

**ARAINY SUÉLY ANTUNES**

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NA LIBERAÇÃO DO  
PEPTÍDEO RELACIONADO COM GENE DA  
CALCITONINA (CGRP) E SUBSTÂNCIA P (SP) EM  
PELE DE RATOS.**

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

**SÃO PAULO**

**2014**

**ARAINY SUÉLY ANTUNES**

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NA LIBERAÇÃO DO  
PEPTÍDEO RELACIONADO COM GENE DA  
CALCITONINA (CGRP) E SUBSTÂNCIA P (SP) EM  
PELE DE RATOS.**

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

**ORIENTADOR: Prof. SILVIO EDUARDO DUAILIBI**

**Prof. BERNARDO SERGIO HOCHMAN**

*(in memorian)*

**COORIENTADORES: Prof. CARLOS EDUARDO PINFILDI**

**Prof. RICHARD ELOIN LIEBANO**

**SÃO PAULO**

**2014**

Antunes Arainy Suély.

**Estimulação elétrica na liberação do Peptídeo Relacionado com Gene da Calcitonina (CGRP) e Substancia P (SP) em pele de ratos./**Arainy Suély Antunes.—São Paulo, 2014.

xviii, 62f.

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

Electrical Stimulation Secretion in the Gene Related Peptide Calcitonin (CGRP), Substance P (SP) in skin of rats.

1. Neuropeptídeos. 2. Inflamação Neurogênica. 3. Pele. 4. Peptídeo Relacionado com Gene da Calcitonina. 5. Substancia P

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA  
TRANSLACIONAL**

**COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**

## DEDICATÓRIA

A Deus que me inspira e ajuda, que me deu uma vida cheia de saúde, uma família maravilhosa, amigos verdadeiros que me dão forças nos piores e melhores momentos. Aos mentores espirituais de luz, que me ajudam em todas as fases de minha vida.

Aos meus pais, Armando Antunes e Maria Antonia da Silva Antunes, que me deram o que dinheiro nenhum compra: caráter, dignidade, honestidade e educação, que sempre acreditaram em mim, que nos momentos de querer desistir me levantaram e me fizeram seguir em frente, mesmo nos momentos de tristeza por estar longe de casa, me encorajaram e nunca mediram esforços para realizar o sonho de seus filhos. A eles dedico meu amor de forma incondicional.

À minha irmã e melhor amiga, Arielly Mirelly Antunes, que amo incondicionalmente que me deu força quando precisei, que esteve sempre junto a mim seja nos momentos de descontração ou de tristezas, pelas palavras que só compartilhamos entre irmãs, me esforço cada vez mais para ela poder sentir orgulho e se espelhar.

Aos meus avôs já falecidos Theodolinda Martinelli Antunes, Benedito Antunes e Euclides Ferreira da Silva, que durante o tempo que passamos juntos me fizeram muito feliz, me ensinaram muitas coisas que levarei para todo sempre, mesmo não estando mais presente fisicamente tenho certeza que estarão torcendo sempre para as minhas concretizações profissionais.

À minha amiga Michele Akemi Nishioka que se fez presente desde a graduação. Saímos juntas de Catanduva para São Paulo, passando por muitas dificuldades, mas sempre uma apoiando a outra, esteve presente em todos os momentos de minha vida, tanto acadêmica quanto profissional,

por ter compartilhado e ajudado nas dificuldades dessa pesquisa, pelas trocas de conhecimentos, críticas, paciência e discussões que me engrandeceram e auxiliaram na busca desse objetivo e na minha vida pessoal.

À minha amiga Paola Karynne Pinheiro Monteiro, que desde o momento em que nos conhecemos esteve presente em minha vida, que sempre acreditou na minha capacidade me encorajando mesmo havendo pedras pelo caminho percorrido, pelas horas de estudos, pelo companheirismo, críticas e sugestões para o crescimento dessa pesquisa e pelo crescimento que me fez ter como pessoa.

