

ALINE FERNANDA PEREZ MACHADO

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA
DE ALTA E BAIXA FREQUÊNCIAS NOS VASOS
SANGUÍNEOS E NOS MIOFIBROBLASTOS DE FERIDA
EXCISIONAL AGUDA EM PELE DE RATOS.**

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

SÃO PAULO

2013

ALINE FERNANDA PEREZ MACHADO

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA
DE ALTA E BAIXA FREQUÊNCIAS NOS VASOS
SANGUÍNEOS E NOS MIOFIBROBLASTOS DE FERIDA
EXCISIONAL AGUDA EM PELE DE RATOS.**

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

ORIENTADOR: Prof. BERNARDO HOCHMAN

COORIENTADORES: Prof. RICHARD ELOIN LIEBANO

Prof^a. FABIANNE M. G. P. FURTADO

SÃO PAULO

2013

Machado, Aline Fernanda Perez.

Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea de alta e baixa frequências nos vasos sanguíneos e nos miofibroblastos de ferida excisional aguda em pele de ratos. / Aline Fernanda Perez Machado. – São Paulo, 2013.

xxi, 87f.

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

Título em inglês: High- and low-frequency of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation on the blood vessels and myofibroblasts of acute excisional wounds in rats' skin.

1. Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea. 2. Cicatrização de Feridas. 3. Vasos Sanguíneos. 4. Miofibroblastos. 5. Ratos. 6. Pele. 7. Fisioterapia.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

À **DEUS**, por ter me dado a oportunidade de estar neste conceituado Programa de Pós-graduação, por ter me encorajado à seguir em frente e por ter me dado sabedoria para elaborar este trabalho, o qual julgo ser uma das coisas mais importantes que realizei em toda a minha vida;

Ao amigo, **RICHARD ELOIN LIEBANO**, meu professor desde o 3º semestre da graduação em Fisioterapia e nos cursos de Pós-graduação *Lato e Stricto Sensu*, por ser um grande mestre o qual eu sempre admirei pela sabedoria e humildade, que hoje se tornou um amigo fiel que me compreende, me incentiva e acredita no meu potencial, além de desempenhar papel fundamental no meu desenvolvimento profissional e pessoal, sendo uma das pessoas que mais admiro no mundo. E talvez, todas essas palavras descritas anteriormente sejam insuficientes para descrever a profunda admiração e gratidão que tenho por ele;

Ao meu amado namorado, **FÁBIO LUIS NONATO**, pela paciência, pelo carinho e pela disposição em me ajudar e estar comigo em todos os momentos da minha vida, por compartilhar comigo momentos de alegria, de tristeza e de superação, na busca por este objetivo; e principalmente, por compreender e apoiar minhas escolhas e decisões;

Ao meu pai, **EDGARD MAILARO MACHADO**, à minha mãe, **SONIA MARIA PEREZ MACHADO**, e ao meu irmão, **EDGARD MAILARO MACHADO JÚNIOR**, por me darem apoio, por rezarem por mim e, principalmente, por proporcionarem meios para que eu pudesse evoluir profissionalmente;

Aos meus avós, **EDUARDO PEREZ e BRIGIDA DESTEFENI PEREZ**, que apesar do pouco estudo que tiveram, me ensinam muito em como ser uma pessoa humilde e batalhadora vivendo com muito amor sempre;

Aos meus padrinhos, **DINO HUMPHREYS CAPUTO e MARIA INÁCIA PEREZ CAPUTO**, por rezarem por mim e por sempre se orgulharem das minhas conquistas;

Aos meus avós, **EDGARD PIRES MACHADO** (*in memorian*) e **ANNA MAILARO MACHADO** (*in memorian*), que de onde estiverem, sei que sempre cuidam da minha família;

Aos meus sogros, **NOERY FÁBIO AURÉLIO NONATO e ENEIDA IZILDA SANCHEZ NONATO**, por torcerem e me ajudarem nas conquistas pessoais e profissionais;

À minha avó, **YOLANDA CASTIGLIONE SANCHEZ**, por rezar e torcer por mim;

Ao meu irmão de coração, **ROGÉRIO EDUARDO TACANI**, por ser o meu principal incentivador na área acadêmica, por ter conquistado minha admiração com seu jeito cuidadoso, dedicado e especial, por me ensinar como ser um docente capacitado priorizando a excelência no ensino, e por ter me dado a oportunidade de aprender e contribuir com seus projetos profissionais;

Ao amigo querido, **THIAGO SAIKALI FARCIC**, por estar sempre comigo, me incentivando, me instigando a ser sempre melhor e acompanhando de perto todas as etapas da minha vida;

Ao amigo, **CRISTIANO SCHIAVINATO BALDAN**, por ser uma pessoa admirável e um exemplo a ser seguido por sua trajetória pessoal e profissional, por ter me incentivado de uma maneira muito especial e acreditado que esta conquista seria possível;

Às amigas fisioterapeutas, **JULIANE GOMES DE ALMEIDA LUCARELI, KELLY CRISTINA SANCHES, MARLISE RIBEIRO DE CARVALHO e PASCALE MUTTI TACANI**, por serem amigas que me ensinam muito, por serem exemplos de profissionais, por me darem a oportunidade de trilhar este caminho e por acreditarem no meu trabalho;

Às amigas de infância, **BARBARA JORGE PEREZ e LARA VANIN**, por torcerem por mim e admirarem os passos percorridos desde quando deixamos de ser adolescentes e nos tornamos adultas escolhendo os nossos caminhos como profissionais;

Aos amigos de faculdade, **DANIELLE SALERNO MELHADO, JULIANA DEL DEBBIO, MARIANA VERAS GRIECO DE CARVALHO, RENAN LOPES MARUFFA e RENATA RICARDINO JARILLO**, pelos momentos vivenciados na época da graduação, os quais foram importantes para o meu desenvolvimento profissional, e por estarem presentes na minha vida proporcionando momentos de descontração.

AGRADECIMENTOS

Ao **PROF. BERNARDO HOCHMAN**, CIRURGIÃO PLÁSTICO, ORIENTADOR E PROFESSOR AFILIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), por ter acreditado no meu potencial, pelo companheirismo e pela intensa dedicação; mas, principalmente, por ter me recebido de volta, por ter confiado em mim, por todos os ensinamentos, por me instigar a raciocinar como um pesquisador em nível de excelência que é, e principalmente, pelas correções e sugestões que engrandeceram a cientificidade deste trabalho;

Ao **PROF. RICHARD ELOIN LIEBANO**, FISIOTERAPEUTA, COORIENTADOR E PROFESSOR COLABORADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, por existir em minha vida, por ter me dado a oportunidade de estar perto dele e aprender muito sobre como pesquisar, como ser profissional e, principalmente, como ser uma pessoa humilde, apesar do nível de conhecimento adquirido; agradeço imensamente as correções e sugestões feitas para aprimorar este trabalho;

À PROF^a. FABIANNE MAGALHÃES GIRARDIN PIMENTEL FURTADO, FISIOTERAPEUTA, COORIENTADORA E PROFESSORA COLABORADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pelas criteriosas correções e sugestões feitas para engrandecer a cientificidade deste trabalho sempre com muito comprometimento, carisma, dedicação e atenção;

Ao **PROF. Dr. MIGUEL SABINO NETO**, CIRURGIÃO PLÁSTICO, COORDENADOR DO PROGRAMA DE CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, LIVRE DOCENTE E PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, por coordenar este Programa com tanto empenho, por transmitir aos alunos a sua incrível capacidade de estimular a ciência nos mais altos níveis;

À PROF^a. Dr^a. LYDIA MASAKO FERREIRA, CIRURGIÃ PLÁSTICA, PROFESSORA TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA UNIFESP E COORDENADORA DA MEDICINA III CAPES, por ter colocado o Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica (atualmente Cirurgia Translacional) da UNIFESP no nível de excelência em que se encontra atualmente no cenário Nacional e Internacional;

Aos **PROFs. NEIL FERREIRA NOVO e YARA JULIANO**, BIOESTATÍSTICOS, PROFESSORES COLABORADORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, por ensinar análise estatística aos

alunos deste Programa e por ter me auxiliado a compreender os resultados obtidos por meio desta;

Aos **DEMAIS DOCENTES DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP**, pelos questionamentos que engrandeceram este trabalho;

Ao **MARCO AURÉLIO INVALIDI NEVES**, FISIOTERAPEUTA, MESTRE PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pela sua disposição em auxiliar no procedimento experimental, por ter dissipado o seu conhecimento científico com tanto cuidado e competência, por ter acompanhado todo este processo sempre com muita paciência, carinho e sabedoria, e assim, tornou-se um anjo em minha vida que estará em meu coração para sempre;

Ao **PAULO ROGÉRIO QUIEREGATTO DO ESPÍRITO SANTO**, CIRURGIÃO PLÁSTICO, MESTRE PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, À **ÉRIKA PATRÍCIA RAMPAZO DA SILVA** e **ROBERTA FOLHA**, FISIOTERAPEUTAS, ALUNAS DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pelo companheirismo e amizade proporcionada pela vivência durante este período, que será para sempre, e pelas sugestões feitas para aprimorar este trabalho;

Aos **DEMAIS COLEGAS PÓS-GRADUANDOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP**, pelas sugestões e companheirismo nessa jornada;

Ao **FÁBIO LEITE SILVA**, FISIOTERAPEUTA, ALUNO DO CURSO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESQUISA EM CIRURGIA PLÁSTICA, pelo companheirismo, dedicação e disposição desde quando nos conhecemos e no decorrer deste trabalho, por compartilhar comigo momentos de alegria, de tristeza e de superação, na busca por este objetivo;

À **MARTA DOS REIS, SANDRA DA SILVA e SILVANA DE ASSIS**, SECRETÁRIAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, por facilitar este processo;

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

Ao **ANDERSON DA SILVA**, TÉCNICO DO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA ELÉTRICA DA UNIVERSIDADE PAULISTA, por ter feito a calibração do equipamento de *TENS* usado neste estudo;

À **TEREZA CRISTINA DA SILVA**, BIÓLOGA, DOUTORA EM CIÊNCIAS PELA USP, pelo cuidado e ensinamentos sobre as análises microscópicas realizadas;

À **CRISTIANE DIAS**, TRADUTORA, INTÉRPRETE E REVISORA DE TEXTOS, pelas correções ortográficas feitas nesta Dissertação.

*“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o
lugar mais maravilhoso do mundo...
Mas é necessário ter pessoas para transformar o
seu sonho em realidade”*

Walt Disney

1982

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvii
RESUMO	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	6
3. LITERATURA	8
4. MÉTODOS	15
5. RESULTADOS.....	32
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS	51
NORMAS ADOTADAS	61
ABSTRACT	63
APÊNDICES.....	65
ANEXOS	83
FONTES CONSULTADAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos grupos em relação aos procedimentos.	18
Figura 2. Região dorsal do rato com área de 30cm ² epilada.....	21
Figura 3. Demarcação da região para realização da ferida excisional.....	22
Figura 4. Realização da ferida excisional.	22
Figura 5. Ferida excisional de 8 mm na região dorsal do rato.....	23
Figura 6. Equipamento de <i>TENS</i> utilizado.....	24
Figura 7. Eletrodos de silicone-carbono usados para a aplicação da <i>TENS</i>	26
Figura 8. Padronização para o posicionamento dos eletrodos.....	27
Figura 9. Padronização para aplicação da <i>TENS</i>	27
Figura 10. Padronização da amostra de pele para análise microscópica....	29
Figura 11. Fotomicrografias dos vasos sanguíneos positivos dos GA, GB e GS, aos 3 dias de PO.	76
Figura 12. Fotomicrografias dos vasos sanguíneos positivos dos GA, GB e GS, aos 7 dias de PO.	77
Figura 13. Fotomicrografias dos vasos sanguíneos positivos dos GA, GB e GS, aos 14 dias de PO.	78
Figura 14. Fotomicrografias dos miofibroblastos dos GA, GB e GS, aos 3 dias de PO.	80

Figura 15. Fotomicrografias dos miofibroblastos dos GA, GB e GS, aos 7 dias de PO.	81
Figura 16. Fotomicrografias dos miofibroblastos dos GA, GB e GS, aos 14 dias de PO.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a	área.
CEDEME	Biotério Central do Centro de Desenvolvimento.
<i>CGRP</i>	<i>Calcitonin Gene-related Peptide</i>
cm	centímetro(s).
cm ²	centímetro(s) ao quadrado.
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
CO ₂	gás carbônico.
d	densidade da corrente.
EE	estimulação elétrica.
<i>EGF</i>	<i>Epidermal Growth Factor.</i>
EP	erro-padrão.
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (e outros).
f	frequência.
<i>FREMS</i>	<i>Electrical Transcutaneous Stimulation with Modulated Frequencies.</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast Growth Factor.</i>
g	gramas.
g/mL	gramas por mililitros.
GA	Grupo <i>TENS</i> Alta frequência.

GB	Grupo <i>TENS</i> Baixa frequência.
GS	Grupo Simulado.
Hz	Hertz.
I	amplitude da corrente.
kg	quilograma.
k Ω	quilo-ohm.
<i>LASER</i>	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation.</i>
LTDA	Limitada.
mA	miliamperes.
mA/cm ²	miliamperes por centímetro ao quadrado.
min	minuto(s).
mg	miligrama(s).
mg/kg	miligrama(s) por quilograma de massa corporal.
ml	mililitro(s).
mm	milímetro(s).
mm ²	milímetro(s) ao quadrado.
mM	milimol(s).
ms	milisegundos.
n	amostra / casuística.
n ^o	número.
<i>PDGF</i>	<i>Platelet-derived Growth Factor.</i>

PO	Pós-operatório.
POI	Pós-operatório Imediato.
s	segundos.
<i>SP</i>	<i>Substance P.</i>
T	duração de pulso.
<i>TENS</i>	<i>Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation.</i>
<i>TGF-beta</i>	<i>Transforming Growth Factor beta.</i>
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo.
UNIP	Universidade Paulista.
UP	úlceras por pressão.
UVC	úlceras venosas crônicas.
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor.</i>
<i>VIP</i>	<i>Vasoactive Intestinal Peptide.</i>
*	diferença significativa.
=	igual.
±	mais ou menos.
®	marca registrada.
µm	micrômetro(s).
µs	microsegundos.
°	graus.

°C	graus Celsius.
≤	menor ou igual.
%	porcentagem.
x	vezes.
X	<i>versus</i> .

RESUMO

Introdução: Os efeitos da Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (*TENS*) no processo de cicatrização de feridas têm sido estudados para determinar os principais eventos responsáveis pelo reparo tecidual.

Objetivo: Avaliar o efeito da *TENS* de alta e de baixa frequências nos vasos sanguíneos e nos miofibroblastos de ferida excisional aguda em pele de ratos.

Métodos: Foram utilizados 90 ratos (Wistar-EPM1) machos e adultos. Realizou-se uma ferida excisional na região dorsal do animal utilizando um *punch* medindo 8 milímetros. Os animais foram aleatorizados em 3 grupos: Grupo Alta frequência (GA: 80 Hz), Grupo Baixa frequência (GB: 5 Hz) e Grupo Simulado (GS: *TENS* desligada); e submetidos à *TENS* por 3 dias consecutivos. A duração do pulso e intensidade da corrente foram 200 μ s e 15 mA, respectivamente; durante 60 minutos. Foram realizadas análises imunohistoquímicas para quantificação dos vasos sanguíneos e dos miofibroblastos, aos 3, 7 e 14 dias de PO.

Resultados: Aos 3 dias de PO, o GB apresentou maior quantidade de vasos sanguíneos em relação ao GA; aos 7 e 14 dias de PO, o GA demonstrou menor quantidade de vasos sanguíneos em relação ao GS. O GA apresentou menor quantidade de miofibroblastos comparado com o GB e o GS aos 3 dias de PO e comparado ao GS aos 7 dias de PO. **Conclusão:** A *TENS* de baixa frequência aumentou a quantidade de vasos sanguíneos aos 3 dias de PO e a de alta frequência inibiu os vasos sanguíneos e os miofibroblastos de ferida excisional aguda em pele de ratos.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation, TENS*) consiste na aplicação genérica de correntes elétricas pulsadas transmitidas por eletrodos através da superfície intacta da pele para estimular os nervos periféricos produzindo diversos efeitos fisiológicos (LIEBANO *et al.*, 2003; BUONOCORE & CAMUZZINI, 2007; CHEN *et al.*, 2007; JONES & JOHNSON, 2009; CHEN & JOHNSON, 2010). Trata-se de um recurso terapêutico não-farmacológico, não-invasivo, de baixo custo e de fácil manuseio, amplamente usado na prática clínica para promover analgesia (NOLAN, 1991; KHALIL & MERHI, 2000; LIEBANO *et al.*, 2003; WALSH *et al.*, 2006; BUONOCORE & CAMUZZINI, 2007; DeSANTANA *et al.*, 2008; JONES & JOHNSON, 2009; KELECHI & JHARNA, 2013).

