A corrente utilizada foi a pulsada (pulso quadrado) na cicatrização de lesões. Em estudo randomizado controlado, 42 cobaias foram distribuídas entre um grupo controle e quatro grupos experimentais. Foi realizada uma incisão no dorso de todas as cobaias. A corrente aplicada foi de 300 a 600 μ A, 80 pulsos, e de 0,3 milissegundos (ms); durante uma hora por dia. Os resultados indicaram que as estimulações, em ambos, catodo e anodo, elevaram a taxa de fechamento das incisões. O grupo controle, ao final do 14^o dia, mostrou um aumento da força tensil com o anodo (positivo) comparado com o catodo (negativo). Concluíram que a estimulação elétrica, independente do tipo de polaridade, causou benefícios no processo de cicatrização. Esse estudo mostrou que o estímulo aplicado com o anodo (positivo), nos primeiros três dias, e com o catodo (negativo) nos demais dias, poderia conduzir a um maior reparo tecidual. Para se compreender

melhor os efeitos dos mecanismos da estimulação elétrica na cicatrização, os autores sugeriram medição do potencial elétrico no local da incisão, durante o período de cicatrização.

3.7 APLICAÇÃO DE CORRENTE ELÉTRICA EM HUMANOS

WEISS, EAGLESTEIN & FALANGA (1989), em estudo com quatro pacientes, compararam a espessura das cicatrizes e formação de cicatrizes hipertróficas no local doador de enxerto parcial de pele. Obteve-se, de cada paciente, bilateralmente, um enxerto da região anterior da coxa. Um dos lados recebeu eletroestimulação, e o outro destinado ao controle. A aplicação da estimulação elétrica iniciou-se no dia da cirurgia e consistiu de duas sessões diárias de 30 minutos cada, por sete dias. A corrente aplicada foi a pulsada monofásica de 128 Hz por segundo; os pulsos tinham duração de 150 μ s, e uma intensidade de 35mA. O eletrodo aplicado nas lesões foi mantido com polaridade positiva durante todo o estudo. Os resultados sugeriram que as cicatrizes nos locais doadores, submetidos ao tratamento com estimulação elétrica, eram de melhor qualidade, ou seja, mais macias, achatadas, em relação às cicatrizes não tratadas. Os autores realizaram biopsia que corroboraram esses resultados, e observaram menor quantidade de mastócitos nas cicatrizes estimuladas. O efeito da estimulação elétrica nessas condições sugeriu que essa modalidade poderia diminuir a fibrose, possivelmente, por meio da redução no número de mastócitos.

3.8 ALTERAÇÃO DO PH DA PELE COM A ESTIMULAÇÃO

NEWTON & KARSELIS (1983) em estudo com 33 pacientes do gênero feminino e 7 do masculino, investigaram a irritação da pele íntegra ao aplicar a estimulação elétrica com eletrodos. A mensuração do pH foi realizada, por 30 minutos, na superfície da pele antes e após a aplicação da corrente galvânica pulsada de alta voltagem (*High voltage pulsed galvanic stimulation - HVPGS*), com diferentes voltagens (100V, 80 e 82Hz por segundo). O eletrodo aplicado na superfície da pele foi com polaridade negativa na região lombar e positiva na região ventral durante todo o estudo. Concluíram que não houve mudança do pH na região lombar, após a aplicação da corrente (*HVPGS*). Os autores sugeriram, de acordo com a literatura (CHIKAKANE & TAKAHASHI, 1995), que a inalteração do pH na pele com o uso da corrente (*HVPGS*) deveu-se a dois possíveis fatores: (a) pulsos de curta duração, bem como o tempo de permanência da corrente elétrica na pele; (b) a ausência de doenças dermatológicas na pele, a diferença do tamanho dos eletrodos. Isto ocorre para reações ácido e base na superfície do eletrodo.

MÉTODOS

4 MÉTODOS

O desenho desta pesquisa foi primário, experimental, analítico, prospectivo, controlado e cego.

4.1 AMOSTRAGEM

A amostra foi composta de 40 roedores da raça *Wistar-EPM* (*Rattus norvegicus*) adultos, machos, com massa corpórea entre 270g e 350g, oriundos do biotério central do Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Os animais foram confinados no biotério daquele laboratório, em gaiolas individuais de plástico, com tampa metálica própria para dispor o recipiente com água e ração comercial. O ambiente foi mantido, por meio de dispositivos eletrônicos, em temperatura constante de 22°C, no período controlado de 12 horas de luz. Houve período de aclimação de uma semana.

4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Os 40 animais foram distribuídos em dois Grupos de 20 ratos sendo: Grupo Controle, no qual foi realizada uma incisão no dorso do rato, sem a aplicação da corrente; Grupo Estimulado, no qual eletrodos foram dispostos no dorso do rato, com a aplicação da corrente durante 30 minutos, antes da incisão.

O Grupo Controle e o Grupo Estimulado foram distribuídos em dois subgrupos de dez ratos cada, de acordo com o dia de eutanásia, no 7º e 14º dias, para coleta das amostras de tecido. Os animais foram sorteados pelo método de sigilo de alocação em envelope opaco, e selados. O *software* de tratamento dos dados foi o BioEstat, versão 5.0. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 100mg/kg de Cloridrato de Quetamina (Dopolen[®]) com 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Anasedam[®]). Após três minutos da indução anestésica, foi realizada a depilação manual no dorso do rato (FIGURA 1).

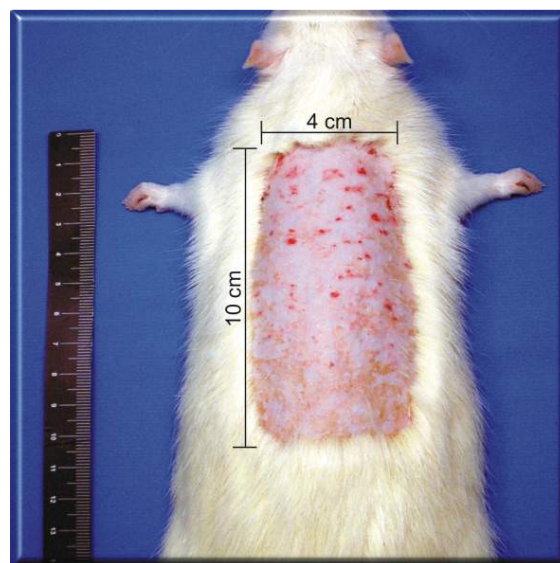


FIGURA 1. Área com epilação manual do dorso do rato, com 4cm de largura e 10cm de comprimento.

4.3 APLICAÇÃO DOS ELETRODOS

Foram aplicados eletrodos de alumínio, com dimensões de 5,0 x 3,0 cm, em esponja de celulose umedecidas em solução salina a 0,9% do mesmo tamanho dos eletrodos, e respectivamente acopladas. O conjunto eletrodo-esponja foi fixado com Velcro[®]. Esses eletrodos foram colocados no dorso do animal, em sentido crânio caudal na linha mediana do dorso, a partir de uma linha transversa no ângulo inferior das escápulas. O eletrodo negativo foi disposto sobre a linha mediana ventral, entre os membros superiores e inferiores no sentido crânio caudal (FIGURAS 2 e 3).

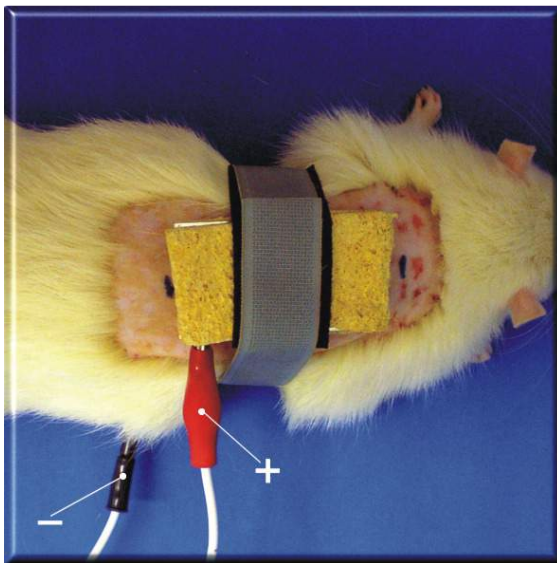


FIGURA 2. Aplicação do eletrodo positivo no dorso do rato (cabo cor vermelha).

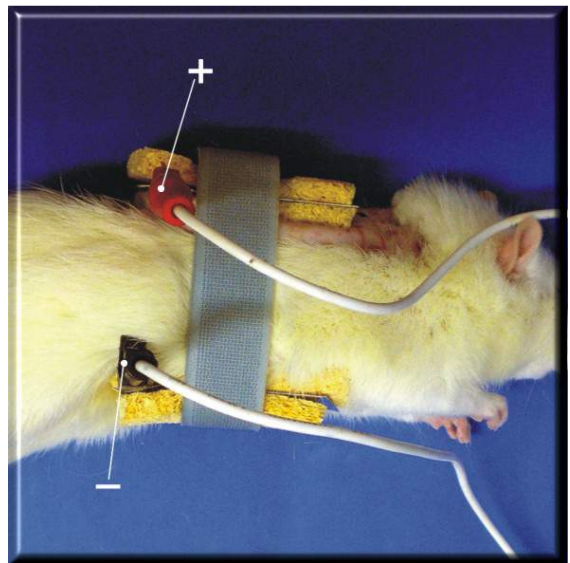


FIGURA 3. Aplicação do eletrodo negativo no abdome do rato (cabo cor preta).