Ao meu grande mestre, orientador, amigo, Bernardo Hochman que por uma força maior, nos deixou durante o nosso percurso, que estava sempre disponível a conversas, madrugadas, discutindo esse e muitos outros projetos, que me acolheu desde o primeiro dia do curso de aperfeiçoamento, tive a honra em aprender com ele na vida acadêmica, profissional e pessoal. Cada momento ao seu lado nunca será esquecido, desde as conversas até as brigas que só me fortaleceram a cada crítica dada. Deixou-nos algo que jamais será esquecido, o conhecimento, e proporcionou um elo de amizade eterna e companheirismo ao seu grupo de estudo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado nos momentos de dificuldades e felicidades, pela minha saúde e por me manter sempre no caminho sensato da vida.

Ao PROF. DR. **MIGUEL SABINO NETO**, CIRURGIÃO PLÁSTICO, COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), LIVRE DOCENTE E PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pela oportunidade de participar deste Programa de Pós- Graduação, o qual coordena com tanto empenho e sucesso;

Ao PROF. **BERNARDO SERGIO HOCHMAN RZESZETKOWSKI** (*in memoriam*), CIRURGIÃO PLÁSTICO, PROFESSOR AFILIADO DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA PLÁSTICA E ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, por todo conhecimento passado, pelas críticas, sugestões, discussões e correções que engrandeceram a cientificidade deste trabalho. Por acreditar na fisioterapia e incentivar a pesquisa científica nesta área, minha eterna gratidão;

Ao PROF. DR. **SILVIO EDUARDO DUAILIB**, DENTISTA, PROFESSOR AFILIADO NO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA NA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA. COORDENADOR DO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA TECIDUAL E BIOFABRICAÇÃO NO CENTRO DE TERAPIA CELULAR E MOLECULAR (CTCMOL) UNIFESP E ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, por todo conhecimento passado, pelo respeito e conselhos dados após o falecimento do Prof. Bernardo, pelas críticas, sugestões, discussões em grupos e correções que engrandeceram a cientificidade deste trabalho;

Ao PROF. **CARLOS EDUARDO PINFILDI**, FISIOTERAPEUTA, PROFESSOR ADJUNTO E ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIFESP – CAMPUS BAIXADA SANTISTA E COORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP – CAMPUS SÃO PAULO, pela grande amizade construída desde as aulas dadas na graduação, por todo companheirismo, por transmitir a segurança e tranquilidade necessárias para lidar com as dificuldades do estudo e, principalmente, pelo exemplo profissional. Um grande profissional, humilde e disponível para compartilhar seus ensinamentos. Agradeço imensamente pelas sugestões, críticas e correções feitas para o aprimoramento dessa tese;

Ao PROF. **RICHARD ELOIN LIEBANO**, FISIOTERAPEUTA, COORIENTADOR E PROFESSOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, por toda dedicação, pelas correções e sugestões feitas para engrandecer o trabalho, sempre com muito comprometimento e atenção. Agradeço a oportunidade de estudar e aprender com alguém tão renomado na profissão, com humildade, carisma, com tanto conhecimento e disposição para ensinar. Agradeço imensamente pelas críticas, correções e sugestões para o aprimoramento da tese;



À Prof.<sup>a</sup> **FABIANNE FURTADO**, FISIOTERAPEUTA, COORIENTADORA E PROFESSORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pelas correções, críticas e sugestões feitas para engrandecer o trabalho, sempre com muito comprometimento e atenção. Agradeço a oportunidade com tanto conhecimento e disposição para ensinar;

Ao Prof. Dr. **GERSON CHADI**, PROFESSOR TITULAR DO DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA, CHEFE DO LABORATÓRIO DE FISIOPATOLOGIA NEUROCIRÚRGICA (LIM-45) DA FMUSP, por ter dado amplo suporte científico e laboratorial para a realização desse trabalho, transpondo barreiras técnicas e financeiras;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **JESSICA MAXIMINO**, PESQUISADORA CIENTÍFICA DO LABORATÓRIO DE FISIOPATOLOGIA NEUROCIRÚRGICA (LIM-45) DA FMUSP, pelo excelente trabalho laboratorial, apoio científico e grande contribuição na realização desse trabalho;