As primeiras unidades de *TENS* foram desenvolvidas e tornaram-se populares após a publicação da teoria das comportas proposta por MELZACK & WALL, em 1965 (MELZACK & WALL, 1965). Desde então, a *TENS* tornou-se mundialmente conhecida e um dos recursos mais utilizados na prática clínica pelos fisioterapeutas para promover alívio de dor aguda (WALSH *et al.*, 2006) e crônica (KELECHI & JHARNA, 2013) até os dias de hoje.

Nas últimas décadas, alguns autores observaram que além do efeito analgésico, a *TENS* pode promover alteração da temperatura cutânea

(ABRAM *et al.*, 1980; SCUDDS *et al.*, 1995; FORST *et al.*, 1997; ALMALTY *et al.*, 2009), aumento do fluxo sanguíneo local (KAADA, OLSEN, EIENSEN, 1984; COSMO *et al.*, 2000; CRAMP *et al.*, 2000; CRAMP *et al.*, 2002; FORST *et al.*, 1997; ALMALTY *et al.*, 2009) e liberação de neuropeptídeos vasodilatadores, tais como: Substância P (*Substance P*, *SP*), Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (*Calcitonin Gene-related Peptide*, *CGRP*) (KHALIL, MERHI, LIVETT, 2001; KHALIL & MERHI, 2000) e Peptídeo Intestinal Vasoativo (*Vasoactive Intestinal Peptide*, *VIP*) (ATALAY & YILMAZ, 2009; SEBASTIAN *et al.*, 2011). Tais eventos podem estar relacionados aos efeitos da *TENS* no reparo tecidual, no que se refere à cicatrização de feridas (KARBA *et al.*, 1995; WIKSTRÖM *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2012) e à viabilidade de retalhos cutâneos (LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008).

Ainda existem divergências na literatura quanto à influência da frequência da *TENS* modulada em baixa (≤ 10 Hertz, Hz) e em alta frequência (≥ 50 Hz) para a obtenção de tais efeitos (ROBINSON & SNYDER-MACKLER, 2001), pois já foi evidenciado que a *TENS* de baixa (2–4 Hz) (KAADA, OLSEN, EIENSEN, 1984; KAADA & HELLE, 1984; SCUDDS *et al.*, 1995; WIKSTRÖM *et al.*, 1999) e de alta frequência (75–100 Hz) (ABRAM *et al.*, 1980; NOLAN *et al.*, 1993; WIKSTRÖM *et al.*, 1999), promoveram alterações da temperatura cutânea e do fluxo sanguíneo local por meio de estudos experimentais e clínicos. Até o presente momento, apenas WIKSTRÖM *et al.* (1999) compararam os efeitos das diferentes frequências da *TENS* na temperatura cutânea e no fluxo sanguíneo local, pelo qual verificou-se apenas aumento do fluxo

sanguíneo, sendo este mais expressivo com a utilização da *TENS* de baixa frequência (2 Hz).

O processo de cicatrização de feridas é complexo e se inicia imediatamente após a lesão, pela organizada interação entre vários tecidos e células (LI, CHEN, KIRSNER, 2007; KONDO, 2007). É didaticamente dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação (KONDO, 2007). Dentre as fases do processo de cicatrização, considera-se que na fase proliferativa ocorram os fenômenos mais importantes, a angiogênese que propicia meios para a formação do tecido de granulação e a contração da ferida iniciada pelos miofibroblastos, sejam os marcos para o completo fechamento da lesão (DIEGELMANN & EVANS, 2004; DESMOULIÈRE, CHAPONNER, GABBIANI, 2005; LI, CHEN, KIRSNER, 2007; KONDO, 2007).

As feridas podem ser classificadas em dois tipos dependendo do tempo de evolução: aguda e crônica. Imediatamente após uma lesão, a ferida é considerada aguda, como: lesões por queimaduras, lesões traumáticas e feridas em modelo cirúrgico. Porém, se os processos que ocorrerem no decorrer das próximas seis semanas não forem capazes de promover o fechamento da lesão, esta é classificada como crônica (VALACCHI *et al.*, 2012). Após uma lesão, espera-se que o resultado final do processo de cicatrização seja satisfatório com a formação do tecido cicatricial. Entretanto, o reparo tecidual de uma ferida aguda pode ser influenciado por alterações que podem estender o dano tecidual e prolongar o processo de cicatrização, tornando-a uma ferida crônica (LI, CHEN, KIRSNER, 2007).

Para evitar a formação de uma ferida crônica, julga-se importante a realização de estudos que envolvam os diversos tipos de abordagens

terapêuticas nas feridas agudas (BRÖLMANN *et al.*, 2012). O embasamento científico existente sobre a utilização da *TENS* no processo de cicatrização de feridas é mais evidente para feridas crônicas iniciadas ou agravadas por distúrbios ou doenças como cicatrização do coto após amputação de membros inferiores (FINSEN *et al.*, 1988), hanseníase (KAADA & EMRU, 1988), insuficiência arterial periférica (DEBRECENI *et al.*, 1995), em úlceras de pressão em pacientes com lesão medular (KARBA *et al.*, 1995; BAKER *et al.*, 1996), diabetes (BAKER *et al.*, 1997) e insuficiência venosa crônica (OGRIN, DARZINS, KHALIL, 2005; OGRIN, DARZINS, KHALIL, 2009). Quanto às feridas agudas, apenas KHALIL & MERHI (2000) verificaram que a *TENS* de baixa frequência (5 Hz) foi capaz de promover completa cicatrização das lesões por queimaduras em ratos idosos.

Todos os estudos relataram sucesso no processo de cicatrização destas feridas crônicas utilizando *TENS* de alta e baixa frequências separadamente; porém, até o momento, nenhum estudo comparou o efeito de ambas na cicatrização de feridas agudas. Assim, em função da falta de evidência científica sobre os efeitos das diferentes frequências da *TENS* nos mais importantes eventos da fase proliferativa, considera-se necessária a realização de estudos em modelo experimental para observar os principais fenômenos do processo de cicatrização de feridas agudas.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (*TENS*) de alta e baixa frequências nos vasos sanguíneos e nos miofibroblastos de ferida excisional aguda em pele de ratos.

LITERATURA

3. LITERATURA

FINSEN *et al.* (1988) avaliaram o efeito da Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation, TENS*) na cicatrização do coto e na dor fantasma após amputação maior do membro inferior. Cinquenta e um pacientes submetidos à amputações transfemorais e transtibiais por distúrbios isquêmicos foram distribuídos em três grupos: *TENS* simulada associada à clopromazina; *TENS* simulada apenas e *TENS* ativa com os seguintes parâmetros: frequência (f) de 100 Hertz (Hz), duração de pulso (T) de 90 microsegundos (μ s) com amplitude da corrente (I) ajustada até o paciente referir desconforto, por 30 minutos (min) sendo realizada 2 vezes por dia. Os pacientes foram acompanhados por até 2 anos. Observou-se que o grupo que recebeu a *TENS* ativa apresentou cicatrização mais rápida, menor taxa de reamputação e de dor fantasma após 4 meses.

KAADA & EMRU (1988) verificaram os efeitos da *TENS* na cicatrização de feridas por hanseníase em 19 pacientes que apresentavam lesões superficiais no terço distal de perna ou pé. Utilizou-se a *TENS* por 11 sessões com f: 2 Hz por 30 min. A taxa média de cicatrização foi de 1 centímetro (cm) por semana, demonstrando que a *TENS* modulada em

baixa frequência pode ser uma opção terapêutica no tratamento de feridas por hanseníase.

DEBRECENI *et al.* (1995) realizaram um ensaio clínico com o objetivo de demonstrar os efeitos da *TENS* no tratamento da doença arterial obstrutiva periférica. Foram tratadas 12 feridas por isquemia crônica em membros inferiores e 6 casos de gangrena avançada. Todos os pacientes mantiveram o uso de medicamentos e utilizou-se a *TENS*, com corrente bifásica, diariamente por 20 min, f: de 1 a 2 Hz e I: entre 15 e 30 miliampères (mA). Os resultados foram estimados seguindo os seguintes critérios: cicatrização da gangrena e da ferida, avaliação da distância percorrida sem dor, oximetria de pulso e pressão sanguínea. Observou-se que a *TENS* promoveu interrupção do processo de gangrena, auxiliou na cicatrização da ferida, sendo que na maior parte dos casos, promoveu completa cicatrização; houve aumento da distância percorrida pela diminuição da dor, aumento da saturação de oxigênio, e diminuição das pressões sanguíneas extremamente elevadas nos membros inferiores. Concluiu-se que a *TENS* é útil nos distúrbios relacionados à doença arterial obstrutiva periférica, como isquemia associada à ulceração e gangrena em membros inferiores, alivia a claudicação intermitente e dor ao repouso.

KARBA *et al.* (1995) avaliaram a eficácia da combinação do curativo oclusivo e *TENS*, e compararam-nas individualmente, no tratamento de úlceras por pressão (UP). Foram selecionados 12 pacientes

com lesão medular que desenvolveram UP, distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: controle (*TENS* simulada), *TENS* ativa e *TENS* ativa associada ao curativo oclusivo. Utilizou-se corrente assimétrica, balanceada bifásica durante 2 horas por dia até completa cicatrização por meio de eletrodos auto-adesivos, amplitude da corrente (I) suave com contração muscular visível da área e os demais parâmetros da *TENS* não foram descritos. A avaliação do processo de cicatrização foi determinada pelas mudanças de curativos e avaliação fotográfica, usando o parâmetro de taxa de relativa cicatrização, expressa em porcentagem (%). Observou-se que o grupo controle apresentou baixa taxa de cicatrização (0,66% por dia); já os grupos que receberam a *TENS* demonstraram resultados satisfatórios, sendo que no que recebeu apenas a *TENS* verificou-se uma melhor taxa de cicatrização (2,93% por dia), e o grupo que recebeu a *TENS* associada ao curativo oclusivo apresentou rápida cicatrização (7,13% por dia).

BAKER *et al.* (1996) avaliaram o efeito do tipo de corrente de estimulação elétrica e o posicionamento do eletrodo na cicatrização de UP. Foram selecionados 80 pacientes com lesão medular que apresentavam 185 UP. Cada UP foi submetida a 1 dos 4 protocolos de tratamento: corrente bifásica assimétrica, corrente bifásica simétrica, microcorrente ou corrente simulada, por 45 min diariamente. Os eletrodos foram posicionados ao redor da UP na pele intacta, assim como nos demais estudos. Os resultados foram determinados por meio de análise subjetiva da UP em: cicatrizada e não cicatrizada. Assim, observou-se que a corrente bifásica assimétrica demonstrou ser mais eficaz para promover aceleração da cicatrização da UP.

BAKER *et al.* (1997) tiveram por objetivo avaliar os efeitos de 2 correntes na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos. Foram selecionados 80 pacientes com 114 feridas por diabetes divididos em 3 grupos: corrente bifásica assimétrica (A – f: 50 Hz, T: 100 μ s, I: antes de observar contração muscular e t: 30 min), corrente bifásica quadrada simétrica (B – f: 50 Hz, T: 300 μ s, I: antes de observar contração muscular e t: 30 min) e nenhuma estimulação (C). Os grupos A e B receberam a estimulação elétrica por 30 min diariamente até completa cicatrização. A mensuração da taxa de cicatrização foi feita semanalmente por avaliação do contorno da ferida, tal dado era transferido para uma fórmula e obtida a porcentagem de fechamento da ferida. Concluiu-se que a estimulação elétrica por corrente bifásica assimétrica foi efetiva na melhora da cicatrização de feridas diabéticas.

KHALIL & MERHI (2000) avaliaram o efeito da *TENS* na cicatrização de feridas por queimadura em ratos idosos. Foi realizada uma lesão térmica circular com *LASER* de CO₂ medindo 10 milímetros (mm) de diâmetro na região dorsal do animal. Dois avaliadores acompanharam o processo de cicatrização por meio de um planímetro digital. Utilizou-se a *TENS* com f: 5 Hz, T: 2 milisegundos (ms) por 1 min através de eletrodos de silicone-carbono com gel acoplante, sendo estimulados 2 vezes por dia por 5 dias consecutivos. Aplicou-se a *TENS* ativa e simulada. As feridas

cicatrizaram em média com 14,7 e com 21,8 dias naqueles que receberam a *TENS* ativa e simulada, respectivamente.

OGRIN, DARZINS, KHALIL (2005) realizaram um estudo de caso com um idoso saudável com 82 anos de idade que apresentava uma úlcera venosa crônica (UVC) medindo 120 milímetros (mm) de diâmetro e profundidade que incluiu a epiderme e a derme, persistente por 18 meses no terço distal da perna direita, a qual vinha recebendo tratamento padrão (curativo oclusivo associado à compressão). O paciente foi submetido à 2 sessões de *TENS* por dia durante 5 min (f: 5 Hz, voltagem: 20 volts, T: 2 ms) associado ao tratamento padrão. Observou-se aumento da temperatura cutânea e do fluxo sanguíneo local comparado com o membro contralateral, usado como controle; melhora na função do nervo sensitivo e a cicatrização da ferida ocorreu em 4 semanas. Após este período, foi feito um *follow-up* de 1 ano, o qual a cicatrização manteve-se intacta.

OGRIN, DARZINS, KHALIL (2009) realizaram um ensaio clínico randomizado, controlado e duplo-cego para verificar os efeitos da *TENS* de baixa frequência na cicatrização de UVC em membros inferiores. Foram selecionados 39 idosos com UVC submetidos a tratamento padrão, e divididos randomicamente entre 2 grupos: *TENS* simulada (n= 15) e *TENS* ativa (n= 14) com f: 5 Hz, I: 4 mA por 5 min, 2 vezes por dia durante 12 semanas ou até completa cicatrização. A mensuração dos efeitos da *TENS* foi feita pela taxa de epitelização, fluxo sanguíneo microvascular e

oxigenação, além da atividade do nervo sensorial e resposta de ativação das fibras C. Observou-se melhora do fluxo sanguíneo em ambos os grupos. Houve aumento da taxa de cicatrização e melhora da função das fibras C no grupo *TENS* ativa.

KUTLU *et al.* (2013) compararam os efeitos da *TENS*, solução salina à 0,9%, iodo-povidine (solução à 10%) e óleo de lavanda (*Lavandula angustifolia* – densidade de 0,882 g/mL) na cicatrização de feridas em modelo animal por meio da expressão dos seguintes fatores de crescimento: Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor, EGF*), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (*Platelet-derived Growth Factor, PDGF*) e Fator de Crescimento de Fibroblasto (*Fibroblast Growth Factor, FGF*). Foram utilizados 48 ratos divididos em 6 grupos: animais sem ferida, animais com ferida, aplicação de *TENS* (f: 2 Hz, t: 15 min) na ferida, solução salina aplicada na ferida, iodo-povidine aplicado na ferida e óleo de lavanda aplicado na ferida; por 5 dias consecutivos. A ferida foi de 1 cm de diâmetro e profundidade que incluiu epiderme, derme e panículo carnosos até a *fascia superficialis*. Observou-se que os grupos que receberam a *TENS* e o óleo de lavanda apresentaram fechamento da ferida mais rápido do que os demais (solução salina e iodo-povidine). A expressão e o nível de *EGF* e o nível de *PDGF* foram significativamente maiores no grupo que recebeu a *TENS*. Concluiu-se que a *TENS* estimulou a cicatrização de feridas por meio do aumento dos fatores de crescimento na pele quando comparado com os demais grupos que receberam a aplicação de agentes tópicos.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Desenho de pesquisa e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo é experimental, primário, intervencional, analítico, longitudinal, prospectivo, randomizado, controlado, comparativo e unicego.

O estudo teve início após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob número 1491/10 (Apêndice 1).

4.2 Amostra

A amostra foi composta por 90 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar–EPM 1, machos, adultos jovens, com média de idade de 45 dias, pesando entre 250 e 350 gramas (g), oriundos do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) –

UNIFESP e transferidos para o Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP.

Os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno de padrão individual forradas com serragem de pinho, com tampa própria de ferro contendo um recipiente com água e ração de origem industrial *ad libitum*.