4.4 ELETROESTIMULAÇÃO

O equipamento usado para o experimento foi um gerador de corrente com amplitude total de 70mA, da marca Quark®, modelo Nemesys® N941, digital, controlado por microprocessador, com um canal de saída, à corrente elétrica utilizada foi pulsada monofásica retangular, a corrente aplicada neste estudo foi reduzida para 8mA, adequando-se ao tamanho dos eletrodos (5,0 x 3,0 totalizando uma área de 15cm) para emprego nos ratos. A fórmula aplicada foi $d=I/a$ (densidade igual à intensidade sobre a área dos eletrodos), com frequência de 7,7Hz, e amplitude de 8mA, a soma da média das cargas (IRMS = 0,143mA), a Densidade de Corrente: 0,53mA/cm², durante 30 minutos (FIGURA 4).

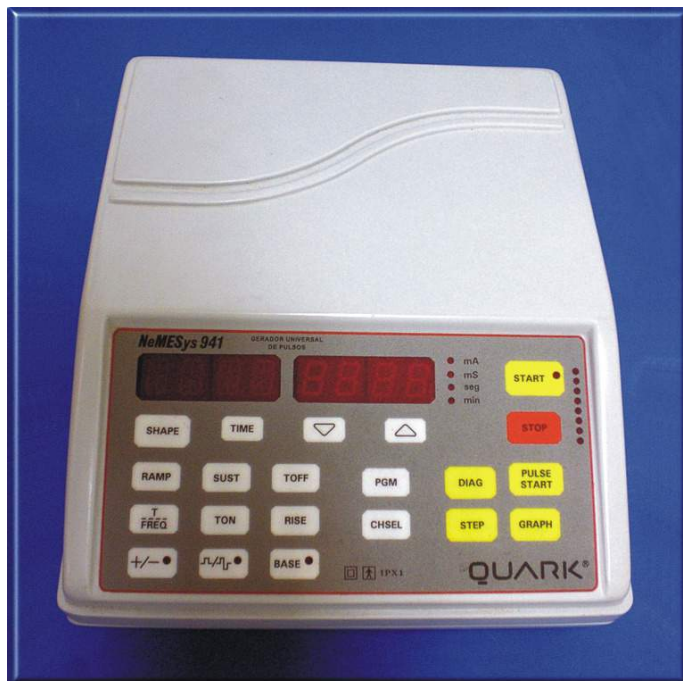


FIGURA 4. Aparelho de eletroestimulação.

Diagrama do aparelho:

- Corrente pulsada monofásica retangular
- Amplitude (A);
- Tempo de Duração do Pulso (T) = 0,14ms
- Intervalo entre Pulsos (R) = 7,7ms
- Frequência (f) = 7,7Hz

O aparelho foi aferido antes do início da fase experimental e ao seu término, na instituição credenciada (ANEXO II).

4.5 TÉCNICA OPERATÓRIA

Cada animal foi posicionado em decúbito ventral em superfície plana, cuja área operatória foi delimitada por campos cirúrgicos. Demarcou-se com caneta hidrográfica, para ambos os Grupos, Controle e Estimulado, a delimitação da incisão de seis cm de comprimento, padronizado a uma distância de 1,5cm de um ponto ao outro, e a 0,5cm de distância da incisão ao ponto (FIGURA 5).

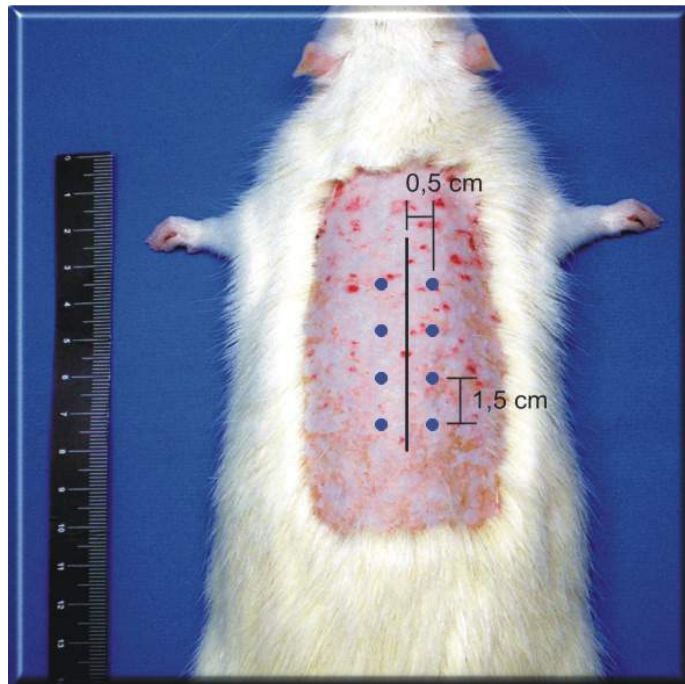


FIGURA 5. Área com demarcação da incisão de 6cm, distância da incisão ao ponto médio 0,5cm e distância entre os pontos foi de 1,5cm.

A incisão foi realizada no dorso do rato no sentido crânio-caudal, longitudinalmente, na linha mediana dorsal, por meio de bisturi, com lâmina nº 15, estéril. A incisão incluiu pele e panículo carnosos até a fáscia

muscular superficial. O ponto inicial da incisão teve como limite superior a linha transversa nível dos ângulos inferiores das escápulas.

O fio utilizado na sutura com pontos separados foi náilon monofilamentar 4-0. A hemostasia foi realizada por suave manobra de compressão com gaze estéril seca, durante três minutos, quando houve necessidade, sem curativo nos procedimentos (FIGURAS 6 e 7).

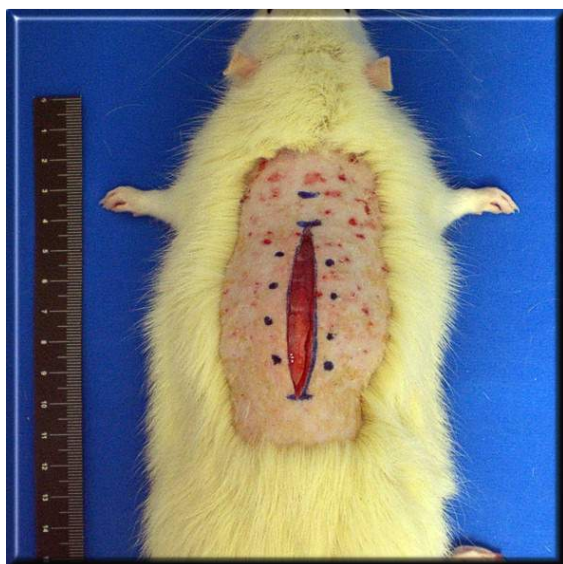


FIGURA 6. Dermoarcação da sutura que mediu 6cm e dos pontos separados.

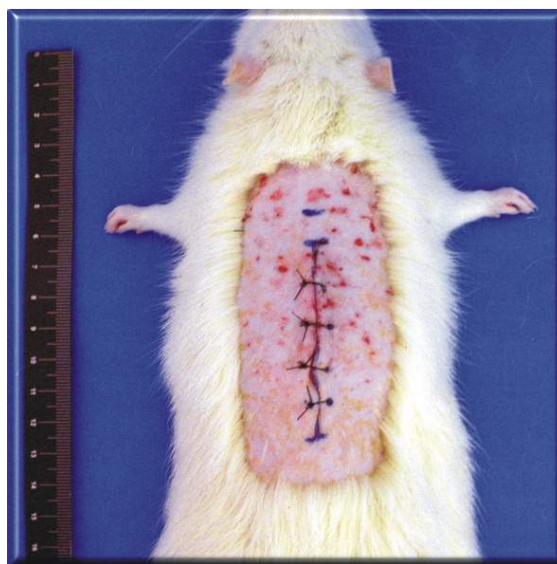


FIGURA 7. Aspecto final da sutura.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.6.1 Obtenção das amostras de tecido para análise

No 7º e 14º dias de pós-operatório, os animais dos subgrupos controle e estimulado, foram novamente anestesiados pelo mesmo método da área demarcada. A pele foi seccionada com bisturi e removida da área do tecido cicatricial com o auxílio de pinça e tesoura, retirando-se a amostra de tecido entre o segundo e terceiro pontos, a amostra mediu 2cm de comprimento no total, incluindo 1cm de pele bilateralmente a incisão, tendo como ponto médio a incisão (FIGURAS 8 e 9).

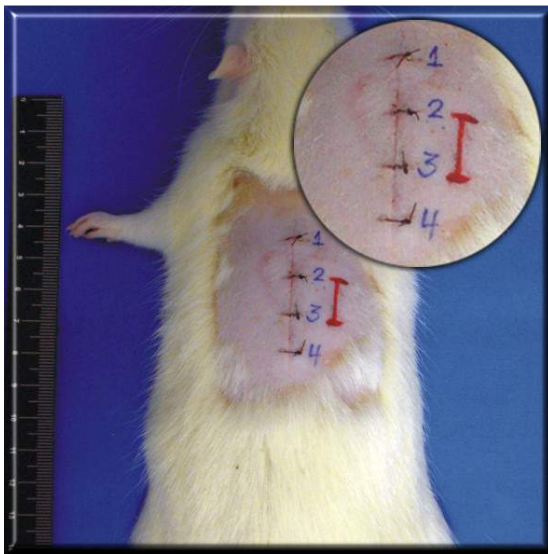


FIGURA 8. Marcação entre os pontos 2 e 3 para a remoção da amostra.