Aos **DEMAIS DOCENTES** DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pelas críticas e sugestões que engrandeceram este estudo;

À **MICHELE AKEMI NISHIOKA**, FISIOTERAPEUTA, MESTRE PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pela paciência ao longo do tempo, dedicação em todas as horas, pelos auxílios em todas as tarefas ao longo do percurso. Agradeço pelas críticas, discussões, feitas para o aprimoramento deste estudo e pelo crescimento pessoal;

**À PAOLA KARYNNE PINHEIRO MONTEIRO**, FISIOTERAPEUTA, ALUNA DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pelo companheirismo e dedicação em todas as horas, pela parceria no estágio docente e auxílio nas mais diversas tarefas e desafios destes anos. Agradeço todas as críticas, sugestões e discussões feitas para o crescimento deste estudo, mas, sobretudo, pela verdadeira amizade construída;

**ÀS FISIOTERAPEUTAS SILVILENA BONATI, ÉRIKA RAMPAZO, ROBERTA FOLHA, ÉRICA CALCAGNO**, AOS MÉDICOS **JOSÉ OCTÁVIO, GUILHERME LAPIN, PAULO QUIEREGATTO**, MESTRES PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pela convivência durante todo o percurso, pela disponibilidade em colaborar durante todos os momentos, pelas críticas, sugestões e discussões que engrandeceram o estudo, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos **DEMAIS COLEGAS PÓS-GRADUANDOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP**, pelas críticas e sugestões feitas ao longo destes anos;

**À SANDRA DA SILVA, MARTA DOS REIS E SILVANA DE ASSIS**, SECRETÁRIAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pela paciência, ajuda e dedicação com que me auxiliaram no programa de pós-graduação;

Ao SR. **ANTÔNIO TODRIGUES DOS SANTOS**, BIOTERISTA DO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIFESP, pelas orientações e cuidados prestados aos animais durante a execução do experimento.

Os meus **Sinceros Agradecimentos** a todos que, direta ou indiretamente, tornaram esse trabalho possível.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**Ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA  
TRANSLACIONAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
por disponibilizar a bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento  
de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã.”

Chico Xavier

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	iv
AGRADECIMENTOS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xvii
RESUMO .....	xx
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	5
3. LITERATURA .....	7
4. MÉTODOS .....	14
5. RESULTADOS .....	26
6. DISCUSSÃO .....	29
7. CONCLUSÕES .....	38
8. REFERÊNCIAS .....	40
NORMAS ADOTADAS .....	47
ABSTRACT .....	49
APÊNDICES .....	50
ANEXOS .....	59
FONTES CONSULTADAS .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de Substância P (SP) de acordo com a polaridade do eletrodo.....	27
Tabela 2. Quantificação de Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (CGRP) de 15 kDa acordo com a polaridade do eletrodo.....	27
Tabela 3. Quantificação de Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (CGRP) de 5 kDa acordo com a polaridade do eletrodo.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
°C	Graus Celsius
CEDEME	Centro de desenvolvimento de modelos experimentais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
BIREME	Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
EPM	Escola Paulista de Medicina
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
IN	Inflamação Neurogênica
NKA	Neurokinin A
NP's	Neuropeptídeos
NPY	Neuropeptide Y
SP	Substance P
VIP	Vasoactive Intestinal Active
WB	Western Blot Analysis ou Western blotting
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta
et al	E colaboradores
$\mu$ A	Microampere
$\mu$ S	Microsssegundo
F	Frequência
Hz	Hertz (Unidade de Frequência)