Durante todo o experimento, o ambiente foi mantido por meio de iluminação artificial com lâmpada fluorescente, em ciclos de claro-escuro de 12 horas cada, considerando o período com luz ligada das 7 até às 19 horas, com temperatura ambiente constante em 22°C mantida por ar condicionado, em 45% ($\pm 15\%$) de umidade de ar e controle de ruídos, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) seguindo a legislação nacional para vivissecção animal em vigor (Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

Previamente ao início do experimento, os animais permaneceram em gaiolas individuais durante 15 dias para aclimatação.

4.3 Delineamento experimental

Após cálculo do tamanho da amostra (Apêndice 2), os animais foram distribuídos aleatoriamente pelo site www.randomization.com (Apêndice 3), em três grupos contendo 30 ratos. Após, cada grupo foi aleatorizado em três subgrupos com 10 ratos, totalizando 9 subgrupos. O

sigilo e alocação foram mantidos utilizando envelopes opacos e selados (Figura 1).

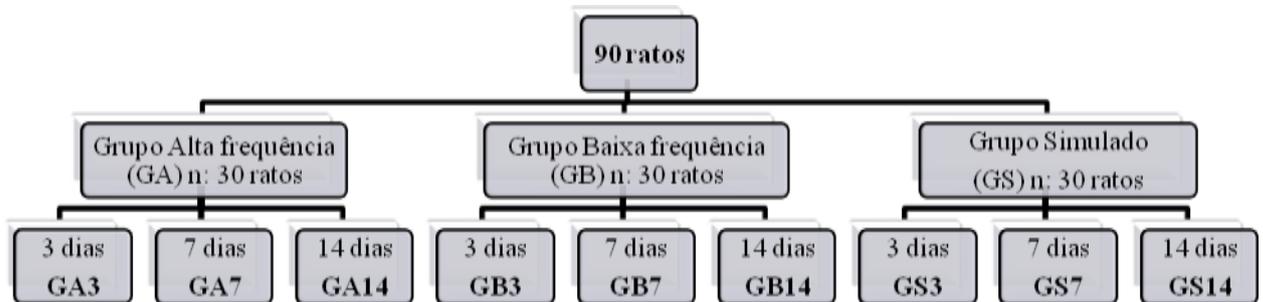


Figura 1. Distribuição dos grupos em relação aos procedimentos.

Os 90 ratos foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (GA – Grupo Alta frequência; GB – Grupo Baixa frequência; GS – Grupo Simulado) contendo 30 animais cada; após cada grupo foi distribuído aleatoriamente em 3 subgrupos, totalizando 9 subgrupos conforme os dias de pós-operatório (GA3 – Grupo Alta frequência aos 3 dias de pós-operatório; GA7 – Grupo Alta frequência aos 7 dias de pós-operatório; GA14 – Grupo Alta frequência aos 14 dias de pós-operatório; GB3 – Grupo Baixa frequência aos 3 dias de pós-operatório; GB7 – Grupo Baixa frequência aos 7 dias de pós-operatório; GB14 – Grupo Baixa frequência aos 14 dias de pós-operatório; GS3 – Grupo Simulado aos 3 dias de pós-operatório; GS7 – Grupo Simulado aos 7 dias de pós-operatório; GS14 – Grupo Simulado aos 14 dias de pós-operatório).

A seguir, estão descritos os procedimentos aos quais cada grupo foi submetido:

- **GRUPO *TENS* ALTA FREQUÊNCIA (GA)** – Os animais foram submetidos à aplicação da *TENS* ligada, com frequência (f) de 80 Hertz (Hz), duração de Pulso (T) de 200 microsegundos (μ s), amplitude (I) ajustada em 15 miliampères (mA) durante 60 minutos (min), por 3 dias consecutivos, no pós-operatório imediato (POI) e nos 2 dias subsequentes;
- **GRUPO *TENS* BAIXA FREQUÊNCIA (GB)** – Os animais foram submetidos à aplicação da *TENS* ligada, com f: 5 Hz,

T: 200 μ s, I: 15 mA durante 60 min, por 3 dias consecutivos, no POI e nos 2 dias subsequentes;

- **GRUPO SIMULADO (GS)** – Os animais foram submetidos ao procedimento operatório e, após realização da ferida excisional, os eletrodos foram posicionados e fixados na pele com o equipamento desligado permanecendo por 60 min, por 3 dias consecutivos, no POI e nos 2 dias subsequentes.

Os 3 subgrupos de cada um dos grupos foram determinados conforme os dias de análise: 3, 7 e 14 dias do pós-operatório (PO), sendo utilizados 10 animais em cada subgrupo.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados, inicialmente, com 0,2 mililitros (ml) de cloridrato de ketamina (Ketamina Agener[®]), associado a 0,1 ml de cloridrato de xilazina (Calmium[®]), por via intramuscular no músculo gastrocnêmio direito.

Para aplicação do anestésico, o animal foi retirado da gaiola e contido manualmente pela região dorsal. A aplicação intramuscular foi

feita utilizando seringa de 1 ml e agulha hipodérmica de 45 por 13 milímetros (mm).

4.4.2 Procedimento operatório

Em plano anestésico, cada animal teve sua massa corpórea aferida utilizando uma balança analógica (Framily[®]). Após, foi posicionado em decúbito ventral sobre uma prancha cirúrgica, previamente esterilizada com álcool a 70%, com as patas dianteiras e traseiras estendidas com o auxílio de tiras de fita adesiva medindo 1 centímetro (cm) por 5 cm.

Foi realizada epilação por tração manual dos pêlos da região dorsal em área de 6 cm de comprimento (crânio-caudal) por 5 cm de largura (látero-lateral), centralizada na linha dorsal mediana, totalizando uma área de 30 centímetros ao quadrado (cm²), em sentido caudal a partir de uma linha horizontal traçada na margem inferior das orelhas (Figura 2).

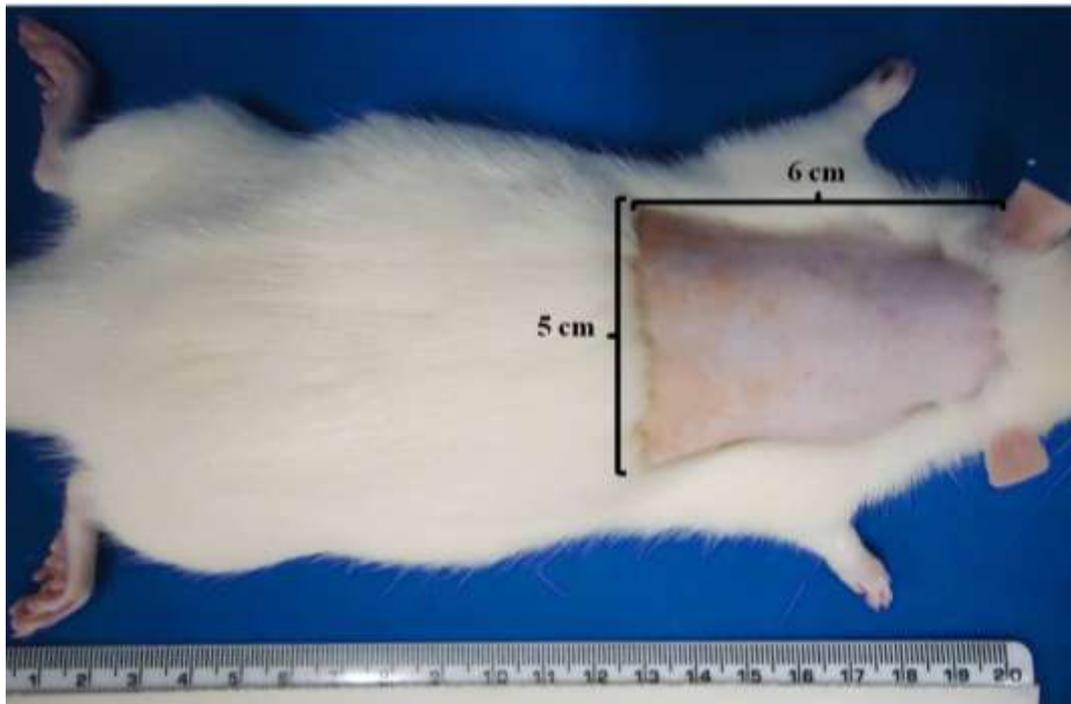


Figura 2. Região dorsal do rato com área de 30 cm² epilada.

Região dorsal epilada em área de 6 cm de comprimento por 5 cm de largura, totalizando uma área de 30 centímetros ao quadrado (cm²), em sentido caudal a partir de uma linha horizontal traçada na margem inferior das orelhas.

Para realização da ferida foi utilizado um *punch* estéril de 8 mm de diâmetro, com lâmina circular cortante na sua extremidade inferior a qual foi posicionada perpendicularmente, pressionada e movida no sentido horário, a 360°, sobre a pele dispondo a margem superior do *punch* a 1 cm da linha transversa entre os ângulos inferiores das escápulas (Figuras 3 e 4), sobre a linha sagital, resultando em uma ferida excisional de 8 mm de diâmetro e profundidade que incluiu epiderme, derme e panículo carnoso até a *fascia superficialis* (Figura 5). Foi utilizado um bisturi caso houvesse necessidade de remover qualquer fragmento de pele remanescente no local, e posteriormente descartado.

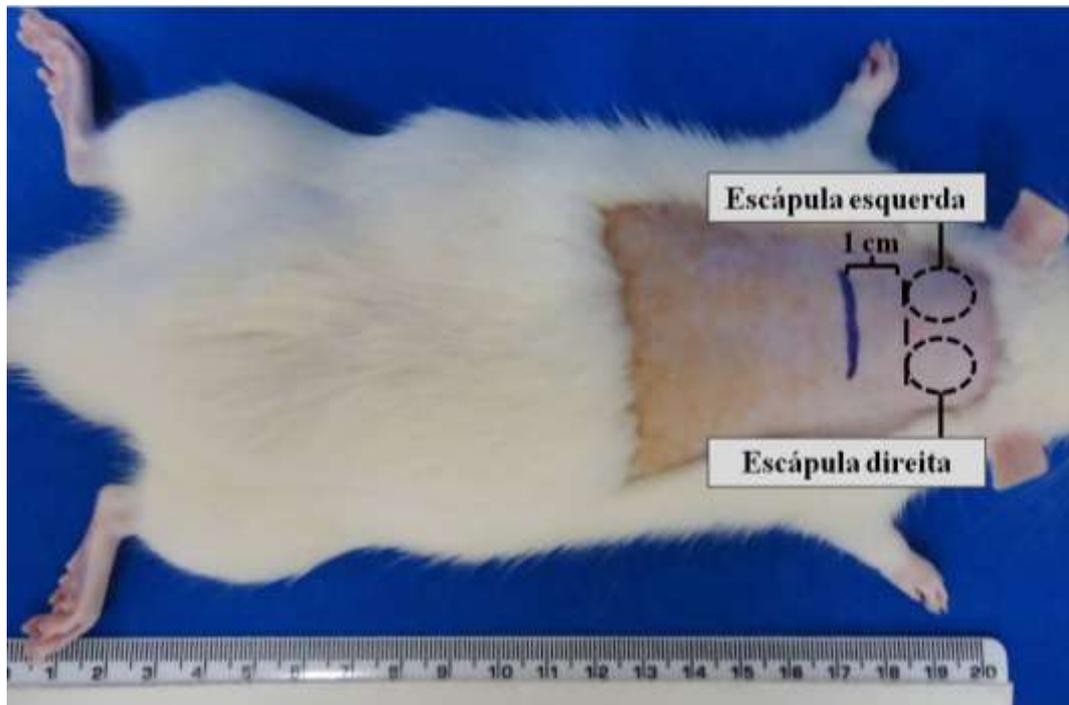


Figura 3. Demarcação da região para realização da ferida excisional. Demonstração da demarcação da área à 1 cm da linha transversa entre os ângulos inferiores das escápulas direita e esquerda para realização da ferida excisional.

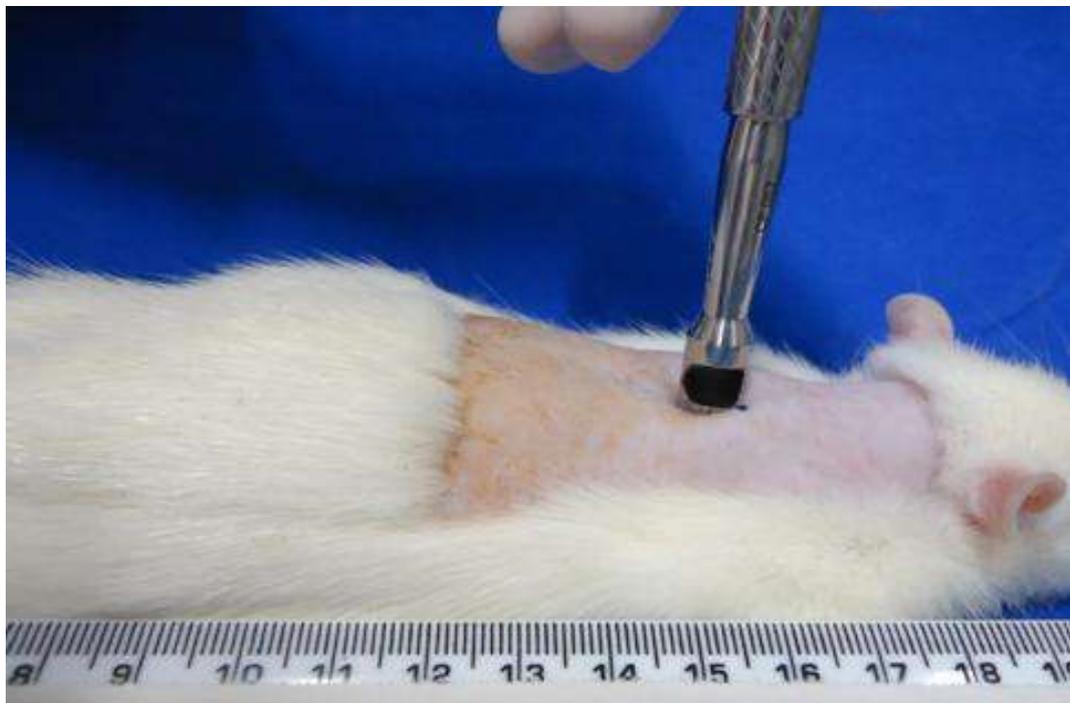


Figura 4. Realização da ferida excisional. Posicionamento perpendicular do *punch* sobre a superfície da pele na região dorsal do rato à 1 cm da linha transversa entre os ângulos inferiores das escápulas direita.

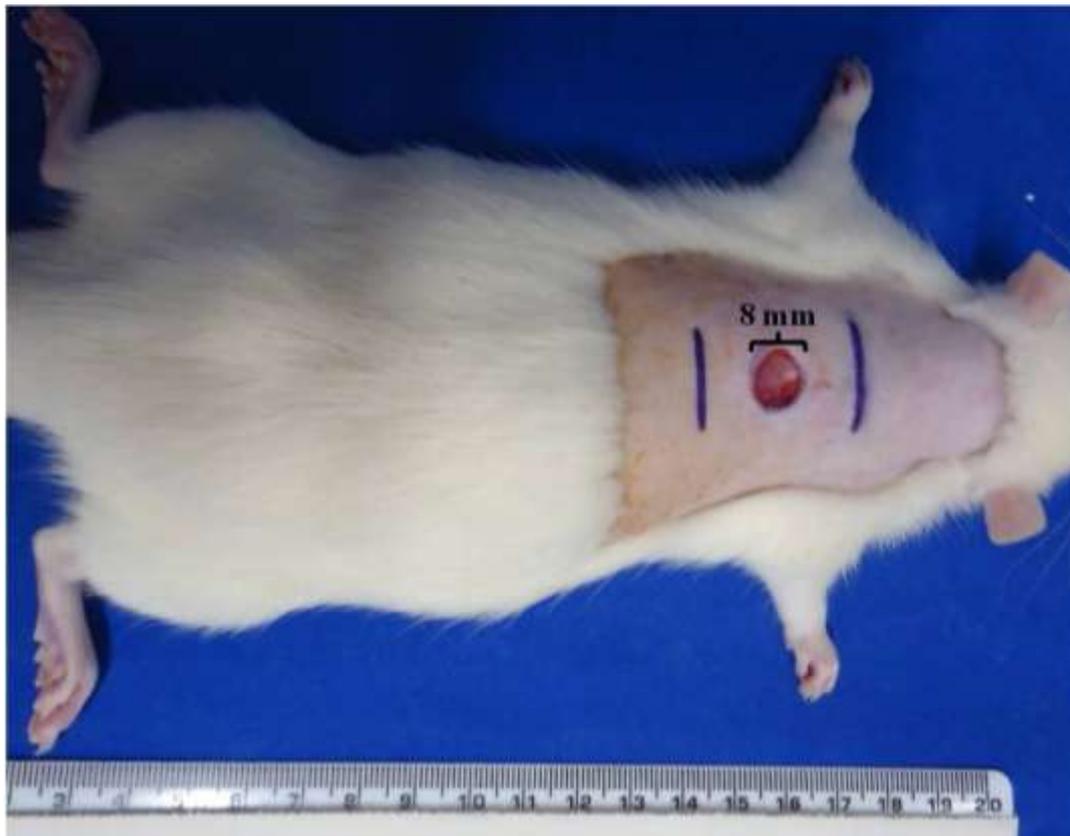


Figura 5. Ferida excisional de 8 mm na região dorsal do rato.