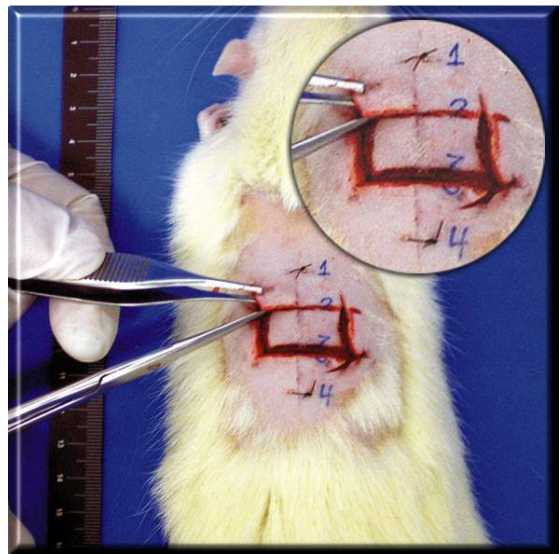


FIGURA 9. Retirada da amostra final entre o segundo e terceiro ponto.

A seguir, os animais foram submetidos à eutanásia por hiperdosagem anestésica de ketamina de 500mg/kg + 250mg/kg de Xilazina, de acordo com a norma do Colégio Brasileiro Experimental de Animal (COBEA).

Após a remoção, as amostras foram fixadas em cortiças para evitar a retração da pele e colocadas em formaldeído tamponado a 10% até o momento do preparo das lâminas. Posteriormente, foram enviadas ao laboratório da Disciplina de Anatomia Patológica do Departamento de Morfologia da Unifesp para análise histológica e imuno-histoquímica.

No laboratório de histologia, o fragmento coletado de pele foi seccionado e nivelado ao ponto médio da cicatriz, com espessura de dois mm e, cada fragmento, foi acondicionado em caixas plásticas apropriadas para o processamento histológico da preparação em blocos de parafina. Os cortes histológicos foram regulados para o corte com a espessura de cinco μm , e as lâminas preparadas para coloração, conforme os métodos da hematoxilina e eosina e Azul de toluidina (FIGURA 10).

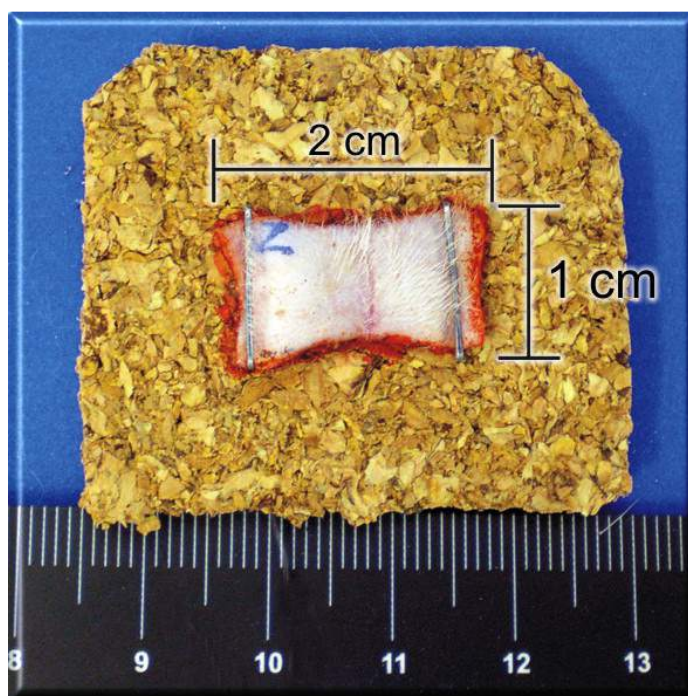


FIGURA 10. Biopsia da pele.

4.6.2 Microscopia

4.6.2.1 Equipamento e dimensões de histomorfometria

A área foi analisada em microscopia de luz (microscópio *Nikon E-800*) quanto à presença das células do processo inflamatório, fibroblastos, vasos neoformados, mastócitos, e fibras de colágenos tipo I e III. Formaram-se dez campos de área ($19417,69\mu\text{m}^2$), totalizando $194176,90\mu\text{m}^2$ ou $0,19\text{mm}^2$ cujos parâmetros foram quantificados com auxílio do sistema de análise de imagens *Image Pro-Plus*, versão 4.5 e os resultados expressos em número de eventos por mm^2 de área de lesão. A barra de padronização de aumento da objetiva foi de $40\times$ ($400\times$) = $5\mu\text{m}$.

Hematoxilina e eosina

A coloração com hematoxilina e eosina foi realizada para verificar as células do processo inflamatório, e os fibroblastos (ANEXO III).

Azul de toluidina

O método de coloração de azul de toluidina evidenciou os mastócitos pela detecção dos grânulos metacromáticos do seu citoplasma (ANEXO III).

Imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas para pesquisa de colágeno dos tipos I e III foram realizadas com anticorpos anti-humano de coelho (ANEXO III).

Análise estatística

As variáveis numéricas foram analisadas descritivamente, por intermédio de medidas-resumo (média, mínimo, máximo, percentis e desvio padrão).

A comparação de médias das variáveis entre Grupos Controle e Estimulado, por dia, foi realizada por meio do teste t de *Student*. A suposição de normalidade foi testada empregando-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

A homoscedasticidade¹ foi testada com o teste de *Levene*. Os graus de liberdade do teste foram corrigidos, caso algum erro desta última suposição ocorresse.

Para todos os testes estatísticos foi considerada a significância de 5%.

¹ Variância iguais entre os grupos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

A densidade das fibras de colágeno do tipo III apresentou resultados estatísticos significantes no 7º dia do Grupo Estimulado, quando comparados ao Grupo Controle (TABELA 1).

TABELA 1. Análise quantitativa do colágeno tipos I e III, área total e densidade.

Grupo	7 dias			14 dias		
	Média	DP	N	Média	DP	N
Int. Dens. Colágeno I						
Controle	1.276,99	563,78	8	1.086,62	470,47	9
Estimulado	1.119,04	346,19	9	1.452,15	419,20	9
	$t^{(2)} = -0,71$ ($p = 0,4912$)			$t^{(3)} = 1,74$ ($p = 0,1010$)		
Área Marcada Total Colágeno I						
Controle	34.875,78	11.587,08	8	30.366,56	15.396,56	9
Estimulado	31.922,77	13.077,30	9	37.712,16	10.247,61	9
	$t^{(2)} = -0,49$ ($p = 0,6313$)			$t^{(3)} = 1,19$ ($p = 0,2508$)		
Int. Dens. Colágeno III						
Controle	1.272,57	281,20	9	1.302,14	871,90	9
Estimulado	953,64	282,22	9	1.024,34	320,60	9
	$t^{(2)} = -2,40$ ($p = 0,0288$)			$t^{(3)} = -0,90$ ($p = 0,3830$)		
Área Marcada Total Colágeno III						
Controle	22.073,37	4.133,31	9	23.116,11	14.926,21	9
Estimulado	14.349,09	12.193,78	9	17.346,54	7.750,79	9
	$t^{(2)} = -1,80$ ($p = 0,1027$)			$t^{(3)} = -1,03$ ($p = 0,3187$)		

A quantidade de Vasos Neoformados e Fibroblastos do Grupo Estimulado no 7º dia apresentaram diferença com significância estatística quando comparados ao 7º dia do Grupo Controle. Vasos neoformados ($p=0,0090$) e Fibroblastos ($p=0,0060$), respectivamente (FIGURA 11 e 12).

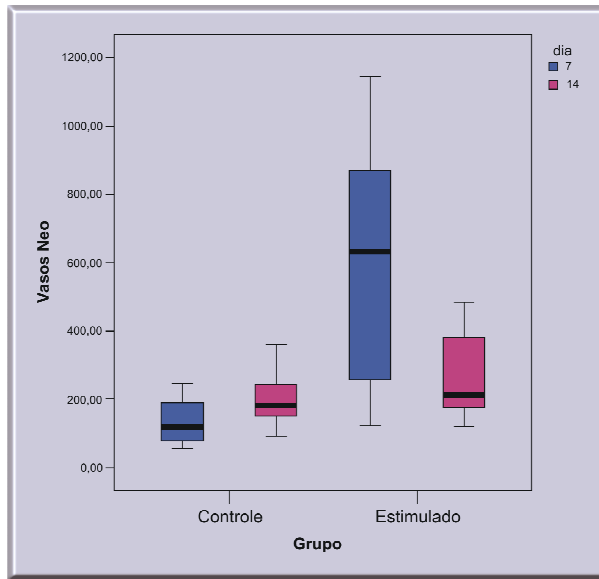


FIGURA 11. Gráfico Box-plot da mediana do 1º e 2º quartil, no 7º dia, do Grupo Estimulado ($p=0,0090^*$).

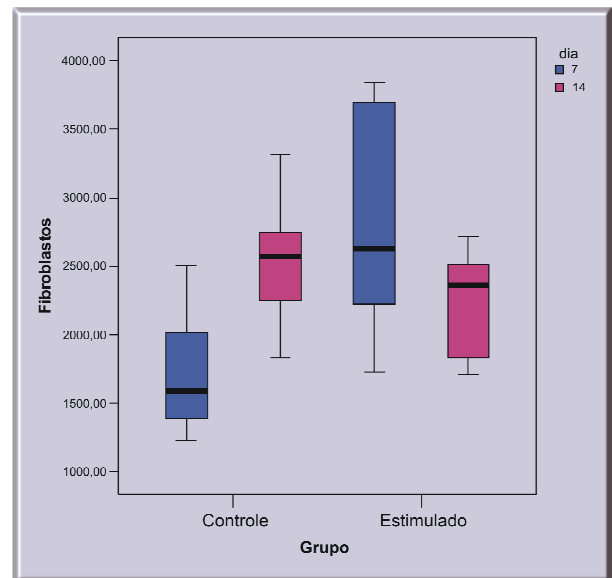


FIGURA 12. Gráfico Box-plot da mediana do 1º e 2º quartil, no 7º dia, do Grupo Estimulado ($p=0,0060^*$).