g	Gramas
°	Graus
J/cm <sup>2</sup>	Joules por centímetro quadrado
J	Joules
Kg	Kilograma
LLLT	Low Level Laser Therapy (Terapia com Laser de baixa intensidade)
LED	<i>Light Emitting Diode</i> - Diodo Emissor de Luz
mA	Miliampere
ms	Milissegundo
MHz	Megahertz
R	Intervalo de pulsos
t	Tempo
V	Volts
I	Intensidade
TENS	<i>Transcutaneous Electrical Nerve Stimulator</i> (Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea)
<	menor
≤	Menor ou Igual
±	Mais ou Menos
DP	Desvio Padrão
m <sup>2</sup>	Metros quadrados
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma de massa corporal
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mW	Miliwatt
n	Número da amostra

nm	Nanômetro
%	Porcentagem
s	Segundo
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> - Fator de crescimento endotelial vascular
W/cm <sup>2</sup>	Watt por centímetro ao quadrado
NK-1	Neuroquinina 1
pH	Potencial Hidrogeniônico
HTT	hipersensibilidade do tipo tardio
PO	Pós operatório
mg/kg	Miligrama por Kilo
i.v	Intra Venoso
DRG	Raiz do Ganglio Dorsal
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono

## RESUMO

**Introdução:** A disfunção na liberação de neuropeptídeos acarreta alterações na pele, podendo gerar distúrbios no processo cicatricial e/ou afecções cutâneas. Sendo assim, a liberação de neuropeptídeos é estudada na literatura, relacionando a utilização de agentes eletrofísicos. **Objetivo:** Investigar o efeito da estimulação elétrica na liberação de neuropeptídeos SP e CGRP em pele de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 28 animais distribuídos em 4 grupos, Grupo Controle (GC): as amostras foram coletadas após 60 minutos da tricotomia sem estímulo elétrico; Grupo Sham (GS): após 60min da tricotomia foram colocadas as placas de eletrodos com esponja umedecida com cloreto de sódio 0,9% e sobreposto na linha mediana dorsal e dispersivo na região ventral, com o aparelho desligado por 30minutos; Grupo Estimulação Elétrica com Polo Positivo (GPP): após 60 minutos da tricotomia, foi realizada a estimulação elétrica sobre a linha mediana dorsal com polaridade Positiva e o no Grupo Estimulação Elétrica com polaridade Negativa (GPN): os mesmos parâmetros utilizados acima, com a mudança, onde o polo negativo passou para linha mediana dorsal. Ao término da estimulação elétrica, foram coletadas amostras de pele, submetidas ao Western blotting para análise dos neuropeptídeos CGRP e SP. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Análise Variância (ANOVA) para identificar a diferença entre os grupos. **Resultado:** Não causou diferença significativa na liberação de CGRP e SP na pele de rato. **Conclusão:** A estimulação elétrica ultraexcitante não influenciou na liberação de neuropeptídeos, CGRP e SP, em pele de ratos.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A Inflamação Neurogênica (IN) é um processo inflamatório periférico que se inicia quando há um estímulo exógeno (calor, lesões tóxicas, agentes irritantes, alérgenos, luz ultravioleta e agentes microbianos) ou endógeno (mudanças de pH, citocinas, cininas, histamina, proteases, neurotransmissores, hormônios e estresse) (ROOSTERMAN *et al.* 2006). Este processo também é considerado um dos primeiros eventos do processo de cicatrização, diante de um estímulo nociceptivo da pele (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2009).

A inflamação neurogênica ocorre a partir da liberação de neuropeptídeos, presentes na pele, que são considerados como neurotransmissores especiais, sintetizados primordialmente nos neurônios sensitivos do gânglio dorsal (WATSON *et al.*, 2002; HOCHMAN *et al.*, 2014) e são regulados pela ativação das terminações nervosas nociceptivas C e fibras A- $\delta$  (WEIDNER *et al.*, 2000; HOCHMAN *et al.*, 2014).