Ferida excisional na região dorsal do rato medindo 8 mm de diâmetro e demonstração da profundidade com exposição da *fascia superficialis* sobre a linha sagital e a demarcação do posicionamento dos eletrodos para a aplicação da *TENS*.

A homeostasia da região da ferida foi realizada por compressão suave digital, durante 2 min, com gaze estéril umedecida em solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento operatório e alocados em gaiolas plásticas individuais com as respectivas identificações de acordo com a randomização. As feridas cirúrgicas não receberam qualquer tipo de cobertura e/ou curativo durante todo o período do experimento.

Todos os animais foram operados no mesmo turno do dia e pelo mesmo pesquisador, o qual não tinha conhecimento dos grupos aos quais eles pertenceriam.

4.4.3 Aplicação da Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea

O equipamento de corrente pulsada, bifásica, retangular e simétrica usado neste experimento foi o *TENS* (Orion Tens[®] – Orion Aparelhos para Fisioterapia LTDA; n^o de série 00849), com visor digital (Figura 6).

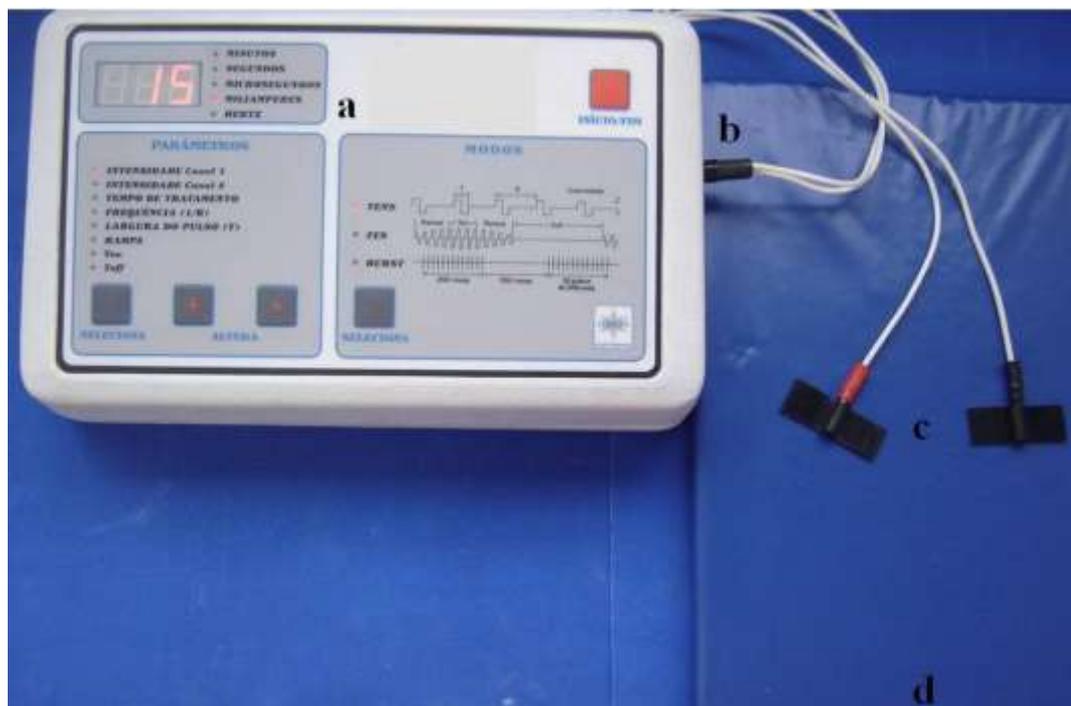


Figura 6. Equipamento de *TENS* utilizado.

Equipamento de *TENS* com (a) visor digital, (b) 1 canal de saída e (c) 2 eletrodos de silicone-carbono colocados em cima do (d) local onde o animal era posicionado para aplicação da *TENS*.

O estimulador elétrico foi aferido e calibrado com um osciloscópio digital, previamente ao início do experimento, no Laboratório de Engenharia Elétrica da Universidade Paulista (UNIP). Para cada pulso do dispositivo, pico a pico de tensão foi mensurada através de um resistor de 1 quilo-ohm ($k\Omega$) para calcular a amplitude da corrente em mA.

A aplicação da *TENS* foi iniciada imediatamente após 2 min do procedimento operatório e nos 2 dias subsequentes, totalizando 3 dias. Cada sessão teve duração de 60 min cada, realizada no mesmo período do dia.

A emissão da *TENS* foi feita por um canal de saída com dois eletrodos de silicone-carbono, medindo 4,2 cm de comprimento e 1,5 cm de largura (Figura 7) posicionados a 1 cm das margens inferior e superior da ferida excisional (Figura 8). Após assepsia da área correspondente, os eletrodos foram fixados com tiras de fita adesiva medindo 7 cm de comprimento e 1 cm de largura, garantindo o acoplamento homogêneo do eletrodo por toda a superfície da pele, sendo o cabo preto posicionado na base caudal da ferida e o cabo vermelho na base cranial da ferida (Figura 9). A mesma padronização de posicionamento e fixação dos eletrodos foi utilizada para o GS. Para a condução adequada da corrente, foram colocados 2 ml de gel de carbopol (Carbogel[®]) sob os eletrodos.

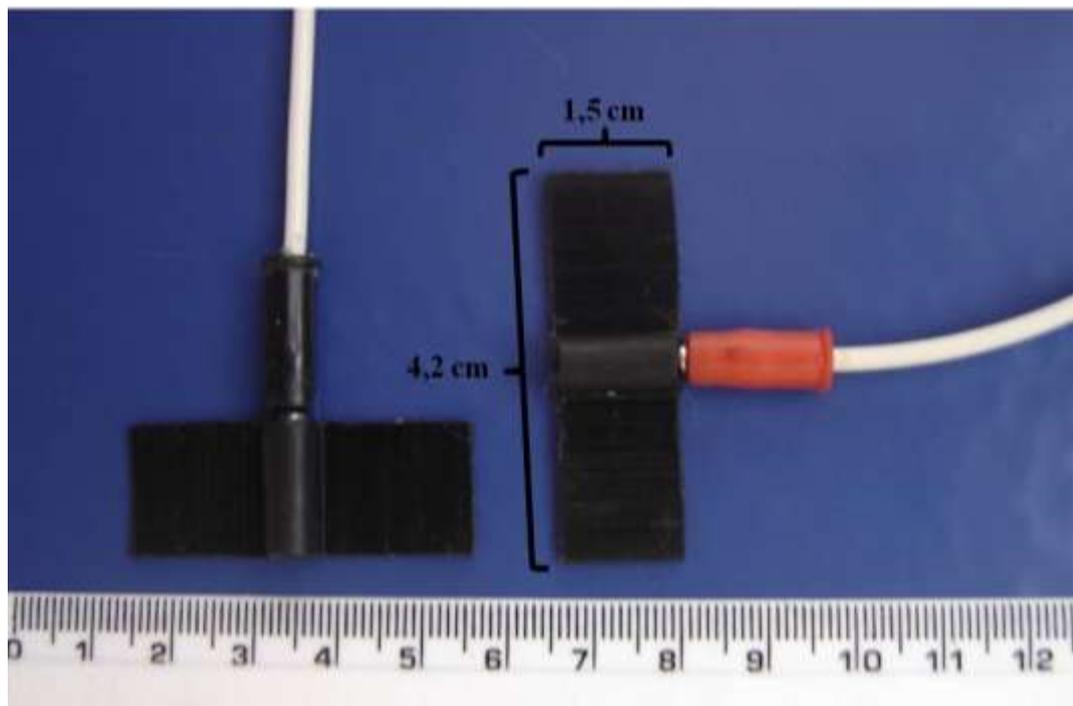


Figura 7. Eletrodos de silicone-carbono usados para a aplicação da *TENS*. Dois eletrodos de silicone-carbono medindo 4,2 cm de comprimento e 1,5 cm de largura.

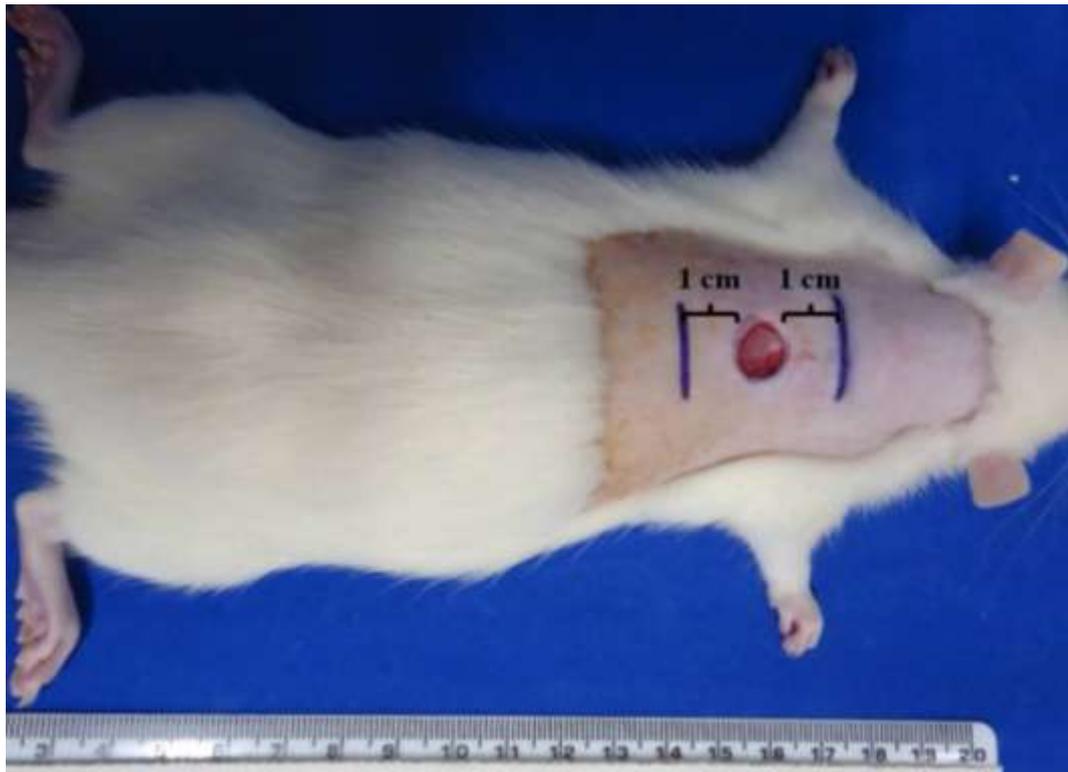


Figura 8. Padronização para o posicionamento dos eletrodos.

Sob plano anestésico, o animal foi colocado em decúbito ventral para o posicionamento dos eletrodos na superfície da pele da região dorsal do animal posicionados à 1 cm das margens inferior e superior da ferida excisional.



Figura 9. Padronização para aplicação da TENS.

Eletrodos posicionados e fixados na superfície da pele da região dorsal do animal à 1 cm das margens superior e inferior da ferida excisional.

Ao final de cada procedimento, durante os 3 dias de aplicação da *TENS*, foi administrado 5 miligramas por quilograma de massa corporal (mg/kg) de cloridrato de tramadol (Dorless V[®]), via oral para cada animal e estes foram recolocados em suas gaiolas individuais limpas e com água e ração *ad libitum*.

4.5 Análise microscópica

Com o animal em plano anestésico, foi coletada uma amostra de pele da região dorsal correspondente à área da ferida, tendo como padronização 2 mm em relação às margens superior e inferior e 5 mm das margens laterais da ferida, totalizando uma área variável de acordo com o dia de PO conforme o subgrupo (Figura 10).

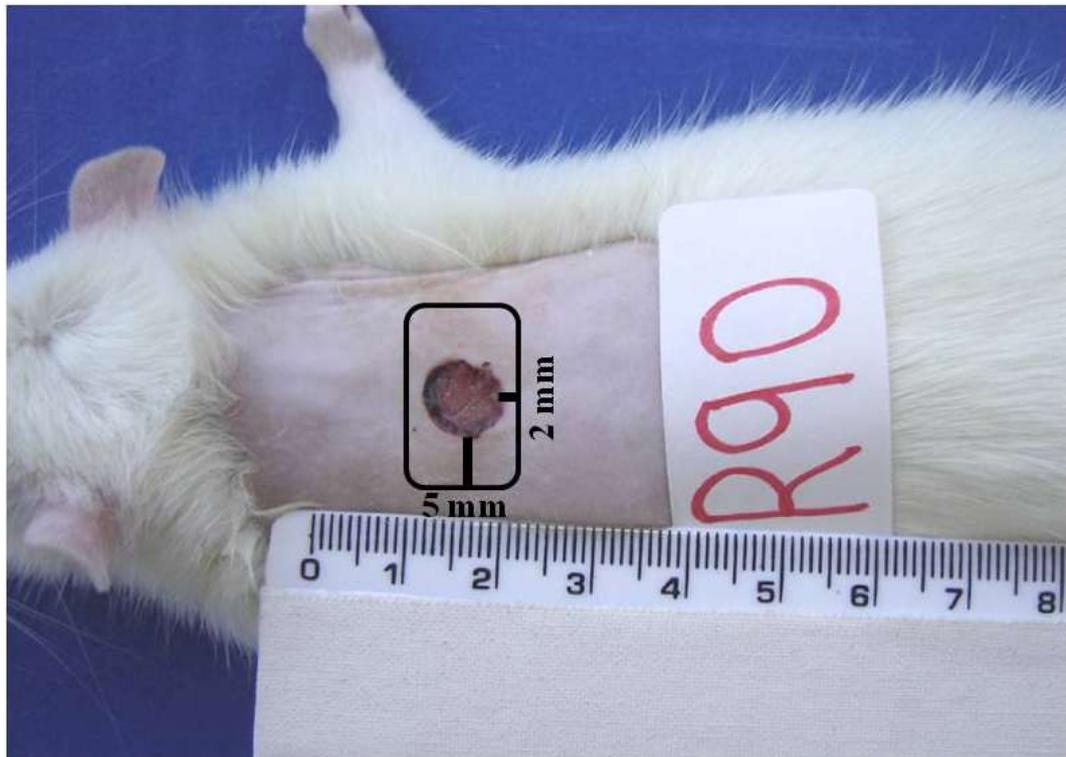


Figura 10. Padronização da amostra de pele para análise microscópica.

Demarcação da área da amostra de pele para análise microscópica na região dorsal do animal sendo 2 mm em relação às margens superior e inferior e 5 mm das margens laterais da ferida excisional.

Em seguida, o animal foi submetido à morte indolor assistida, por sobredose de anestésico, administrando-se 500 mg/kg de cloridrato de ketamina e 250 mg/kg de cloridrato de xilazina, por via intraperitoneal, seguida da secção dos grandes vasos cervicais.

Cada amostra de pele foi dividida ao meio e fixada em solução de formaldeído à 10%, por 24 horas. Assim o material foi processado em banhos crescentes de álcool, seguidos pela clarificação em banhos de xilol e infiltrados em parafina a 60°C. Finalizado esse processamento, o material foi incluído em bloco de parafina, levado ao micrótomo manual em cortes transversais em seções de 5 micrômetros (μm) de espessura para análises microscópicas.

4.5.1 Análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso

A reação imunohistoquímica para pesquisa de alfa-actina de músculo liso foi realizada com anticorpo (DAKO® – Anexo 1) por método do complexo streptavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB+, DAKO®). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela lavagem das lâminas com água oxigenada a 3% e a recuperação antigênica por aquecimento das lâminas durante 1 hora em panela a vapor, com tampão citrato 10 milimols (mM), pH 6,0. Os anticorpos primários foram anti-alfa-actina de músculo liso (clone DO7, monoclonal, DAKO®) diluído a 1/300, anti-antígeno CD34 (monoclonal, DAKO®) diluído a 1/100 e anti-antígeno Ki-67 (policlonal, DAKO®) diluído a 1/200.