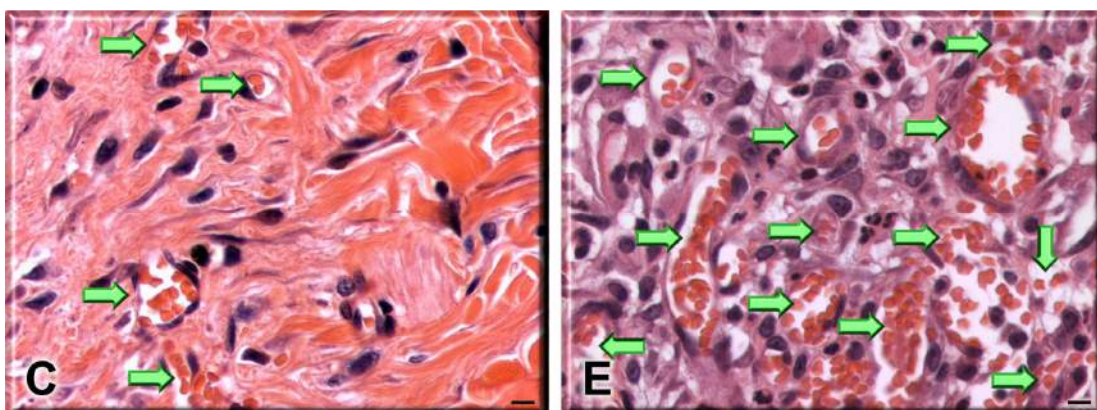


FIGURA 13. Fotomicrografia da cicatriz e pele adjacente no dorso do rato do Grupo Controle (C) e do Grupo Estimulado (E), apresentando aumento de vasos no 7º dia do grupo Estimulado, quando comparados com o grupo Controle. Setas indicam vasos dilatados e congestionados.

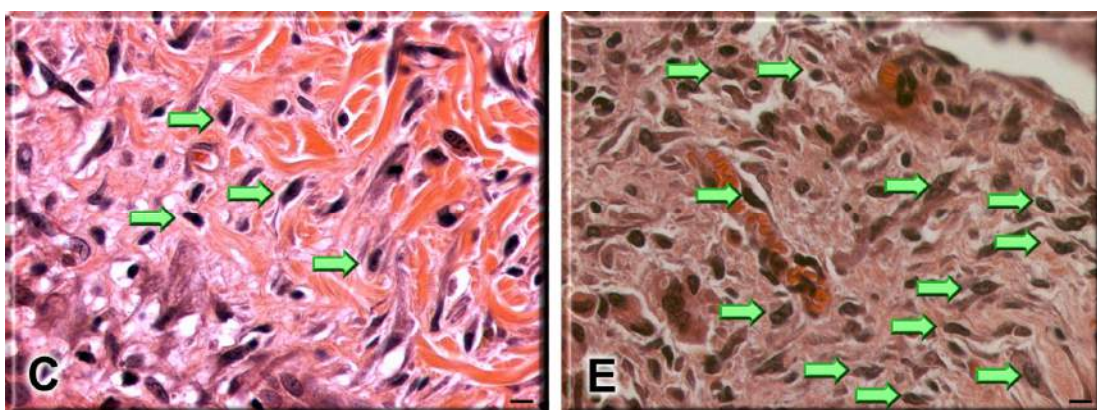


FIGURA 14. Na fotomicrografia da cicatriz e pele adjacente no dorso do rato do Grupo Controle (C) e do Grupo Estimulado (E) do 7º dia, observou-se aumento de tecido de granulação e fibroblastos. Setas indicam a presença de fibroblastos fusiformes com núcleos achatados. O 14º dia não apresentou diferenças histológicas entre os grupos Controle e Estimulado.

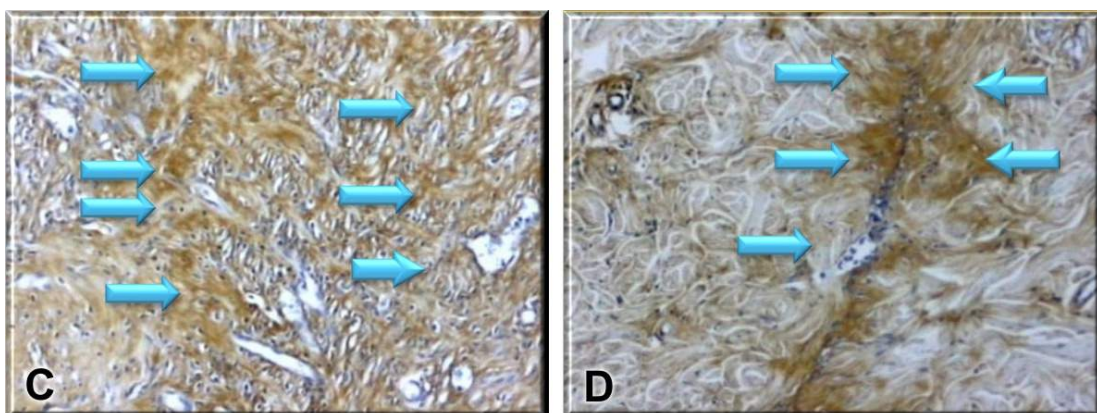


FIGURA 15. Na fotomicrografia da cicatriz e pele adjacente no dorso do rato houve diminuição na densidade das fibras de colágeno tipo III no 7º dia, do Grupo Estimulado (E) comparados com o 7º dia do Grupo Controle (C). As setas indicam um menor número de fibras de colágeno tipo III nas margens da cicatriz em relação à periferia. O 14º dia não apresentou diferenças histológicas entre os grupos Controle e Estimulado.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Ao eleger-se a eletroterapia como técnica de tratamento, considerou-se o tipo de corrente a ser aplicada e a polaridade dos eletrodos positivo e negativo. Além destas forças externas, foram geradas cargas elétricas dentro do corpo por meio dos processos fisiológicos normais (LOW & REED, 2001).

Um importante parâmetro de estimulação elétrica na cicatrização de ferida é o tipo de polaridade aplicada, o que pode afetar a síntese protéica, a migração celular, o crescimento das bactérias, a galvanotaxia, a inflamação, bem como processos de bioeletricidade, eventos que fazem parte da corrente de lesão (FOULDS & BARKER, 1983; ERICKSON & NUCCITELLI, 1984; OJINGWA & ISSEROFF, 2003; KLOTH 2005).

Estudos têm sido realizados sobre diferentes métodos quanto ao tipo de polaridade (positiva ou negativa) aplicada no período de cicatrização. Uma melhora na re-epitelização, da síntese de colágeno, e do efeito bactericida com a aplicação da polaridade negativa, tem sido relatada, dependendo do tipo de tratamento (ASSIMACOPOULOS, 1968; BARRANCO *et al.*, 1974; ALVAREZ *et al.*, 1983; BAYAT *et al.*, 2006).

Foi adotado, para a execução do presente estudo, o modelo de pele de rato considerando-se as facilidades de obtenção, de manuseio e de custo, embora se reconheça que a pele de porco seja a mais próxima da pele humana (LIEBANO, FERREIRA, NETO, 2002). O presente estudo aplicou corrente elétrica pré-incisional e adotou como modelo experimental o rato,

quando comparados a outros trabalhos que utilizaram o porco, que são distantes no aspecto filogenéticos, não revelaram similaridades com as pesquisas que empregaram a mesma corrente e intensidade, no pós-operatório, como IM, LEE, HOOPES (1990) e REICH *et al.* (1991).

Este estudo foi baseado nos parâmetros utilizados na pesquisa de REICH *et al.* (1991) — em suínos, e utilizou a densidade de 0,51mA/cm e obteve a amplitude de 35mA — porém, considerando-se que a estimulação, em altas intensidades, poderia ativar as fibras simpáticas, causando vasoconstricção cutânea com fibrilação cardíaca, levando os ratos a óbito, a amplitude da corrente aplicada neste estudo foi reduzida para 8mA, evitando-se as contrações musculares excessivas e adequando o tamanho dos eletrodos (5,0 x 3,0 totalizando uma área de 15cm) para emprego nos ratos. A fórmula aplicada foi $d=I/a$ (densidade igual à intensidade sobre a área dos eletrodos).

NEWTON *et al.* (1983) mediram o pH antes e após a colocação dos eletrodos sobre a pele. Concluíram que não houve alteração do pH com a CP de alta voltagem, com pulsos de curta duração. O mesmo ocorreu neste estudo, que utilizou a CP com pulsos retangulares, comparados com a CP de alta voltagem que possuem pulsos gêmeos pontiagudos. Neste estudo, o efeito do pH poderia ser o mesmo caso a intensidade, o tempo de duração do pulso, a frequência, o tamanho do eletrodo e o tempo de aplicação, fossem iguais ao da corrente de alta voltagem. Não foi possível afirmar que houve alteração do pH, considerando-se que esta medição não foi realizada antes e após a aplicação.

Com a aplicação da corrente pré-incisional, obteve-se resultado com significância estatística ($p=0,0060^*$), com intensa proliferação de fibroblastos no 7º dia do Grupo Estimulado, em relação ao grupo controle. O 14º dia não houve resultados estatísticos significantes. Este resultado foi similar ao obtido por FALANGA, BOURGUIGNON & BOURGUIGNON (1987), que também mostrou maior atividade de fibroblastos, embora os autores tenham aplicado a corrente somente após a incisão, com amplitudes diferentes (BOURGUIGNON & BOURGUIGNON, 1987).

Foram utilizados eletrodos com polaridade positiva do início ao final do tratamento, revelando a eficácia na epitelização e cicatrização da pele em ratos, a exemplo dos estudos de WEISS, EAGLESTEIN & FALANGA (1989), CHU *et al.* (1990); WEISS, KIRSNER & EAGLSTEIN (1990); REICH *et al.* (1991).