O aumento ou disfunção destes neuropeptídeos pode acarretar em alterações na pele, gerando perturbações no processo cicatricial e nas afecções cutâneas, como dermatites de contato (TORII *et al.*, 1997; PAVLOVIC *et al.*, 2011), dermatite atópica (SCHOLZEN *et al.*, 1998; JARVIKALLIO *et al.*, 2003; FUJII, SENGOKU, TAKAKURA, 2010; MISERY, 2011), reações de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT), psoríase (KARANTH *et al.*, 1989; GLINSKI *et al.*, 1994; ZEGARSKA, LELINSKA, TYRAKOWSKI, 2006) e cicatrizes fibroproliferativas, como

o queiloide e cicatriz hipertrófica (TREDGET *et al.*, 1997; BOCK & MROWIETZ, 2002; HOCHMAN & FERREIRA, 2007; OGAWA, 2008; AKAISHI *et al.*, 2008).

Para o tratamento clínico destas doenças, encontra-se na literatura a utilização de agentes químicos, como a capsaïcina e a mostarda nitrogenada que atuam na despolarização das fibras C e A- $\delta$ . Após o uso contínuo desses agentes, o local apresenta diminuição de sensibilidade e bloqueio de estímulos dolorosos, resultando em dessensibilização e taquifilaxia dos neuropeptídeos, principalmente, a Substância P (*Substance P* ou SP) e/ou Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (*Calcitonin Gene Related Peptide* ou CGRP) e o Peptídeo Intestinal Vasoativo (*Vasoactive Intestinal Peptide* ou VIP) (JANCSO *et al.*, 1967; BIRO *et al.*, 1997; CATERINA *et al.*, 1997, KALIL-GASPAR, 2003). O uso contínuo destes agentes químicos promove uma interrupção reversível nas fibras nervosas sensoriais em estudos experimentais (CRAFT & PORRECA, 1992; ROBBINS *et al.*, 1998; CANNON & WU, 1998; SZALLASI & BLUMBERG, 1999). Entretanto, esses agentes químicos provocam uma sensação de queimação, causando efeitos indesejáveis e desconfortos aos pacientes (KOLTZENBURG *et al.*, 1992; GIBBONS *et al.*, 2010).

Devido a estes fatores adversos dos agentes químicos, diversas pesquisas foram realizadas com o intuito de encontrar outros tratamentos exógenos, para melhorar os aspectos clínicos de doenças cutâneas e tentar biomodular uma possível cicatrização. Dentre eles, foram encontrados estudos experimentais, utilizando agentes eletrofísicos na liberação de neuropeptídeos, como a Eletroestimulação Nervosa Transcutânea (TENS) e a fototerapia de baixa intensidade. (TANAKA & BARRON, 2001; HOCHMAN *et al.*, 2014)

ROKUGO *et al.* (2002) utilizaram a TENS (50Hz; 50V) em ratos e observaram uma redução de SP, com estímulos direto no gânglio da raiz

dorsal e mostraram efeito analgésico pela supressão da atividade das fibras C nos nervos periféricos. Já SNYDER *et al.* (2002) utilizaram o laser vermelho de baixa intensidade (633nm), com uma energia total de 45J, durante 11 dias consecutivos, após secção do nervo facial para avaliar a liberação de CGRP em uma possível regeneração das fibras nervosas lesionadas em ratos, e obtiveram um aumento de RNAm CGRP e da transecção houve uma sobrevivência neuronal a partir de 6-9 meses.

Recentemente, no estudo de HOCHMAN *et al.* (2014), aplicaram em pele íntegra a fototerapia de baixa intensidade, a fim de verificar a liberação de neuropeptídeos CGRP e SP, sendo que, neste estudo, obtiveram um aumento significativo de SP somente no espectro infravermelho (808nm), em uma única aplicação.