As lâminas imunocoradas por alfa-actina de músculo liso foram utilizadas para contagem de vasos sanguíneos e de miofibroblastos.

A análise foi realizada pela quantificação destes 2 componentes teciduais em 10 imagens, obtidas aleatoriamente em aumento de 200 vezes (x) (objetiva de 20x), pela câmera fotográfica CoolSNAP-Procf (*Media Cybernetics Inc*) acoplada ao microscópio Nikon Eclipse-E800®.

Após a obtenção das imagens o número de vasos sanguíneos e de miofibroblastos positivos para a marcação da alfa-actina de músculo liso foi determinado pelo método semiquantitativo por meio da contagem direta em 10 campos microscópicos aumentados com auxílio do sistema

computadorizado de imagens *Image-ProPlus*, versão 4.5 (*Media Cybernetics Inc*).

Em seguida, os componentes foram somados individualmente por lâmina; e foi obtido o número de vasos sanguíneos e de miofibroblastos por milímetros ao quadrado (mm^2) de tecido cicatricial, e finalmente, calculada a mediana destes dois parâmetros separadamente.

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o *software GraphPad Prism*[®] 6.0 *for Windows*. Para verificar se os dados apresentavam distribuição normal foi utilizado o teste *Shapiro-Wilk*. Os vasos sanguíneos e os miofibroblastos foram quantificados na comparação dos grupos nos mesmos dias de PO foi feita utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* e o teste *post hoc Dunn*. Os dados foram expressos em mediana, erro-padrão (EP) e percentis 25 e 75 (SIEGEL & CASTELLAN, 1988). O nível de significância foi estipulado em 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

O teste *Shapiro-Wilk* demonstrou que os dados não apresentavam distribuição normal; portanto, utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* e, caso houvesse diferença significativa, o teste *post hoc Dunn* era aplicado.

Foram realizadas as determinações da mediana e do erro-padrão (EP) para os valores referentes à massa corporal inicial dos animais nos grupos GA, GB e GS, conforme os dias de análise (Tabela 1) (Apêndice 4). Para essa variável, não houve diferença significativa entre os grupos.

Os valores de mediana, erro-padrão (EP), percentis 25 e 75 e valor de p do tecido cicatricial na ferida excisional por área mensurada em milímetros ao quadrado (mm^2) nos grupos GA, GB e GS conforme os dias de pós-operatório (PO), verificado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, dos vasos sanguíneos estão na Tabela 2 e os dos miofibroblastos na Tabela 3.

Quanto aos vasos sanguíneos, a comparação entre os grupos (GA, GB e GS) mostrou que houve diferença significativa aos 3 dias ($p = 0,004$), 7 dias ($p = 0,002$) e 14 dias de PO ($p = 0,034$). Em relação aos miofibroblastos, observou-se alteração significativa aos 3 dias ($p = 0,004$) e 7 dias ($p = 0,001$) dias de PO. Não houve alterações aos 14 dias de PO ($p = 0,915$) comparando os grupos (GA, GB e GB).

Tabela 2. Vasos sanguíneos da ferida excisional entre os grupos GA, GB e GS, conforme os dias de PO.

Dias de PO	Grupos	Vasos sanguíneos (mm ²)				Valor de <i>p</i>
		Mediana	EP	Percentis		
				25	75	
3	GA	215,8	34,66	157,7	274,5	0,004*
	GB	378,4	42,52	329,3	511,5	
	GS	255,8	38,65	230,7	357,4	
7	GA	513,9	32,63	447,3	586,3	0,002*
	GB	548,9	51,48	519,1	770,2	
	GS	747,4	31,28	670,4	845,5	
14	GA	357,4	55,90	327	421,1	0,034*
	GB	408,8	44,16	314,2	449,6	
	GS	469,5	66,39	419,3	680,9	

PO – pós-operatório; EP – erro-padrão; GA – Grupo Alta frequência; GB – Grupo Baixa frequência; GS – Grupo Simulado; mm² – milímetros ao quadrado; * – Diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Miofibroblastos da ferida excisional entre os grupos GA, GB e GS, conforme os dias de PO.

Dias de PO	Grupos	Miofibroblastos (mm ²)				Valor de <i>p</i>
		Mediana	EP	Percentis		
				25	75	
3	GA	195,8	20,57	128,5	225,4	0,004*
	GB	403,2	52,93	237,1	567,6	
	GS	375,6	61,55	207,3	514,5	
7	GA	721,8	61,86	508	903,3	0,001*
	GB	1010	140,9	799,4	1428	
	GS	1380	214,6	1052	1818	
14	GA	616,6	103,3	418,7	833,9	0,915
	GB	540,7	184,8	452	1016	
	GS	621,3	92,92	532,6	714,9	

PO – pós-operatório; EP – erro-padrão; GA – Grupo Alta frequência; GB – Grupo Baixa frequência; GS – Grupo Simulado; mm² – milímetros ao quadrado; * – Diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Para os vasos sanguíneos, a comparação entre os grupos feita pelo teste *post hoc* *Dunn*. Aos 3 dias de PO, o GB apresentou maior quantidade de vasos sanguíneos em relação ao GA. Entretanto, aos 7 dias e aos 14 dias de PO, o GA demonstrou menor quantidade do que o GS (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação entre os grupos quanto aos vasos sanguíneos.

Dias de PO	Comparação entre os grupos			Diferença (mm ²)
3	GA	X	GB*	-187,8
	GA	X	GS	-71,3
	GB	X	GS	116,6
7	GA	X	GB	-110,1
	GA	X	GS*	-234,1
	GB	X	GS	-124,0
14	GA	X	GB	-1,3
	GA	X	GS*	-9,4
	GB	X	GS	-8,1

PO – pós-operatório; GA – Grupo Alta frequência; GB – Grupo Baixa frequência; GS – Grupo Simulado; X – *versus*; mm² – milímetros ao quadrado; * – Diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Sobre os miofibroblastos, o GA apresentou quantidade significativamente menor que o GB e o GS aos 3 dias de PO, e que o GS aos 7 dias de PO; já aos 14 dias de PO não foram observadas alterações (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação entre os grupos em relação aos miofibroblastos.

Dias de PO	Comparação entre os grupos			Diferença (mm ²)
3	GA	X	GB*	-211,4
	GA	X	GS*	-183,8
	GB	X	GS	27,5
7	GA	X	GB	-405,3
	GA	X	GS*	-807,7
	GB	X	GS	-402,4
14	GA	X	GB	-0,15
	GA	X	GS	-1,5
	GB	X	GS	-1,3

PO – pós-operatório; GA – Grupo Alta frequência; GB – Grupo Baixa frequência; GS – Grupo Simulado; X – *versus*; mm² – milímetros ao quadrado; * – Diferença significativa ($p \leq 0,05$).

As imagens histológicas da análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso dos vasos sanguíneos foram ilustradas com fotomicrografias conforme os dias de PO: 3 (Figura 11), 7 (Figura 12) e 14 (Figura 13), dos grupos GA, GB e GS; assim como para os dias de PO dos miofibroblastos: 3 (Figura 14), 7 (Figura 15) e 14 (Figura 16), dos grupos GA, GB e GS (Apêndice 5).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O estudo das abordagens terapêuticas para favorecer a cicatrização de feridas é uma área de grande interesse pela possibilidade de intervenção neste processo (VALACCHI *et al.*, 2012). Sejam elas agudas ou crônicas, geram considerável impacto na morbidade, mortalidade, funcionalidade e qualidade de vida dos pacientes (BRÖLMANN *et al.*, 2012).

O uso de estimulação elétrica (EE) como recurso terapêutico para influenciar o processo de cicatrização de feridas não é um assunto recente. Desde a década de 1960, muitos pesquisadores têm avaliado os efeitos da EE na cicatrização de feridas crônicas (CAREY & LEPLEY, 1962; KLOTH, 2005). Entretanto, até o momento, a evidência científica quanto aos efeitos da EE em feridas agudas ainda é insuficiente.

Dentre as modalidades de EE, destaca-se a Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation, TENS*) por ser um recurso terapêutico de baixo custo e de fácil manuseio (BUONOCORE & CAMUZZINI, 2007; DeSANTANA *et al.*, 2008; JONES & JOHNSON, 2009), que produz efeitos circulatórios (ABRAM *et al.*, 1980; DEBRECENI *et al.*, 1995; FORST *et al.*, 1997; WIKSTRÖM *et al.*, 1999; COSMO *et al.*, 2000) os quais são benéficos no processo de reparo tecidual (KARBA *et al.*, 1995; WIKSTRÖM *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2012). Por outro lado, a falta de embasamento

científico sobre os mecanismos microscópicos envolvidos na cicatrização de feridas somada à dúvida quanto aos efeitos das diferentes frequências da *TENS*, motivaram a realização deste estudo.

É importante destacar que o presente trabalho é o primeiro estudo experimental que comparou os efeitos da *TENS* de alta e baixa frequências nos vasos sanguíneos e nos miofibroblastos ao longo do processo de cicatrização de feridas agudas. A evidência científica disponível até o momento é coerente quanto ao efeito benéfico da *TENS* na cicatrização de feridas crônicas comprovada por meio de ensaios clínicos que avaliaram o processo de cicatrização com parâmetros não minuciosamente especificados. Além disso, as feridas crônicas abordadas nos ensaios clínicos são geralmente localizadas em extremidades em função de estes apresentarem distúrbios ou doenças sistêmicas que podem interferir no processo de cicatrização, como: diabetes (DEBRECENI *et al.*, 1995; BAKER *et al.*, 1997), lesão medular (KARBA *et al.*, 1995; BAKER *et al.*, 1996), hanseníase (KAADA & EMRU, 1988) e insuficiência venosa crônica (OGRIN, DARZINS, KHALIL, 2005; OGRIN, DARZINS, KHALIL, 2009); já a amostra deste estudo foi composta por ratos saudáveis com feridas agudas na região dorsal. Portanto, a literatura ainda é insuficiente para permitir comparações dos resultados obtidos pelo presente estudo por causa das diferenças metodológicas existentes no delineamento de estudo de cada tipo de pesquisa.

Até o momento, apenas KHALIL & MERHI (2000) realizaram um estudo experimental que avaliou o efeito da *TENS* na cicatrização de feridas por queimadura em ratos idosos, no qual observaram que as feridas cicatrizaram em média com 14,7 e com 21,8 dias naqueles que receberam a *TENS* ativa e simulada, respectivamente. Julga-se importante a realização

de estudos experimentais nesta temática, pois possibilita formas de avaliação por meio de análises microscópicas, o que nem sempre são passíveis de aplicação na casuística envolvida nos ensaios clínicos (FERREIRA *et al.*, 2005; HOCHMAN *et al.*, 2005).

Por meio da análise microscópica feita com alfa-actina de músculo liso, pode-se determinar a quantidade de vasos sanguíneos e de miofibroblastos na ferida excisional. Quanto aos vasos sanguíneos, observou-se que aos 3 dias de PO, o GB apresentou maior quantidade em relação ao GA. Já, aos 7 dias e aos 14 dias de PO, o GA demonstrou menor quantidade de vasos sanguíneos do que o GS. Desta forma, verificou-se que o GB3 teve angiogênese iniciada precocemente estimulada pela *TENS*, o GS7 e o GS14 apresentaram quantidade de vasos sanguíneos dentro da fase esperada; porém, o GA demonstrou menor quantidade de vasos sanguíneos, sugerindo uma inibição da proliferação dos vasos sanguíneos em todos os dias de PO (GA3, GA7 e GA14).

A *TENS* de baixa frequência (2 Hz) estimula a cicatrização de feridas em função do aumento dos seguintes fatores de crescimento na pele: Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor, EGF*) e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (*Platelet-derived Growth Factor, PDGF*), quando comparada com grupos que receberam a aplicação de agentes tópicos (solução solina, iodo-povidine e óleo de lavanda) (KUTLU *et al.*, 2013); e da liberação de neuropeptídeos: Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (*Calcitonin Gene-related Peptide, CGRP*) (KHALIL, MERHI, LIVETT, 2001) e Peptídeo Intestinal Vasoativo (*Vasoactive Intestinal Peptide, VIP*) (SEBASTIAN *et al.*, 2011).

A restauração do sistema vascular da área lesada é feita pela formação de novos vasos sanguíneos, chamada de angiogênese. Este fenômeno é mediado por alguns fatores de crescimento, sendo o principal deles o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*) (BATES & HARPER, 2002; HOEBEN *et al.*, 2004; BAI, FORRESTER, ZHAO, 2011; DEMINOVA-RICE, DURHAM, HERMAN, 2012). Considera-se que a angiogênese seja indispensável para o sucesso do processo de cicatrização de feridas. A utilização da *TENS* na tentativa de estimular a angiogênese já foi verificada por BEVILACQUA *et al.* (2007), SEBASTIAN *et al.* (2011) e KUTLU *et al.* (2013).

BEVILACQUA *et al.* (2007) compararam os efeitos da Estimulação Elétrica Transcutânea com Frequências Moduladas (*Electrical Transcutaneous Stimulation with Modulated Frequencies, FREMS*) com a *TENS* na liberação de *VEGF* em 20 indivíduos diabéticos e não-diabéticos. Observou-se por dosagem sanguínea que houve liberação do *VEGF* apenas durante a aplicação da *FREMS* em pacientes com polineuropatia diabética. Tais achados não podem ser comparados com os do presente estudo, pois o embasamento das correntes utilizadas (*TENS* e *FREMS*) não foi elucidado e os parâmetros da *TENS* não foram descritos. Além disso, o desenho de estudo propôs a utilização da *TENS* seguida da *FREMS*, sendo que o inverso poderia ter sido testado, sugerindo que a segunda corrente, independente da que fosse escolhida, apresentaria concentrações elevadas de *VEGF*, sugerindo um aumento da angiogênese.

Os miofibroblastos são identificados no tecido de granulação de uma ferida em cicatrização exibindo características de células com musculatura lisa, por isso são conhecidos por realizarem a contração da ferida, além de participarem da síntese da matriz extracelular. Assim, desempenham

importante papel nas propriedades do tecido cicatricial (DESMOULIÈRE, CHAPONNIER, GABBIANI, 2005; STOCKMANN *et al.*, 2011). Pelo presente estudo, observou-se que, aos 3 dias de PO, o GA apresentou quantidade significativamente menor de miofibroblastos que o GB e o GS; aos 7 dias de PO, o GA manteve a quantidade de miofibroblastos menor em relação ao GS, e aos 14 dias de PO não foram observadas alterações. Assim, o GA inibiu os miofibroblastos aos 3 e 7 dias de PO (GA3 e GA7). Segundo SEBASTIAN *et al.* (2011), por meio da análise imunohistoquímica com alfa-actina de músculo liso, a quantidade de miofibroblastos foi maior na pele de indivíduos saudáveis que não recebeu a EE quando comparada com a que recebeu.

Vale destacar que a *TENS* de alta frequência (GA) inibiu a proliferação de vasos sanguíneos e de miofibroblastos, podendo inferir que houve um prejuízo na cicatrização destas feridas estimuladas. Para os miofibroblastos, não houve alterações entre os grupos aos 14 dias de PO, em função das feridas estarem, possivelmente, completando o processo de cicatrização, tendo naturalmente a quantidade de miofibroblastos diminuída. Quando a ferida está completamente epitelizada, ocorre o desaparecimento dos miofibroblastos progressivamente, e, caso isso não aconteça, pode-se ocorrer a formação de cicatrizes patológicas (DESMOULIÈRE, CHAPONNIER, GABBIANI, 2005).

Os achados de SEBASTIAN *et al.* (2011) demonstraram que a aplicação da EE na cicatrização de feridas em 20 indivíduos saudáveis acelerou o processo de cicatrização por reduzir a inflamação demonstrada pela Interleucina-10 e pelo *VIP*, por promover a angiogênese em função do aumento da expressão do *VEGF* e por apresentar síntese de colágeno

acelerando a fase de maturação. Entretanto, ainda que o aumento da angiogênese também tenha sido observado no estudo de SEBASTIAN *et al.* (2011), é difícil afirmar se os achados corroboram ou não com os aqui demonstrados pelo GB3, pois não há descrição dos parâmetros da corrente de EE utilizados.