O presente estudo não apresentou alteração na quantidade de mastócitos, discordando dos achados da literatura, em que a estimulação elétrica com polaridade positiva, diminuía a vascularização da ferida e reduzia a quantidade de mastócitos (REICH *et al.*, 1991). Segundo STRAMER, MORI, MARTIN (2007), os mastócitos aumentaram no processo de re-epitelização e, durante a fase de proliferação, verificou-se que no 10º dia ocorreu o maior pico dos mastócitos, e no 14º dia essa quantidade diminuiu gradativamente, o que explicaria os resultados obtidos neste estudo, em que os mastócitos não tiveram alteração no 7º e no 14º dias. Outra possível explicação poderia ser atribuída aos diferentes tipos de correntes e intensidades aplicadas.

Não foram obtidos resultados estatísticos significantes das quantidades de fibras de colágeno do tipo I em densidade e área total e tipo III em área total no pré-operatório, obteve-se resultado estatístico significativo referente à densidade de colágeno do tipo III com diminuição no Grupo Estimulado. ALVAREZ *et al.* (1983), pelo contrário, observaram o aumento das fibras de colágeno no Grupo Estimulado por CD, embora em ferida existente, e não em caráter pré-incisional como foi no presente estudo. Assim, pôde-se inferir que a estimulação elétrica prévia poderia exercer o fenômeno de eletrotaxia (atrai ou repele estruturas celulares ou proteínas do local da futura incisão), conforme a polaridade do eletrodo aplicado, no caso positiva. Assim, os fibroblastos, que são eletropositivos, seriam repelidos para a periferia, diminuindo a densidade das fibras colágenas na cicatriz e aumentando-a na periferia da cicatriz. Mais estudos serão necessários para a compreensão do motivo dessa alteração específica apenas do colágeno tipo III (LUTHER, PENG, LIN, 1985, MERTZ *et al.*, 1993; KLOTH, 2005).

Muito embora a alteração no colágeno, caracterizada neste estudo, não tenha apresentado significância estatística — diferindo da literatura pesquisada que relatou que o estímulo elétrico com polaridade positiva no pós-operatório, em suínos, aumentou a re-epitelização e a síntese de colágeno na lesão (ALVAREZ *et al.*, 1983; CHU *et al.*, 1990) — esta divergência poderia ser atribuída ao estímulo pré-incisional aplicado em ratos, e não em suínos, não permitindo uma comparação entre os dois estudos.

Além deste estudo, que aplicou a estimulação elétrica (CP monofásica) no pré-operatório, somente o estudo de REINISCH & MYERS (1974) utilizou o mesmo princípio, mas com retalhos cutâneos de suínos e com o emprego de corrente elétrica diferente (corrente bipolar de baixa intensidade). Mesmo com a diferença do modelo experimental e de corrente elétrica, ambos os estudos, revelaram uma melhora na vascularização das lesões com a aplicação das correntes no pré-operatório do Grupo Estimulado no 7º dia, em que foi encontrada maior quantidade de vasos neoformados em comparação ao Grupo Controle. Este aspecto poderia ser atribuído ao efeito da CP sobre o tecido endotelial ou ser resultante de uma maior liberação de mediadores químicos² no período pré-operatório ou, ainda, advir da proliferação dos fibroblastos e vasos neoformados, como ocorreu neste estudo (BASSETT & HERRMANN, 1968; BOURGUIGNON & BOURGUIGNON, 1987; BABIC, CHEN & LAU, 1999; OJINGWA & ISSEROFF, 2003; ALAT *et al.* 2004).

Em função da observação de diferentes efeitos fisiopatológicos com a utilização dos pólos positivo e negativo, vários autores utilizaram a alternância de polaridade no decorrer das aplicações da corrente elétrica (ASSIMACOPOULOS, 1968; BROWN *et al.*, 1995; BAYAT *et al.*, 2006; BALAKATOUNIS & ANGOULES, 2008).

Uma extensa gama de correntes vem sendo utilizada para estimular a cicatrização das lesões crônicas, como por exemplo, a CD de Baixa Intensidade, CA, Corrente Pulsada Monofásica Retangular (CP), Corrente

² Fator de Crescimento de Fibroblastos- β (TGF- β - *Transforming Growth Factor β*), citocinas (interleucinas IL-1 IL-4).

Pulsada de Alta Voltagem (CPAV [*High Voltage Pulsed Current - HVPC*]) e (TENS) Correntes Pulsadas Bifásicas Balanceadas. Apesar dos estudos publicados, não existe, ainda, um consenso sobre qual seria a corrente ideal para a modulação do processo cicatricial (KLOTH *et al.*, 1988; REICH *et al.*, 1991; LUNDEBERG, ERICSSON, MALM, 1992; OJINGWA & ISSEROFF, 2003; BAYAT *et al.*, 2006; MEHMANDOUST *et al.*, 2007; BALAKATOUNIS & ANGOULES 2008).

Sabe-se que a pele, quando íntegra e em condições normais, apresenta uma corrente bioelétrica fisiológica, e uma diferença de potencial entre a superfície e as camadas profundas da pele, denominada bateria cutânea. Assim sendo, uma alteração bioelétrica da pele, previamente aplicada a uma incisão, sugere a alteração da evolução do processo cicatricial. Esta foi a hipótese adotada para este estudo, inédito na literatura.

Assim, esta pesquisa abre uma ampla perspectiva, até agora não explorada, no sentido de modular o processo de cicatrização e alterar a sua evolução, antes de um procedimento cirúrgico. Podendo, no futuro, prevenir cicatrizes atróficas ou deiscências de pós-operatório.

Para tanto, torna-se necessária a realização de mais estudos, com outros tipos de correntes com polaridades negativa e positiva, sobre incisões e lesões.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A estimulação elétrica pré-incisional aumentou a quantidade de fibroblastos e de vasos sanguíneos, e diminuiu a densidade do colágeno tipo III na cicatriz no 7º dia pós-operatório.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Alat I, Inan M, Gurses I, Kekilli E, Germen B, Harma A, Eskin A, Aydin OM. The mechanical or electrical induction of medullary angiogenesis: will it improve sternal wound healing? *Tex Heart Inst J*. 2004;31(4);363-7.

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

Assimacopoulos D. Wound healing promotion by the use of negative electric current. *Am Surg*. 1968 Jun;34(6);423-31.

Babic AM, Chen CC, Lau LF. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol*. 1999 Apr;19(4);2958-66.

Bach S, Bilgrav K, Gottrup F, Jørgensen TE. The effect of electrical current on healing skin incision. An experimental study. *Eur J Surg*. 1991 Mar;157(3);171-4.

Balakatounis KC, Angoules AG. Low-intensity Electrical Stimulation in Wound Healing: Review of the Efficacy of Externally Applied Currents Resembling the Current of Injury. *Eplasty*. 2008 May;16;8;e28.

Barker, AT, Jaffe, LF, Venable, JW Jr: The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. *Am J Physiol.* 1982 Mar;242(3);R358-66.

Barranco SD, Spadaro JA, Berger TJ, Becker RO. In vitro effect of weak direct current on *Staphylococcus aureus*. *Clin Orthop Relat Res.* 1974 May;(100);250-5.

Bassett CA, Herrmann I. The effect of electrostatic fields on macromolecular synthesis by fibroblasts in vitro [Abstract]. *J. Cell Biol.* 1968;39;9a.

Bayat M, Asgari-Moghadam Z, Maroufi M, Rezaie FS, Bayat M, Rakhshan M. Experimental wound healing using microamperage electrical stimulation in rabbits. *J Rehabil Res Dev.* 2006 Mar-Apr;43(2);219-26.

Becker RO. Electrical control systems and regenerative growth. *J Bioelectricity.* 1982;1(2);239-264.

Becker RO. The bioelectric factors in amphibian-limb regeneration. *J Bone Joint Surg Am.* 1961 Jul;43-A;643-56.

Besné I, Descombes C, Breton L. Effect of age and anatomical site on density of sensory innervation in human epidermis. *Arch Dermatol.* 2002 Nov;138(11);1445-50.

Borgens RB. Voltage gradients and ionic currents in injured and regenerating axons. *Adv Neurol.* 1988;47;51-66.

Bourguignon GJ, Bourguignon LY. Electric stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblasts. *FASEB J*. 1987 Nov;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 Dec;76(12);1134-7.

Cheng KS, Snellen JW. Bioelectric activity in the rabbit ear regeneration. *J Exper Zoology*. 1982b;93-203. Chang KS, Snellen JW. Bioelectric activity in the rabbit ear regeneration. *J Exp Zool*. 1982 Jun 10;221(2);193-203.

Cheng N, Van Hoof H, Bockx E, Hoogmartens MJ, Mulier JC, De Dijcker FJ, Sansen WM, De Loecker W. The effects of electric currents on ATP generation, protein synthesis, and membrane transport of rat skin. *Clin Orthop Relat Res*. 1982 Nov-Dec;(171);264-72.

Chikakane K, Takahashi H. Measurement of skin pH and its significance in cutaneous diseases. *Clin Dermatol*. 1995 Jul-Aug;13(4);299-306.

Chu CS, McManus AT, Mason AD Jr, Okerberg CV, Pruitt BA Jr. Multiple graft harvestings from deep partial-thickness scald wounds healed under the influence of weak direct current. *J Trauma*. 1990 Aug;30(8);1044-9; discussion 1049-50.

Erickson CA, Nuccitelli R. Embryonic fibroblast motility and orientation can be influenced by physiological electric fields. *J Cell Biol*. 1984 Jan;98(1);296-307.

Falanga V, Bourguignon GJ, Bourguignon LY. Electrical stimulation increases the expression of fibroblast receptors for transforming growth factor-beta [Abstract]. *J Invest Dermatol*. 1987;88(4);488.