Apesar do conhecido efeito da *TENS* no sucesso do processo de cicatrização de feridas, apenas o GB3 demonstrou aumento na quantidade de vasos sanguíneos. O GA inibiu a proliferação dos vasos sanguíneos em todos os dias de PO (GA3, GA7 e GA14) e dos miofibroblastos aos 3 e 7 dias de PO (GA3 e GA7). Sugere-se que a alta dose oferecida pela *TENS* de alta frequência tenha promovido efeito inibitório na estimulação celular, assim como preconizado pela Lei de Arndt-Schultz. No que diz respeito à eletroterapia, a Lei de Arndt-Schultz é um conceito mais amplamente discutido para o uso da laserterapia de baixa intensidade, cujo enunciado prediz a existência de um efeito dose-dependente representado por uma curva fluência *versus* resposta biológica, ou seja, pequenas doses estimulam e grandes doses desorganizam e bloqueiam (KITCHEN, 2003).

O uso de um grupo simulado (GS) permite saber se os resultados obtidos ocorreram pela influência da intervenção terapêutica proposta ou não. FINSEN *et al.* (1988), KHALIL & MERHI (2000), KARBA *et al.* (1995) e OGRIN, DARZINS, KHALIL (2009) realizaram a aplicação da *TENS* ativa e simulada na cicatrização de feridas. Todos os estudos verificaram que a *TENS* ativa produziu efeitos positivos na cicatrização de feridas. Tais achados não corroboram com os deste, no qual a *TENS* aplicada pelo GB apresentou diferenças apenas na angiogênese aos 3 dias de PO e pelo GA observou-se inibição da angiogênese e dos miofibroblastos. Os resultados apresentados só puderam ser afirmados em

função da utilização da *TENS* simulada (GS) que possibilitou comparar os achados por meio das diferenças significantes. Possivelmente, o tipo de ferida escolhido influenciou tais achados, pois as feridas agudas progredem naturalmente através dos eventos celulares que ocorrem nas fases de cicatrização de feridas (AGHA *et al.*, 2011).

Ainda há divergências quanto aos parâmetros adequados para influenciar neste processo; portanto, o delineamento experimental aqui proposto objetivou comparar as diferentes frequências da *TENS*, com esta ligada, nos GA e GB, e simulada no GS. Os parâmetros propostos foram: T: 200 μ s e I: 15 mA por 60 min, sendo a frequência o único parâmetro diferente entre os grupos que receberam a *TENS* (GA: 80 Hz e GB: 5 Hz).

Efeitos positivos da *TENS* na cicatrização de feridas foram obtidos utilizando a *TENS* de alta (ABRAM *et al.*, 1980; BAKER *et al.*, 1997) e de baixa frequência (KAADA & EMRU, 1988; DEBRECENI *et al.*, 1995; KHALIL & MERHI, 2000; OGRIN, DARZINS, KHALIL, 2005; OGRIN, DARZINS, KHALIL, 2009; KUTLU *et al.*, 2013). Determinou-se o valor de 80 Hz como parâmetro de alta frequência para o GA baseando-se em ABRAM *et al.* (1980), e nos estudos de retalho cutâneo randômico, cujas frequências variaram de 75 a 100 Hz (LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008). Nessa faixa, há comprovação do aumento da temperatura da pele em cerca de +2,5°C e viabilidade do retalho cutâneo randômico. Para o GB, estabeleceu-se o valor de 5 Hz como parâmetro de baixa frequência com base nos achados de KHALIL & MERHI (2000) o qual verificou que a *TENS* pode ser efetiva na melhora vascular local na resposta dos nervos sensitivos eferentes em ratos idosos e pelos achados de liberação de *CGRP* (KHALIL, MERHI, LIVETT, 2001).

Em relação ao tempo de aplicação da *TENS*, há grande discrepância variando de 5 min (OGRIN, DARZINS, KHALIL, 2005; OGRIN, DARZINS, KHALIL, 2009), 15 min (KUTLU *et al.*, 2013), 20 min (DEBRECENI *et al.*, 1995), 30 min (FINSEN *et al.*, 1988; KAADA & EMRU, 1988; BAKER *et al.*, 1997) 60 min (COSMO *et al.*, 2000) e 120 min (KARBA *et al.*, 1995) nos ensaios clínicos, e apenas 1 min no estudo experimental (KHALIL e MERHI, 2000). Assim, determinou-se o tempo de 60 min assim como proposto por COSMO *et al.* (2000) e nos estudos experimentais de retalhos cutâneo randômico (LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008).

A amplitude da corrente (I) foi ajustada em 15 mA para ambos os grupos que receberam a *TENS* (GA e GB) conforme os estudos que utilizaram a *TENS* no retalho cutâneo randômico (LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008), os ensaios clínicos de DEBRECENI *et al.* (1995) e WIKSTRÖM *et al.* (1999), e os primeiros 15 min no estudo de COSMO *et al.* (2000). Porém, independente da amplitude da corrente estabelecida, DEBRECENI *et al.* (1995), KARBA *et al.* (1995), FORST *et al.* (1997) e ATALAY & YILMAZ (2009) consideraram como adequado aumentar até observar suave contração muscular indolor da área estimulada.

O ajuste da amplitude da corrente em 15 mA em pele de ratos reproduz o que ocorre em humanos, pois durante a aplicação da *TENS* também observa-se suave contração muscular do panículo carnosos do animal. Durante a execução do procedimento terapêutico observou-se grande estimulação dos animais pertencentes ao GA, a qual era responsável

por gerar contrações contínuas na região dorsal chegando a alterar minimamente o posicionamento do rato sobre a prancha cirúrgica. É sabido que estimulações em altas intensidades podem ativar as fibras simpáticas, causando vasoconstricção cutânea, o que pode ter sido responsável pela inibição demonstrada pelo GA (STARKEY, 2001).

A emissão da *TENS* para a pele depende de um importante sistema de transmissão feito por eletrodos, os quais são indispensáveis para aplicabilidade deste recurso, pois conectam-se ao aparelho e transmitem a corrente para a superfície da pele. Os eletrodos de silicone-carbono usados neste estudo foram padronizados em 4,2 x 1,5 cm, considerados pequenos oferecem melhor impedância do que os eletrodos grandes (NOLAN, 1991). O tamanho dos eletrodos foi determinado pelos estudos de *TENS* na viabilidade do retalho cutâneo randômico (LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008).

É importante ressaltar que a amplitude da corrente (I) e o tamanho dos eletrodos (área, a) influencia a impedância da corrente (d) ($d = I/a$), a qual determina os efeitos fisiológicos e terapêuticos da EE (STARKEY, 2001). A área total de cada eletrodo foi de 6,3 cm²; portanto, a impedância da corrente foi de 2,38 mA/cm². KHALIL & MERHI (2000) utilizaram eletrodos de silicone-carbono de 1,5 cm², porém não descreveram a amplitude da corrente usada, impossibilitando determinação de sua impedância. ATALAY & YILMAZ (2009) propuseram o uso de eletrodos com área de 16 cm² e, de acordo com a amplitude da corrente, a impedância da corrente foi de 1,25 mA/cm². Julga-se que seja importante incluir as informações sobre o tamanho dos eletrodos usados, bem como a

intensidade média atingida, para favorecer a determinação da impedância da corrente para a elaboração de novas pesquisas.

Talvez, possa haver a necessidade de pequenos ajustes nos parâmetros estipulados na aplicação da *TENS* para obtenção de resultados satisfatórios na sua utilização. Sugere-se que a alta amplitude da corrente possa promover efeitos adversos afetando o metabolismo do tecido e inibindo o transporte de aminoácidos afetando a síntese de proteínas (CHEN & JONHSON, 2010).

No protocolo aqui estabelecido não foi usado qualquer tipo de cobertura e/ou curativo, evitando a influência de formação de meios de cicatrização que pudessem alterar alguns aspectos do processo de cicatrização (KHALIL & MERHI, 2000; ANSELL *et al.*, 2012). Fato que também pode ter sido diferente dos estudos anteriores por se tratarem de humanos, necessitando que fosse utilizado algum tipo de cobertura e/ou curativo. O modelo experimental escolhido para o desenvolvimento do presente estudo foi o modelo cirúrgico induzido (FERREIRA *et al.*, 2005) de ferida excisional aguda em animais saudáveis, o qual é considerado o melhor modelo para avaliar o processo de cicatrização de segunda intenção (ANSELL *et al.*, 2012).

Como perspectivas sugere-se analisar os efeitos da *TENS* nos principais marcos de cada uma das fases do processo de cicatrização de feridas agudas, no que se refere à microcirculação por meio da dosagem de neuropeptídeos (*SP* e *CGRP*), na quantificação da resposta inflamatória por contagem de células inflamatórias, como mastócitos; além de ampliar a avaliação da angiogênese com análise imunohistoquímica para dosagem de *VEGF*, verificar a presença do Fator de Crescimento Transformador beta (*Transforming Growth Factor beta, TGF-beta*) para verificar a indução de

miofibroblastos utilizando a *TENS* de baixa frequência, determinar o tipo e a organização de colágeno no tecido cicatricial. Outra opção é comparar os efeitos da *TENS* em feridas agudas e crônicas com e sem o uso de cobertura ou curativos.

Novas pesquisas devem ser realizadas a fim de demonstrar os efeitos da *TENS* e de seus respectivos parâmetros, principalmente no que se refere à frequência e amplitude da corrente, no processo de cicatrização de feridas agudas e crônicas, para elucidar o motivo pelo qual o uso desta terapêutica vem demonstrando efeitos positivos na cicatrização de feridas crônicas de diversas etiologias por meio dos ensaios clínicos.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. A Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (*TENS*) de baixa frequência aumentou a quantidade de vasos sanguíneos de ferida excisional aguda em pele de ratos aos 3 dias de pós-operatório;
2. A Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (*TENS*) de alta frequência diminuiu a quantidade de vasos sanguíneos de ferida excisional aguda em pele de ratos aos 7 e 14 dias de pós-operatório;
3. A Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (*TENS*) de alta frequência diminuiu a quantidade de miofibroblastos de ferida excisional aguda em pele de ratos aos 3 e 7 dias de pós-operatório.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Abram SE, Asiddao CB, Reynolds AC. Increased skin temperature during transcutaneous electrical stimulation. *Anesth Analg.* 1980;59(1):22-5.

Agha R, Ogawa R, Pietramaggiori G, Orgill DP. A Review of the Role of Mechanical Forces in Cutaneous Wound Healing. *J Surg Res.* 2011;171:700-8.

Almaly A-MR, Petrofsky JS, Al-Naami B, Al-Nabulsi J. An effective method for skin blood flow measurement using local heat combined with electrical stimulation. *J Med Eng Technol.* 2009;33(8):663-9.

Ansell DM, Holden KA, Hardman MJ. Animal models of wound repair: are they cutting it? *Exp Dermatol.* 2012;21:581-5.

Atalay C, Yilmaz KB. The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on postmastectomy skin flap necrosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117:611-4.

Bai H, Forrester JV, Zhao M. DC electric stimulation upregulates angiogenic factors in endothelial cells through activation of VEGF receptors. *Cytokine.* 2012;55:110-5.

Baker LL, Chambers R, Demuth SK, Villar F. Effects of electrical stimulation on wound healing in patients with diabetic ulcers. *Diabetes Care*. 1997;20(3):405-12.

Baker LL, Rubayi S, Villar F, Demuth SK. Effect of electrical stimulation waveform on healing of ulcers in human beings with spinal cord injury. *Wound Repair Reg*. 1996;4(1):21-8.

Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol*. 2003;39(4-5):225-37.

Bevilacqua M, Domingues LJ, Barrella, Barbagallo M. Induction of vascular endothelial growth factor release by transcutaneous frequency modulated neural stimulation in diabetic polyneuropathy. *J Endocrinol Invest*. 2007;30:944-7.

Brölmann FE, Ubbink DT, Nelson EA, Munte K, van der Horst CMAM, Vermeulen H. Evidence-based decisions for local and systemic wound care. *Br J Surg*. 2012;99:1172-1183.

Buonocore M, Camuzzini N. Increase of the threshold during and after high-frequency transcutaneous peripheral nerve stimulation in a group of normal subjects. *EURA*. 2007;47:155-60.

Carey LC, LепleyD. Effect of continuous direct electric current on healing wounds. *Surg Forum*. 1962; 13:33-5.

Chen C, Johnson MI. A comparison of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) at 3 and 80 pulses per second on cold-pressor pain in healthy human participants. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2010;30:260-8.

Chen C, Johnson MI, McDonough S, Cramp F. The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on local and distal cutaneous blood flow following a prolonged heat stimulus in healthy subjects. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2007;27:154-61.

Cosmo P, Svensson H, Bornmyr S, Wikström S. Effects of transcutaneous nerve stimulation on the microcirculation in chronic leg ulcers. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg*. 2000;34:61-4.

Cramp AFL, Gilsenan C, Lowe AS, Walsh DM. The effect of high- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation upon cutaneous blood flow and skin temperature in healthy subjects. *Clin Physiol*. 2000;20(2):150-7.

Cramp FL, McCullough GR, Lowe AS, Walsh DM. Transcutaneous electric nerve stimulation: the effect of intensity on local and distal cutaneous blood flow and skin temperature in healthy subjects. *Arch Phys Med Rehabil*. 2002;83:5-9.

Debreceni L, Gyulai M, Debreceni A, Szabó K. Results of transcutaneous electrical stimulation (TES) in cure of lower extremity arterial disease. *Angiology*. 1995;46(7):613-8.

Demidova-Rice TN, Durham JT, Herman IM. Wound healing angiogenesis: innovations and challenges in acute and chronic wound healing. *Adv Wound Care*. 2012;1(1):17-22.

DeSantana JM, Walsh DM, Vance C, Rakel BA, Sluka KA. Effectiveness of transcutaneous electrical nerve stimulation for treatment of hyperalgesia and pain. *Curr Rheumatol Rep*. 2008;10:492-9.

Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005;13(1):7-12.

Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004;1(9):283-9.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras*. 2005;20(Suppl. 2):28-34.

Finsen L, Persen L, Løvlien M, Veslegaard EK, Simensen M, Gåsvann AK, Benum P. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation After Major Amputation. *J Bone Joint Surg Br*. 1988;70-B(1):109-12.

Forst T, Pfützner A, Bauersachs R, Arin M, Bach B, Biehlmaier H, Küstner E, Beyer J. Comparison of the microvascular response to transcutaneous electrical nerve stimulation and postocclusive ischemia in the diabetic foot. *J Diab Comp*. 1997;11(5):291-7.

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

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):549-80.

Jones I, Johnson M. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS). *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain.* 2009;9(4):130-5.

Kaada B, Emru M. Promoted healing of leprous ulcers by transcutaneous nerve stimulation. *Acupunct Electrother Res.* 1988;13(4):165-76.

Kaada B, Helle KB. In search of mediators of skin vasodilation induced by transcutaneous nerve stimulation: IV. In vitro bioassay of the vaso-inhibitory activity of sera from patients suffering from peripheral ischemia. *Gen Pharmacol.* 1984;15(2):115-22.

Kaada B, Olsen E, Eielsen O. In search of mediators of skin vasodilation induced by transcutaneous nerve stimulation: III. Increase in plasma VIP in normal subjects and in Raynaud's disease. *Gen Pharmacol.* 1984;15(2):107-13.

Karba R, Benko H, Savrin R, Vodovnik L. Combination of occlusive dressings and electrical stimulation in pressure ulcer treatment. *Med Sci Res.* 1995;23:671-3.

Kelechi N, Jharna K. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for chronic pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2013.

Khalil Z, Merhi M. Effects of aging on neurogenic vasodilator responses evoked by transcutaneous electrical nerve stimulation: relevance to wound healing. *J Gerontol Biol Sci*. 2000;55A(6):B257-63.

Khalil Z, Merhi M, Livett BG. Differential involvement of conotoxin-sensitive mechanisms in neurogenic vasodilatation responses: effects of age. *J Gerontol Biol Sci Med Sci*, 2001;56(8):B356-63.

Kitchen S. *Eletroterapia: prática baseada em evidências*. 11 ed. São Paulo: Manole. 2003.348p.

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;4(1):23-44.

Kondo T. Timing of skin wounds. *Leg Med*. 2007;9:109-14.

Kutlu AK, Çeçen D, Gürgen SG, Sayın O, Çetin F. A comparison study of growth factor expression following treatment with Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation, saline solution, povidone-iodine, and lavender oil in wounds healing. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;1-9.

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25:9-18.

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

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

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

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

Machado AFP, Santana EF, Tacani PM, Liebano RE. The effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on tissue repair: a literature review. *Can J Plast Surg.* 2012;20(4):237-40.

Melzack R, Wall P. Pain mechanisms: A new theory. *Science.* 1965;150:971-9.

Nolan MF. Conductive differences in electrodes used with transcutaneous electrical nerve stimulation devices. *Phys Ther.* 1991;71(10):746-51.

Nolan MF, Hartsfield JK, Witters DM, Wason PJ. Failure of transcutaneous electrical nerve stimulation in the conventional and burst modes to alter digital skin temperature. *Arch Phys Med Rehab.* 1993;74:182-7.

Ogrin R, Darzins P, Khalil Z. Use of the sensory nerve stimulator to accelerate healing of a venous leg ulcer with sensory nerve dysfunction: a case study. *Int Wound J.* 2005;2:242-51.

Ogrin R, Darzins P, Khalil Z. The use of sensory nerve stimulation and compression bandaging to improve sensory nerve function and healing of chronic venous leg ulcers. *Curr Aging Sci.* 2009;2(1):72-80.

Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia clínica.* 2 ed. São Paulo: Artmed Editora; 2001.426p.

Scudds RJ, Helewa A, Scudds RA. The effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on skin temperature in asymptomatic subjects. *Phys Ther.* 1995;75(7):622-8.

Sebastian A, Syed F, Perry D, Balamurugan V, Colthurst J, Chaudhry IH, Bayat A. Acceleration of cutaneous healing by electrical stimulation: Degenerate electrical waveform down-regulates inflammation, up-regulates angiogenesis and advances remodeling in temporal punch biopsies in a human volunteer study. *Wound Repair Regen.* 2011;19(6):693-708.

Siegel S, Castellan JR. *Nonparametric statistics.* 2 ed. New York: McGraw-Hill;1988.399p.

Starkey C. Agentes elétricos. In: Starkey C, ed. Recursos terapêuticos em fisioterapia. São Paulo: Editora Manole;2001.p.176-276.

Stockmann C, Kirmse S, Helfrich I, Weidemann A, Takeda N, Doedens A, Johnson RS. A wound size-dependent effect of myeloid cell-derived vascular endothelial growth factor on wound healing. *J Invest Dermatol.* 2011;131:797-801.

Valacchi G, Zanardi I, Sticozzi C, Bocci V, Travagli V. Emerging topics in cutaneous wound repair. *Ann NY Acad Sci.* 2012;1259:136-44.

Walsh DM, Howe TE, Johnson MI, Sluka KA. Transcutaneous electrical nerve stimulation for acute pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2006.

Wikström OS, Svedman P, Henry S, Tanweer AS. Effect of transcutaneous nerve stimulation on microcirculation in intact skin and blister wounds in healthy volunteers. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg,* 1999;33:195-201.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). [Homepage da internet]. Princípios éticos da experimentação animal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.cobea.org.br>.

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

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

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature - Nomina anatômica veterinária. 3. ed. New York: Ithaca; 1983. 216p.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: The effects of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) on the wound healing process have been studying to verify the most important events to tissue repair. **Objective:** To assess the effect of high- and low-frequency TENS on the angiogenesis and myofibroblasts of acute excisional wounds in rats' skin. **Methods:** Ninety young adult male EPM1-Wistar rats were used in the study. An excisional wound was performed on the back of each animal using an 8-mm punch. The animals were randomly assigned to three groups: the High-frequency Group (HG: 80 Hz), Low-frequency Group (LG: 5 Hz), and Sham Group (SG: TENS turned off). TENS was delivered on three days: in the immediate postoperative period and on two consecutive days. Pulse duration and current intensity were 200 μ s and 15 mA, respectively. The length of each TENS session was 60 minutes. Microscopic analyses were taken to quantify the blood vessels and myofibroblasts on postoperative days 3, 7, and 14. **Results:** On postoperative day 3, the LG showed more angiogenesis than HG; on the postoperative days 7 and 14, the LG inhibited the angiogenesis compared to SG. On postoperative day 3, the HG inhibited the myofibroblasts compared to LG and SG, and on the postoperative day 7 compared to SG only. **Conclusions:** Low-frequency TENS increased the angiogenesis on postoperative day 3 and the high-frequency TENS inhibited the angiogenesis and myofibroblasts of acute excisional wounds in rats' skin.

APÊNDICES

APÊNCIDE 1



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 26 de Novembro de 2010.
CEP 1491/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ALINE FERNANDA PEREZ MACHADO
Co-Investigadores: 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: "Estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) na contração de ferida excisional de pele em ratos".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: DESENVOLVIMENTO OU APRIMORAMENTO DE TERAPEUTICA NÃO MEDICAMENTOSA - PROJETO EXPERIMENTAL.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar o efeito da estimulação elétrica nervosa transcutânea na contração de ferida excisional da pele de ratos.

RESUMO: A amostra será composta por 90 ratos adultos jovens, da linhagem Wistar EPM, que serão submetidos a uma ferida excisional circular de 8 milímetros feita com a utilização de punch metálico estéril na região dorsal após epilação, com o animal anestesiado. Serão distribuídos randomicamente em 3 grupos de 30 animais cada grupo. GRUPO ALTA FREQUENCIA, GRUPO BAIXA FREQUENCIA E GRUPO SIMULADO. Os animais do Grupo Alta frequência e baixa frequência serão submetidos à aplicação da TENS ligada no modo convencional, com 200 pulsos por segundo, amplitude de 15 miliampères durante 60 minutos por 3 dias consecutivos desde o pós operatório imediato até o terceiro dia do pós operatório com frequência de 80 Hertz. Já os ratos de GS receberão a aplicação da TENS desligada pro meio do posicionamento dos eletrodos durante 60 minutos por 3 dias consecutivos. Os procedimentos serão realizados no laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP. Os animais permanecerão durante 15 dias aclimatando-se ao ambiente, antes do início do experimento. A anestesia será através de ketamina e xilazina por via intramuscular. Para a realização da ferida será utilizado um punch metálico estéril de 8 milímetros de diâmetro, com lâmina circular cortante na sua borda inferior na qual será pressionada e movida no sentido horário, sobre a pele dispendo a margem superior do punch a quatro cm da linha transversa entre os angulos inferiores da escápula. Os animais receberão um colar cervical de plástico, para evitar a autofagia. As feridas cirurgicas não receberão qualquer tipo de cobertura e os animais serão alocados em gaiolas individuais durante todo o período do experimento. Após o tratamento, será



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

administrado 5mg/kg de cloridrato de tramadol via oral. A anestesia será através de overdose de anestesia, via IP de Clorodrato de Ketamina e cloridrato de Xilazina.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: fundamentação apresentada e adequada.

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: SEM FINANCIAMENTO EXTERNO.

CRONOGRAMA: 18 MESES.

OBJETIVO ACADÊMICO: Não envolve obtenção de título.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 21/11/2011 e 20/11/2012.

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

1491/10

O PESQUISADOR APRESENTOU JUSTIFICATIVA PARA A UTILIZAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE ANIMAIS

APÊNDICE 2

O cálculo amostral para o estudo foi realizado para detectar uma diferença média de 211,4 e desvio-padrão de $\pm 142,3$ miofibroblastos por milímetros ao quadrado (mm^2) no tecido cicatricial entre os grupos GA X GB utilizando a análise de imunohistoquímica de alfa-actina de músculo liso. Foi considerado poder estatístico de 80% e alfa de 5%. Sendo assim, foram necessários 10 animais por subgrupo (totalizando 90 animais) (*Minitab 15, State College, PA*), considerado número para representatividade estatística adequado e concordando com os estudos em retalhos cutâneos utilizados como base para este desenho de pesquisa (LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; LIEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008).

Tais dados foram obtidos aos 3 dias de pós-operatório (PO) a partir de um estudo piloto executado previamente ao início deste, cujo intuito também foi analisar a marcação nas lâminas e a presença de miofibroblastos no tecido cicatricial utilizando a análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso.

APÊNDICE 3

A Randomization Plan
 from <http://www.randomization.com>

1. GRUPO B _____
2. PLACEBO _____
3. PLACEBO _____
4. GRUPO A _____
5. GRUPO B _____
6. GRUPO B _____
7. PLACEBO _____
8. GRUPO B _____
9. GRUPO B _____
10. PLACEBO _____
11. PLACEBO _____
12. PLACEBO _____
13. GRUPO B _____
14. GRUPO A _____
15. GRUPO A _____
16. GRUPO A _____
17. GRUPO B _____
18. GRUPO A _____
19. PLACEBO _____
20. GRUPO B _____
21. GRUPO A _____
22. GRUPO B _____
23. GRUPO A _____
24. PLACEBO _____
25. PLACEBO _____
26. GRUPO A _____
27. GRUPO B _____
28. GRUPO A _____
29. GRUPO A _____
30. PLACEBO _____
31. PLACEBO _____
32. GRUPO A _____
33. GRUPO A _____

-
34. GRUPO B _____
 35. PLACEBO _____
 36. GRUPO B _____
 37. PLACEBO _____
 38. PLACEBO _____
 39. GRUPO B _____
 40. GRUPO A _____
 41. GRUPO A _____
 42. GRUPO A _____
 43. GRUPO B _____
 44. PLACEBO _____
 45. GRUPO A _____
 46. PLACEBO _____
 47. GRUPO B _____
 48. GRUPO A _____
 49. PLACEBO _____
 50. GRUPO B _____
 51. PLACEBO _____
 52. GRUPO A _____
 53. GRUPO B _____
 54. PLACEBO _____
 55. GRUPO B _____
 56. GRUPO A _____
 57. GRUPO A _____
 58. GRUPO B _____
 59. PLACEBO _____
 60. GRUPO B _____
 61. PLACEBO _____
 62. PLACEBO _____
 63. PLACEBO _____
 64. GRUPO B _____
 65. GRUPO B _____
 66. PLACEBO _____
 67. GRUPO B _____
 68. PLACEBO _____
 69. GRUPO A _____
 70. GRUPO A _____
 71. GRUPO A _____
 72. PLACEBO _____
 73. GRUPO A _____
 74. GRUPO B _____
 75. GRUPO A _____
 76. PLACEBO _____
 77. GRUPO B _____
 78. GRUPO A _____
 79. GRUPO B _____
 80. GRUPO B _____
 81. PLACEBO _____

- 82. GRUPO A _____
- 83. GRUPO A _____
- 84. GRUPO B _____
- 85. GRUPO A _____
- 86. GRUPO A _____
- 87. PLACEBO _____
- 88. PLACEBO _____
- 89. GRUPO B _____
- 90. GRUPO B _____

90 subjects randomized into 3 blocks
 To reproduce this plan, use the seed 16136
 Randomization plan created on quarta-feira, 25 de julho de 2012 13:12:46

A Randomization Plan
 from
<http://www.randomization.com>

- 1. A 7 _____
- 2. A 3 _____
- 3. A 14 _____
- 4. A 14 _____
- 5. A 3 _____
- 6. A 7 _____
- 7. A 3 _____
- 8. A 7 _____
- 9. A 14 _____
- 10. A 14 _____
- 11. A 7 _____
- 12. A 3 _____
- 13. A 7 _____
- 14. A 3 _____
- 15. A 14 _____
- 16. A 14 _____
- 17. A 7 _____
- 18. A 3 _____
- 19. A 14 _____
- 20. A 7 _____
- 21. A 3 _____
- 22. A 3 _____
- 23. A 14 _____
- 24. A 7 _____
- 25. A 7 _____
- 26. A 3 _____
- 27. A 14 _____
- 28. A 3 _____

- 29. A 14 _____
- 30. A 7 _____

30 subjects randomized into 10 blocks
 To reproduce this plan, use the seed 27266
 Randomization plan created on quarta-feira, 25 de julho de 2012 13:25:57

A Randomization Plan
 from
<http://www.randomization.com>

- 1. B 3 _____
- 2. B 14 _____
- 3. B 7 _____
- 4. B 3 _____
- 5. B 14 _____
- 6. B 7 _____
- 7. B 3 _____
- 8. B 7 _____
- 9. B 14 _____
- 10. B 7 _____
- 11. B 3 _____
- 12. B 14 _____
- 13. B 3 _____
- 14. B 7 _____
- 15. B 14 _____
- 16. B 14 _____
- 17. B 7 _____
- 18. B 3 _____
- 19. B 14 _____
- 20. B 3 _____
- 21. B 7 _____
- 22. B 14 _____
- 23. B 3 _____
- 24. B 7 _____
- 25. B 14 _____
- 26. B 7 _____
- 27. B 3 _____
- 28. B 14 _____
- 29. B 7 _____
- 30. B 3 _____

30 subjects randomized into 10 blocks
 To reproduce this plan, use the seed 3284
 Randomization plan created on quarta-feira, 25 de julho de 2012 13:27:03

A Randomization Plan
 from
<http://www.randomization.com>

1. P 14 _____
2. P 7 _____
3. P 3 _____
4. P 7 _____
5. P 14 _____
6. P 3 _____
7. P 7 _____
8. P 3 _____
9. P 14 _____
10. P 14 _____
11. P 7 _____
12. P 3 _____
13. P 14 _____
14. P 3 _____
15. P 7 _____
16. P 7 _____
17. P 14 _____
18. P 3 _____
19. P 3 _____
20. P 14 _____
21. P 7 _____
22. P 14 _____
23. P 3 _____
24. P 7 _____
25. P 3 _____
26. P 7 _____
27. P 14 _____
28. P 7 _____
29. P 3 _____
30. P 14 _____

30 subjects randomized into 10 blocks
 To reproduce this plan, use the seed 18286
 Randomization plan created on quarta-feira, 25 de julho de 2012 13:27:48

APÊNDICE 4

Tabela 1. Massa corporal inicial dos animais entre os grupos GA, GB e GS, conforme os dias de PO.

Dias de PO	Grupos	Massa corporal Inicial (g)		
		Mediana	EP	Valor de <i>p</i>
3	GA	257,5	2,86	0,2015
	GB	265	8,40	
	GS	270	7,45	
7	GA	260	4,85	0,8331
	GB	265	4,60	
	GS	260	1,94	
14	GA	260	4,21	0,9103
	GB	262,5	4,27	
	GS	260	6,53	

GA – Grupo Alta frequência; GB – Grupo Baixa frequência; GS – Grupo Simulado; EP – Erro-padrão; g – gramas.

APÊNCIDE 5

As imagens histológicas da análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso dos vasos sanguíneos foram ilustradas com fotomicrografias conforme os dias de PO: 3 (Figura 11), 7 (Figura 12) e 14 (Figura 13), dos grupos GA, GB e GS, como segue:

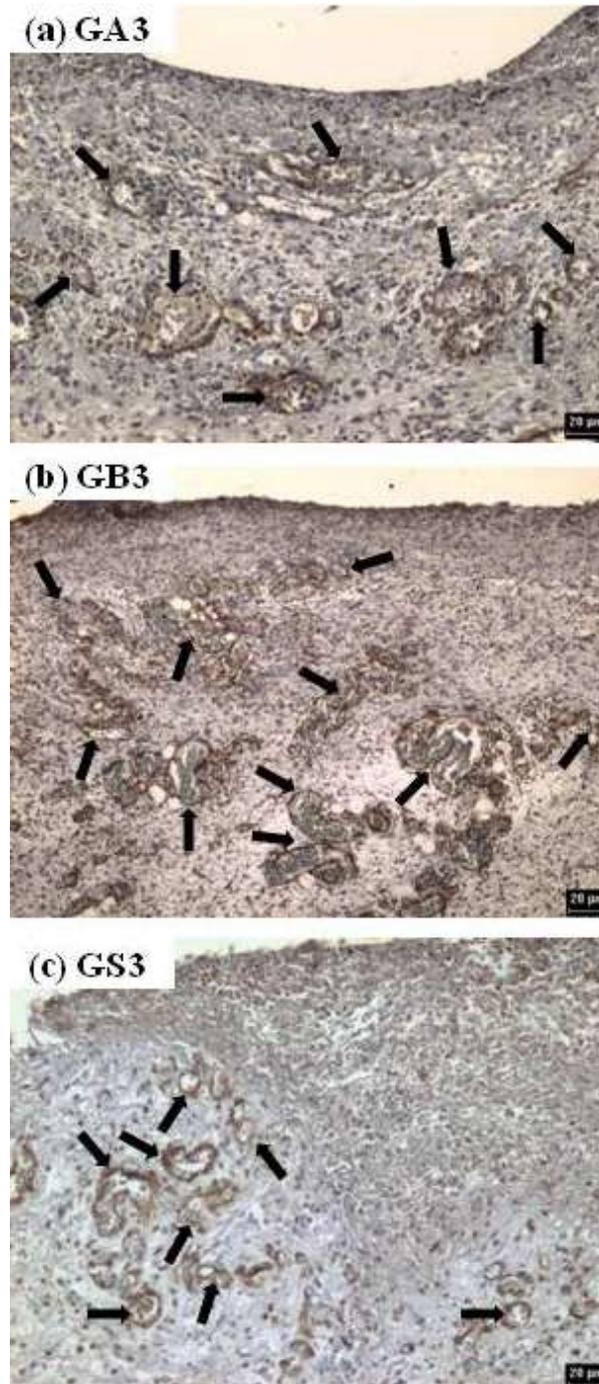


Figura 11. Fotomicrografias dos vasos sanguíneos positivos dos GA, GB e GS, aos 3 dias de PO.