Foulds IS, Barker AT. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. *Br J Dermatol*. 1983 Nov;109(5);515-22.

Hochman B, Ishizuka CK, Ferreira LM, Oliveira LQR, Locali RF. Disfunções cicatriciais hiperproliferativas: cicatriz hipertrófica - Parte I. *Estima*. 2004;2(3);32-9.

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

Jaffe LF, Venable JW Jr. Electric fields and wound healing. *Clin Dermatol*. 1984 Jul-Sep;2(3);34-44.

Kloth LC, Feedar JA. Acceleration of wound healing with high voltage, monophasic, pulsed current. *Phys Ther*. 1988 Apr;68(4);503-8. Erratum in: *Phys Ther* 1989 Aug;69(8);702.

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 Mar;4(1);23-44.

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

Lundeberg TC, Eriksson SV, Malm M. Electrical nerve stimulation improves healing of diabetic ulcers. *Ann Plast Surg.* 1992 Oct;29(4);328-31.

Luther PW, Peng HB, Lin JC. Changes in cell shape and action distribution induced by constant electrical fields. *Nature* 1985;303;61-64.

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);611-8.

Mertz P, Davis S, Cazzaniga A, Cheng K, Reich JD, Eaglstein WH. Electrical stimulation: Acceleration of soft tissue repair by varying the polarity. *Wounds.* 1993;5(3);153-59.

Newton RA, Karselis TC. Skin pH following high voltage pulsed galvanic stimulation. *Phys Ther.* 1983 Oct;63(10);1593-6.

OJNGWA JC, Isseroff RR. Electrical stimulation and wound healing. *J Invest Dermatol.* 2003;121(1);1-12.

Reich JD, Cazzaniga AL, Mertz PM, Kerdel FA, Eaglstein WH. The effect of electrical stimulation on the number of mast cells in healing wounds. *J Am Acad Dermatol.* 1991 Jul;25(1 Pt 1);40-6.

Reinisch JF, Myers MB. Survival of experimental flaps pretreated with low-intensity direct current electrical delay. *Surg Forum*. 1974;25(0);522-3.

Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol*. 2007 May;127(5);1009-17.

Weiss DS, Eaglstein WH, Falanga V. Exogenous electric current can reduce the formation of hypertrophic scars. *J Dermatol Surg Oncol*. 1989 Dec;15(12);1272-5.

Weiss DS, Kirsner R, Eaglstein WH. Electrical stimulation and wound healing. *Arch Dermatol*. 1990;126;222-25.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

BIREME. Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. DeCS: descritores em ciências da saúde [citado em 01 abr 2006]. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>.

Houaiss A. Dicionário Eletrônico Houaiss da Língua Portuguesa (CDROOM). São Paulo: Objetiva; 2002.

Sociedade Brasileira de Anatomia. Comissão Federativa da Terminologia Anatômica. Terminologia anatômica internacional. São Paulo: Manole; 2001.

UNIFESP. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica Reparadora. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses. São Paulo; 2008.

ABSTRACT

ABSTRACT

BACKGROUND: In vitro studies have demonstrated that electrical current may affect the proliferation of fibroblast, and synthesis of collagen fibers. **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of preoperative electrical stimulation on cutaneous wound healing in rats. **METHODS:** Forty rats were divided into two groups of 20 animals each. In the control group, an incision was made on back of the animals. In the stimulation group, a preoperative electrical stimulation was applied using a rectangular pulse current at a frequency of 7.7Hz, and intensity of 8mA, for 30 minutes, with the positive electrode placed on the back of the animal, and the negative electrode placed on the abdominal wall. Following, an incision was made on their back. Biopsy on the postoperative days 7 and 14, and histological analysis was performed. **RESULTS:** The stimulated group, at day 7, showed a greater number of newly formed vessels and fibroblasts, and a statistical difference with lower density of collagen type III, but no statistical difference were observed for mast cells and fibers of collagen type I. **CONCLUSION:** Preoperative electrical stimulation with positive polarity increased the amount of fibroblasts and blood vessels and decreased the density of collagen type III in the scar at the postoperative day 7.

APÊNDICES

APÊNDICE 1.

PLANO PILOTO

PLANO PILOTO

Foi utilizada uma amostra composta por 12 ratos *Wistar-EPM*, distribuídos em três Grupos: Controle, Simulado e Estimulado. Aprovado pelo Comitê de Ética e pesquisa nº 0317/06 da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

O Grupo Controle não foi estimulado e submeteu-se apenas à incisão. No Grupo Simulado, os eletrodos foram colocados sobre o dorso do rato, porém, a corrente não foi acionada, foi realizada a incisão.

O Grupo Estimulado recebeu a corrente elétrica por 30 minutos, cuja incisão foi realizada imediatamente após.

Os Grupos foram distribuídos em três subgrupos. Cada subgrupo foi composto de dois ratos para biopsia nos 7º e 14º dias.

Os Grupos Controle e Simulado, quando comparados pelo método de azul de toluidina não foi detectada a presença de mastócitos. Os resultados foram obtidos com a leitura das lâminas, no microscópio óptico de marca Olympus BH-2, com uma lente de aumento de 400 vezes.

Para a leitura morfométrica foram observados cinco campos em cada lâmina. O avaliador não tinha conhecimento a qual Grupo pertencia as lâminas. Foram contados cinco campos selecionados nas regiões profundas da derme e da camada muscular, para verificar a maior concentração de mastócitos.

Os mesmos Grupos apresentaram resultados equitativos, quando comparados ao do controle e ao do simulado, pelos métodos de hematoxilina e eosina, para a respectiva análise morfológica da reação inflamatória e evidência de fibroblastos e vasos neoformados.

Os resultados foram, também, equitativos para a imunohistoquímica, que evidencia o colágeno tipos I e III, comparados com os Grupos Controle e Simulado.

Considerando-se os resultados apresentados optou-se pelo Grupo Controle e Estimulado para o experimento.

APÊNDICE 2.

ANÁLISE DESTRITIVA DE RESULTADOS ESTATÍSTICOS

Não houve diferença estatística significativa nos 7° e 14° na quantificação de Linfócitos, Eosinófilos, Neutrófilos e Mastócitos, quando comparados ao Grupo Controle (TABELA 2).

TABELA 2. Análise quantitativa do colágeno tipos I e III, área total e densidade.

Grupo	7 dias			14 dias		
	Média	DP	N	Média	DP	N
Linfócitos						
Controle	84,12	55,41	9	94,99	66,16	9
Estimulado	99,14	41,72	8	80,34	29,75	10
	$t^{(2)} = 0,63$ ($p = 0,5416$)			$t^{(3)} = -0,63$ ($p = 0,5345$)		
Eosinófilos						
Controle	7,44	15,47	9	13,16	33,88	9
Estimulado	5,79	3,30	8	3,09	5,54	10
	$t^{(2)} = -0,29$ ($p = 0,7729$)			$t^{(3)} = -0,93$ ($p = 0,5345$)		
Neutrófilos						
Controle	66,95	129,90	9	45,78	116,37	9
Estimulado	35,41	16,62	8	8,24	10,91	10
	$t^{(2)} = -0,68$ ($p = 0,5072$)			$t^{(3)} = 1,02$ ($p = 0,3228$)		
Mastócitos						
Controle	5,56	2,70	10	3,56	1,15	10
Estimulado	6,94	2,00	10	4,32	1,50	10
	$t^{(2)} = 3,43$ ($p = 0,2107$)			$t^{(3)} = -1,61$ ($p = 0,2192$)		

As FIGURAS 16 a 22 apresentam *box-plot* dos grupos controle e estimulado no 7º e 14º dias, que não revelaram significância estatística.

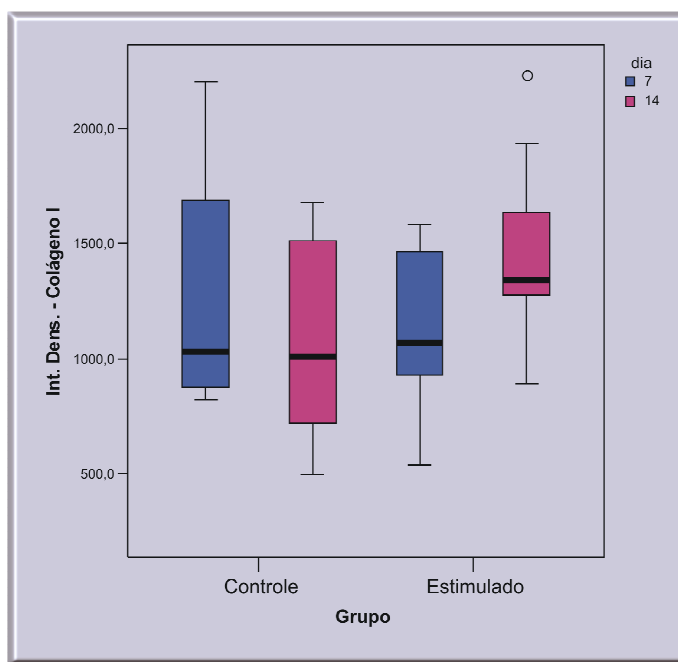


FIGURA 16. Gráfico *Box-plot* da densidade das fibras de colágeno, dos Grupos Controle e Estimulado.