(a) Vasos sanguíneos do GA3.

(b) Vasos sanguíneos do GB3.

(c) Vasos sanguíneos do GS3.

Vasos sanguíneos positivos identificados por setas encontrados na análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso, 20 µm.

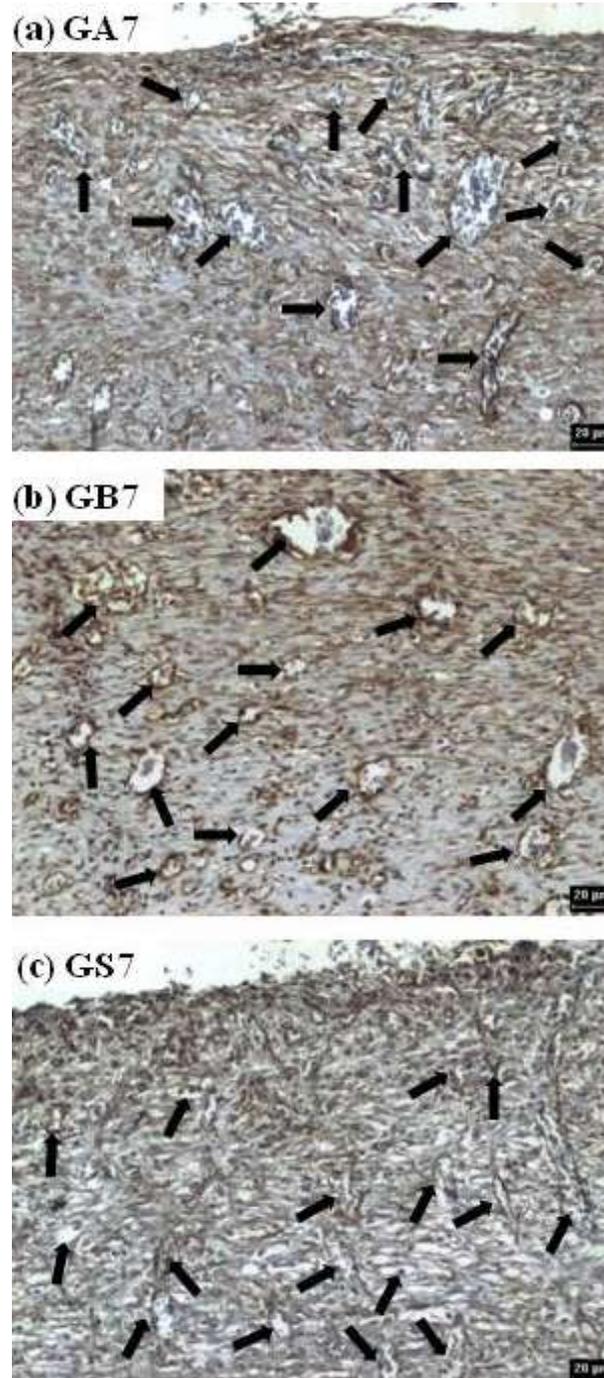


Figura 12. Fotomicrografias dos vasos sanguíneos positivos dos GA, GB e GS, aos 7 dias de PO.

(a) Vasos sanguíneos do GA7.

(b) Vasos sanguíneos do GB7.

(c) Vasos sanguíneos do GS7.

Vasos sanguíneos positivos identificados por setas encontrados na análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso, 20 µm.

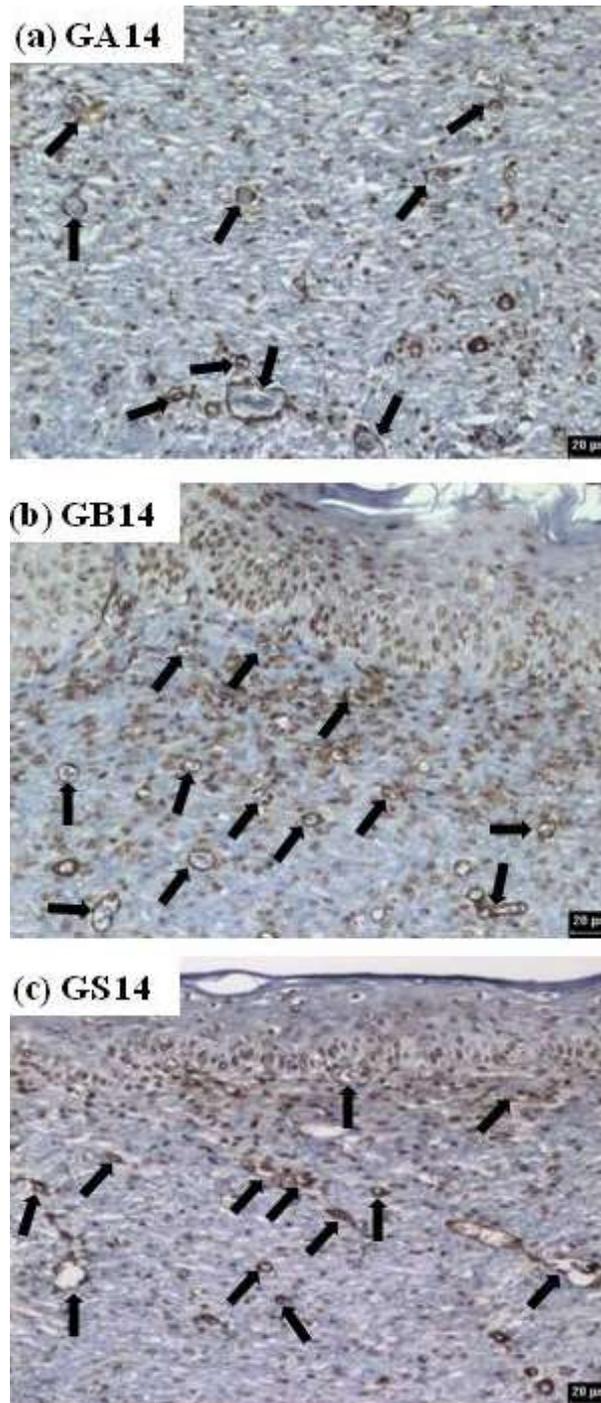


Figura 13. Fotomicrografias dos vasos sanguíneos positivos dos GA, GB e GS, aos 14 dias de PO.

(a) Vasos sanguíneos do GA14.

(b) Vasos sanguíneos do GB14.

(c) Vasos sanguíneos do GS14.

Vasos sanguíneos positivos identificados por setas encontrados na análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso, 20 µm.

As imagens histológicas da análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso dos miofibroblastos foram ilustradas com fotomicrografias conforme os dias de PO: 3 (Figura 14), 7 (Figura 15) e 14 (Figura 16), dos grupos GA, GB e GS, como segue:

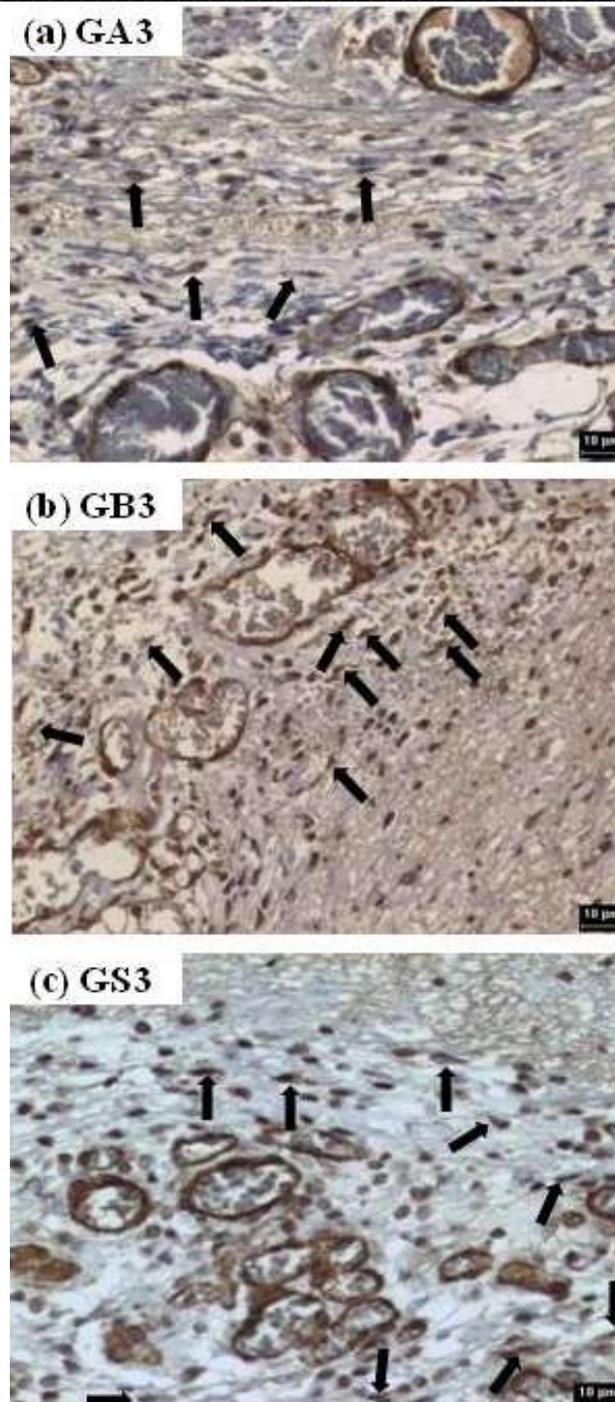


Figura 14. Fotomicrografias dos miofibroblastos positivos dos GA, GB e GS, aos 3 dias de PO.

(a) Miofibroblastos do GA3.

(b) Miofibroblastos do GB3.

(c) Miofibroblastos do GS3.

Miofibroblastos positivos identificados por setas encontrados na análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso, 10 µm.

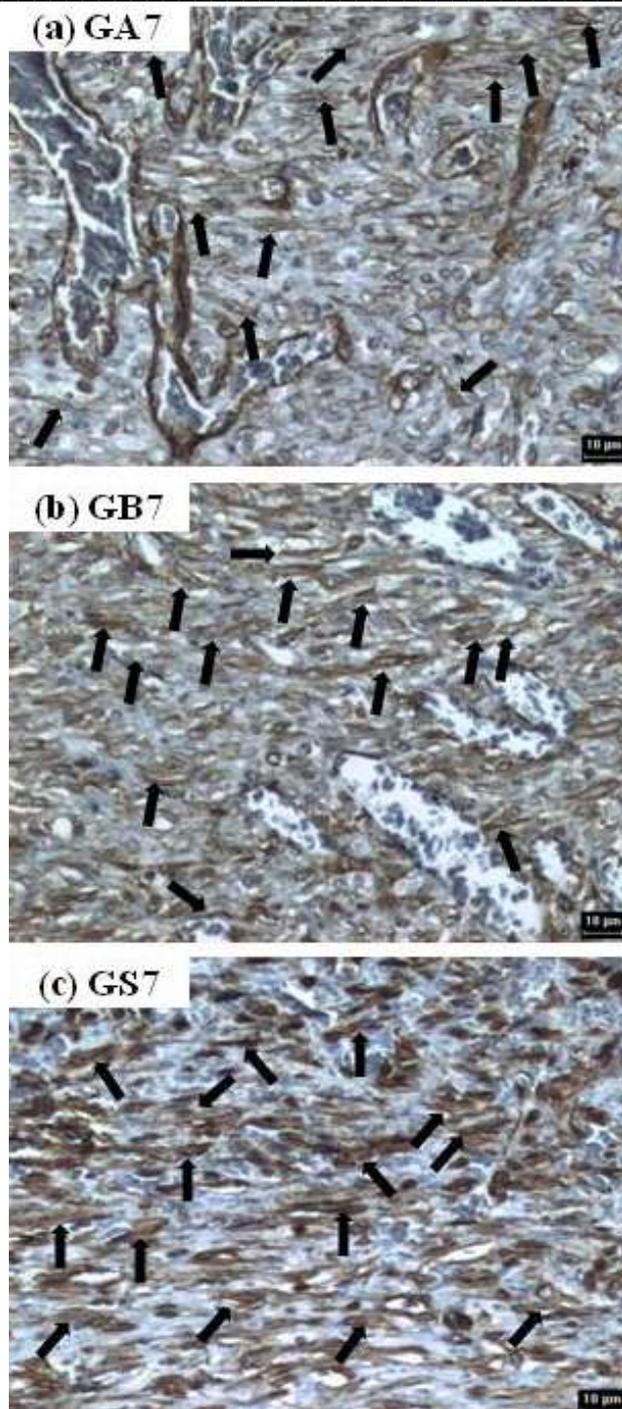


Figura 15. Fotomicrografias dos miofibroblastos positivos dos GA, GB e GS, aos 7 dias de PO.

(a) Miofibroblastos do GA7.

(b) Miofibroblastos do GB7.

(c) Miofibroblastos do GS7.

Miofibroblastos positivos identificados por setas encontrados na análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso, 10 µm.

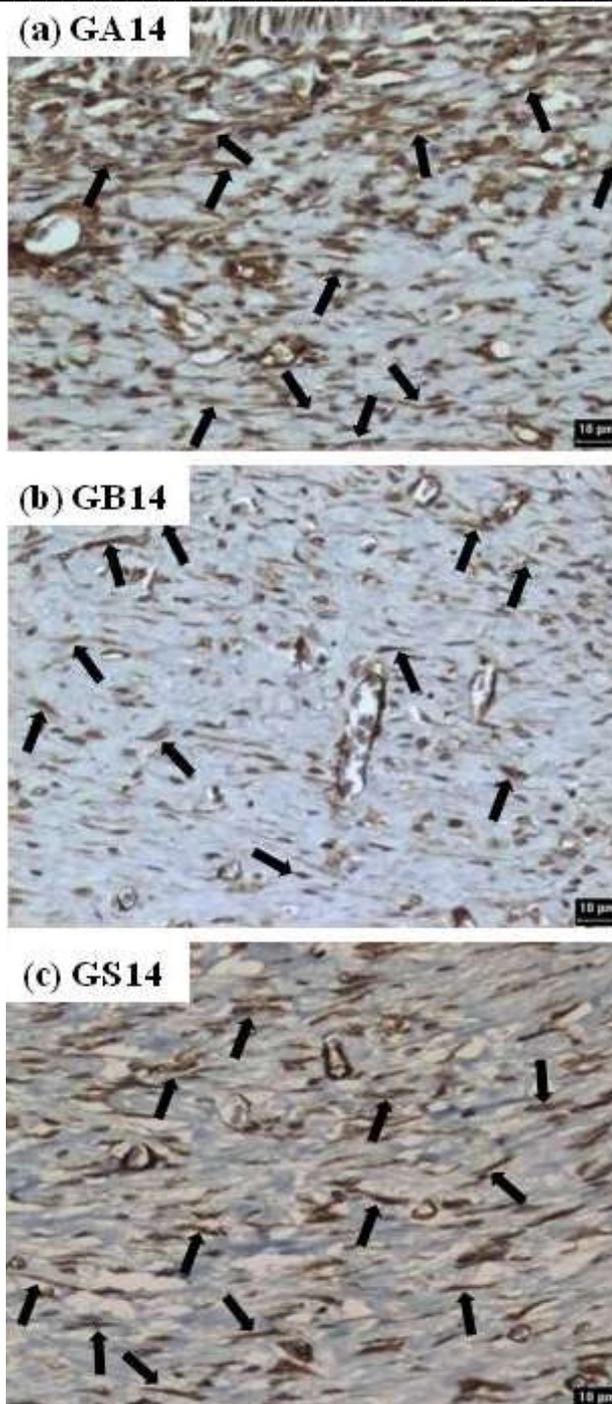


Figura 16. Fotomicrografias dos miofibroblastos positivos dos GA, GB e GS, aos 14 dias de PO.

(a) Miofibroblastos do GA14.

(b) Miofibroblastos do GB14.

(c) Miofibroblastos do GS14.

Miofibroblastos positivos identificados por setas encontrados na análise imunohistoquímica por alfa-actina de músculo liso, 10 µm.

ANEXOS

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/> – terminologia em saúde.

Sandroni C. Vocabulário ortográfico da língua portuguesa. 5a ed. Rio de Janeiro: Global; 2009.

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