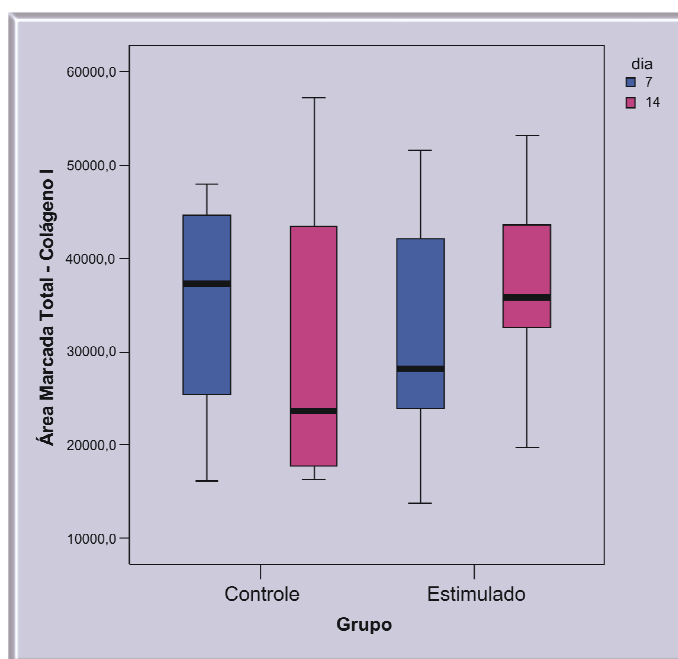


FIGURA 17. Gráfico *Box-plot* da área total das fibras de colágeno, dos Grupos Controle e Estimulado.

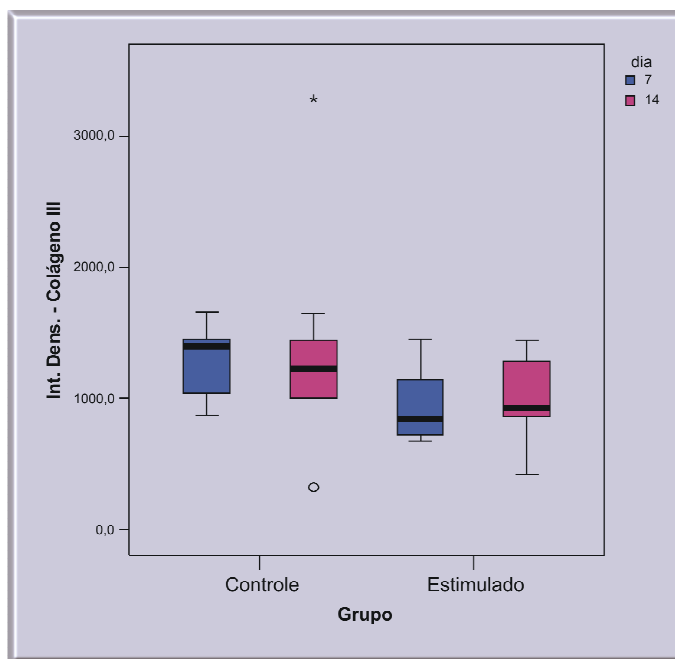


FIGURA 18. Gráfico *Box-plot* da densidade das fibras de colágeno tipo III dos Grupos Controle e Estimulado.

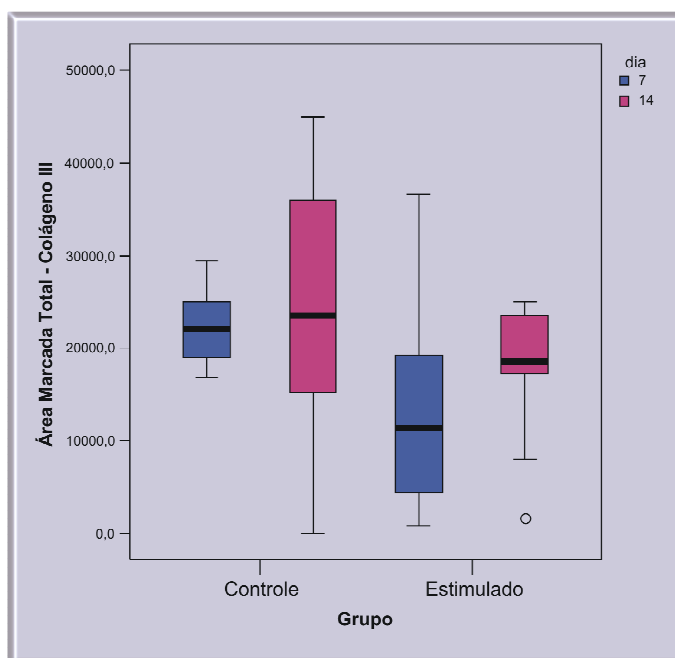


FIGURA 19. Gráfico *Box-plot* da área total das fibras de colágeno tipo III dos Grupos Controle e Estimulado.

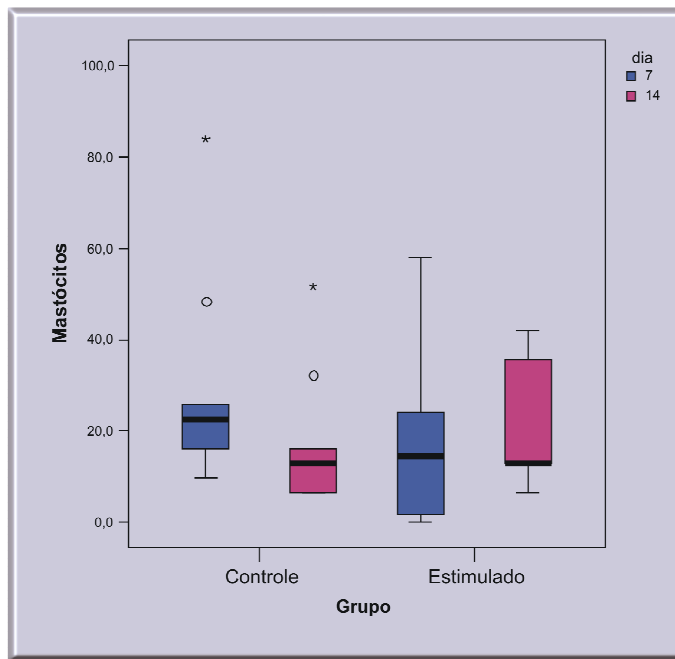


FIGURA 20. Gráfico *Box-plot* explicativo dos mastócitos dos Grupos Controle e Estimulado.

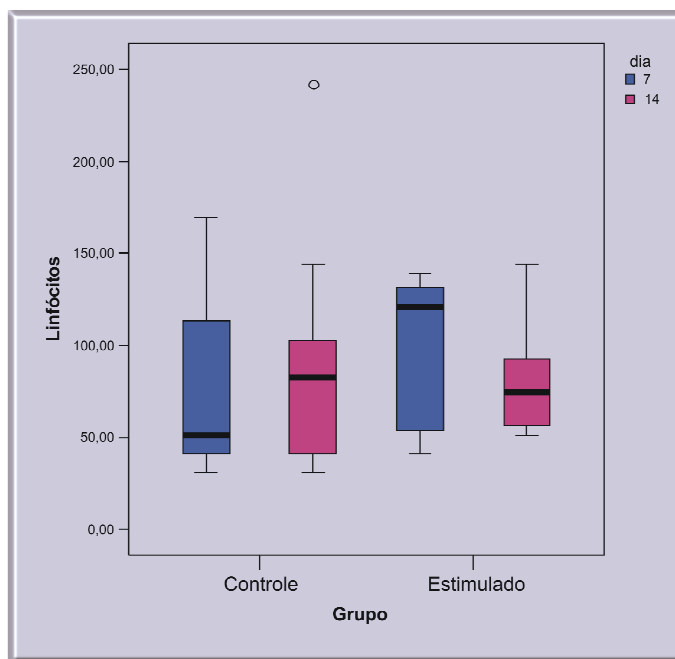


FIGURA 21. Gráfico *Box-plot* explicativo entre os Grupos Controle e Estimulado dos linfócitos.

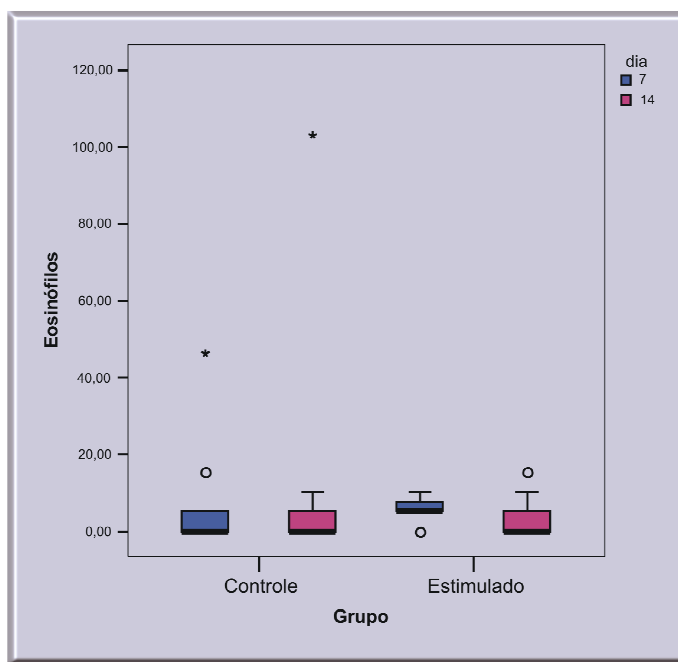


FIGURA 22. Gráfico *Box-plot* dos Eosinófilos não apresentou resultado com significância estatística, entre os Grupos Controle e Estimulado.

A FIGURA 23 apresenta a normalidade da amostra dos Neutrófilos entre os Grupos Controle e Estimulado. Como para Neutrófilos o teste de Kolmogorov-Smirno apontou uma leve fuga da normalidade ($p=0,046$), realizou-se também o teste de (Mann-Whitney). Não foi observado diferença entre os grupos no 7º dia ($p=0,3704$) e no 14º dia ($p=0,8421$) para a variável Neutrófilos, embora não tenha apresentado diferença estatística significativa.

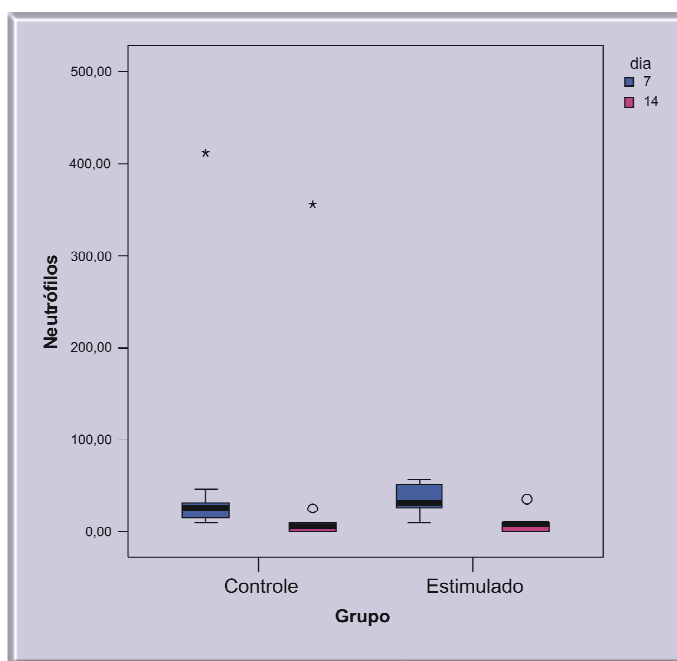


FIGURA 23. Gráfico *Box-plot* do Grupo Controle e Estimulado no 7º e 14º dia, para a variável Neutrófilo.

ANEXOS

ANEXO I.
FOLHA DE APROVAÇÃO DO
PROTOCOLO CEP 0317/06



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 7 de abril de 2006.
CEP 0317/06

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) GRAZIELA MARIA CHACON BORBA
Co-Investigadores: Lydia Masako Ferreira (orientadora), Bernardo Hochman, Richard Eloin Liebano
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Efeitos da estimulação elétrica pré e per-incisional em cicatrização em pele de ratos".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: experimental - categoria D.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar o efeito da corrente elétrica pré e per-incisional nos fibroblastos e fibras colágenas.

RESUMO: Serão utilizados 60 ratos Wistar-EPM. Anestésico e analgésico: tiletamina e cloridrato de zolazepan. Eutanásia: hiperdosagem de anestésico. Os animais serão distribuídos em 4 grupos de 15 ratos, sendo: grupo 1 - controle- será realizada uma incisão no dorso do rato. Grupo 2- controle 2- eletrodos dispostos no dorso do rato, durante 30 minutos sem aplicação da corrente, e a seguir será realizada uma incisão no dorso do rato. Grupo 3- eletrodos dispostos no dorso do rato, com estimulação elétrica pré-incisional durante 30 minutos e a seguir realizada incisão no dorso do rato, mantendo a corrente ligada. Grupo 4- eletrodos dispostos no dorso do rato, com estimulação elétrica pré-incisional durante 30 minutos, a seguir realizada incisão , mantendo-se por mais 30 minutos a corrente ligada após a incisão. Cada grupo será distribuído em 2 subgrupos para análise das amostras no 7 e 14 dia do pós-operatório. A eletro estimulação será realizada aplicando-se uma corrente elétrica com frequência de 128 Hz e intensidade de 35 mA durante 30 minutos. A incisão será realizada longitudinalmente na linha mediana dorsal, entre os eletrodos. Nos 7 e 14 dias pós-operatório, serão retiradas amostras das cicatrizes por meio de punch circular de 3 mm de diâmetro, a partir do ponto médio das mesmas e de forma concêntrica ao trajeto cicatricial. Será realizado estudo histopatológico das amostras, contagem de fibroblastos e quantificação de fibras colágenas por microscopia de polarização..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo experimental, analisando cicatrização de pele de ratos, com estimulação elétrica.

MATERIAL E MÉTODO: Descreve os métodos utilizados, envolvendo equipe com experiência no modelo utilizado.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento externo.

CRONOGRAMA: 6 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 02/04/2007 e 27/03/2008.

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

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

Atenciosamente,

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

ANEXO II.
LAUDO DE ENSAIO E AFERIÇÃO Nº 091/08



Rua do Rosário, 1776 • CEP 13400-186
 Piracicaba • São Paulo • Brasil
 Tel +55 (19) 2105-2800
 Razão Social: André Luís de Toledo Mendes
 CNPJ: 71.769.679/0001-59
 email: quark@quarkmedical.com.br
 site: http://www.quarkmedical.com.br

LAUDO DE ENSAIO E AFERIÇÃO Nº 091/08

Equipamento: NEMESYS 941	NÚMERO DE SÉRIE 453
--------------------------	------------------------

Solicitante: GRAZIELA CHACON BORBA		
Endereço: R: SERRA DO ITAQUERI 470	Cidade: SÃO PAULO	Estado: SP
Fone: 11-6956-6870	E-mail:	

INSTRUMENTOS UTILIZADOS			
Descrição	Nº de Série	Nº do Certificado	Validade
BIOTEK 601-Pro	0105	78078-101	26/03/09
OSCIOSCÓPIO DIGITAL	0112	78173-101/78172-101	27/03/09
MULTÍMETRO DIGITAL	0124	78083-101	22/03/09

Venho através deste, atestar que o equipamento acima descrito foi devidamente ensaiado e aferido, estando assim apto a produzir as funções a que se destina.

Data: 19/02/08

Responsável Técnico
 André Luís Toledo Mendes

ANEXO III.
MÉTODOS DESCRIPTIVOS DE
HEMATOXILINA E EOSINA, E AZUL DE TOLUIDINA

1. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS: HEMATOXILINA E EOSINA, E AZUL DE TOLUIDINA

Os cortes histológicos foram realizados com a espessura de 5 μ m, sendo realizadas lâminas para coloração pelos métodos da hematoxilina e eosina e azul de toluidina.

Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico a 70% e 90%, por uma hora em cada solução. Passaram por seis banhos de uma hora cada na solução de álcool a 100%.

Após os banhos em álcool a 100%, as amostras de pele foram imersas em solução de álcool/xilol 1:1 por uma hora, e passaram por mais dois banhos de xilol puro.

As amostras de pele foram retiradas do xilol e imediatamente colocadas em parafina líquida (60°C). Após o banho de parafina, as amostras foram levadas a uma estufa a vácuo, na qual permaneceram por um período de duas horas. Posteriormente, os blocos foram confeccionados para obtenção das lâminas histológicas.

As amostras de pele, contidas nos blocos de parafina, foram cortadas longitudinalmente e semisseriadas com 5 μ m, por intermédio de um micrótomo rotativo. Após a preparação das lâminas, foram respectivamente desparafinadas e hidratadas para receberem a coloração de azul de toluidina para a identificação dos mastócitos e para a coloração de hematoxilina e eosina para análise morfológica da reação inflamatória.

HEMATOXILINA E EOSINA

Procedeu-se o exame microscópico das lâminas coradas pela hematoxilina, e eosina para análise morfológica da reação inflamatória. O método aplicado para a leitura das lâminas foi uma gráticula quadriculada, constituída de 100 quadrículos, medindo 0,25mm de cada lado, que foi acoplada ao microscópio óptico. Foram contabilizadas somente as células que estavam no interior dos quadrículos e que não ficaram sobrepostos pelas respectivas linhas, e observados dez campos em cada lâmina. O avaliador desconhecia a origem das lâminas em relação aos Grupos. Foi seleccionada a marcação dos dez campos na região subdérmica na altura da camada muscular. Foi realizada a média de quantidades desses campos para obtenção dos resultados finais (MARON, 1998).

AZUL DE TOLUIDINA

O método de coloração de azul de toluidina evidencia os mastócitos pela detecção dos grânulos metacromáticos. Segundo STEDMAN (2003), a metacromasia refere-se à condição em que uma célula ou um componente tecidual adquire uma cor diferente ao do corante aplicado. Dez campos foram seleccionados na região subdérmica da camada muscular, de acordo com a maior concentração de mastócitos.

Foi realizada a média desses campos para obtenção dos resultados finais, entre o Grupo Estimulado comparado com o Grupo Controle MARON (1998).

IMUNO-HISTOQUÍMICA

As reações imuno-histoquímicas para pesquisa de colágeno dos tipos I e III foram realizadas com anticorpos de coelho anti-humano. O anticorpo é empregado tanto em humanos como em animais. A região observada e padronizada, de acordo com os cortes das lâminas, localizava-se abaixo da derme e da camada muscular, conforme a maior concentração encontrada de colágeno tipos I e III.

Com o uso dos anticorpos primários de coelho anti-humano para colágeno tipos I e III (Novotec) (1:1000), o tempo de incubação foi de 16 a 18 horas. Passado este tempo, os cortes foram novamente incubados com o anticorpo secundário biotilado do *Kit LSB (Dako Cytomation™)*, por 30 minutos e, a seguir, com o amplificador do mesmo *Kit LSB* por outros 30 minutos. A reação foi revelada com cromógeno diaminobenzidina (*Sigma™*) e peróxido de hidrogênio a 0,3%. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de *Harris*, desidratada em concentrações crescentes de etanol e imersas em três banhos de xilol. O preparo foi realizado com resina *Entellan™* (Merck).

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Low J, & Reed A. Electrotherapy Explained: Principles and Practice. 3 ed. São Paulo: Manole; 2001. 1-17p.

Maron J. Técnica histológica em Anatomia Patológica. 3 ed. São Paulo: Michelany; 1998. 42-53p.

Stedman S. Medical Dictionary. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.977p.