Sendo assim, o estudo acima citado foi o único encontrado que verificou a liberação de neuropeptídeos diretamente na pele através de um agente eletrofísico, e, esta liberação, se pudesse ser modulada, poderia se tornar uma alternativa em tratamentos clínicos de distúrbios de pele. Desta maneira, fez-se necessário avaliar se há liberação de neuropeptídeos com a utilização de outros tipos de agentes eletrofísicos.

## **OBJETIVO**



## **2. OBJETIVO**

Investigar o efeito da estimulação elétrica ultraexcitante na secreção de neuropeptídeos em pele de ratos.

## **LITERATURA**

### 3. LITERATURA

Este capítulo foi dividido em dois tópicos, sendo que no primeiro foram descritos estudos que utilizaram o mesmo tipo de corrente do presente estudo e, o segundo, com estudos utilizando agentes eletrofísicos na liberação de neuropeptídeos Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e a Substância P (SP).

#### 3.1 Estimulação elétrica com corrente monofásica pulsada retangular na cicatrização da pele

WEISS *et al.* (1990) compararam a espessura das cicatrizes e formação de cicatrizes hipertróficas no local doador de enxerto de pele, em quatro pacientes. Cada paciente foi submetido a uma coleta de tecido do enxerto cutâneo laminar na região anterior da coxa em ambos os membros inferiores. Um dos enxertos foi submetido à estimulação elétrica, enquanto o outro funcionou como controle. A estimulação elétrica foi iniciada no dia da cirurgia, sendo 2 sessões diárias, cada uma, com duração de 30 minutos, durante 7 dias. Foi utilizada uma corrente pulsada, monofásica de 128 Hz por segundo, com duração de pulso de 150  $\mu$ s, uma intensidade de 35 mA e com o eletrodo positivo aplicado sob o enxerto. Os dados sugeriram que as cicatrizes submetidas ao tratamento com estimulação elétrica estavam mais macias e achatadas, além disso, foi obtido um menor número de mastócitos em relação à cicatriz controle. Os autores sugeriram que o efeito da estimulação elétrica sob estas condições pode diminuir a fibrose, possivelmente por meio da redução no número de mastócitos.

REICH *et al.* (1991) avaliaram a cicatrização cutânea de quatro porcos após a estimulação elétrica, com uma corrente pulsada monofásica, com intensidade de 35mA, e 128Hz, pulsos de 140µs, por 30 minutos, sendo que o eletrodo de polaridade positiva foi aplicado na região da lesão. Nos resultados foi obtida uma diminuição na quantidade de mastócitos, não foi apresentada, porém, qualquer evidência na degranulação de mastócitos. Uma das hipóteses dos autores foi que o estímulo elétrico positivo diminui a vascularização na lesão, reduzindo a quantidade de mastócitos, ou poderia estar relacionada com a concentração dos íons, pois, neste estudo, o sódio foi o condutor e os mastócitos são sensíveis à flutuação de cátion. O alto influxo de cátion, como o sódio, pode reduzir a concentração de cálcio, o que retardaria, conseqüentemente, a proliferação e migração de mastócitos.

MEHMANDOUST *et al.* (2007) compararam os efeitos da estimulação elétrica com polaridade positiva e negativa na cicatrização de feridas em 42 *guinea pigs*, distribuídos em 6 grupos (sendo 2 grupos controle, um de 14 e outro de 21 dias; 2 grupos com polaridade positiva nos primeiros 3 dias, sendo um de 14 e outro de 21 dias e 2 grupos com polaridade negativa nos primeiros 3 dias, sendo um grupo de 14 e o outro de 21 dias). A corrente aplicada foi de 300 a 600 microamperes, 80pps, e de 0,3ms, em um tempo de duração de 60 minutos, uma vez ao dia. O eletrodo utilizado na lesão foi aplicado nos primeiros três dias e outro eletrodo nos demais dias, dependendo do grupo que pertenciam. Os resultados indicaram que as estimulações, em ambos os eletrodos, aumentaram a taxa de cicatrização das feridas. A força tênsil aumentou com o eletrodo positivo comparado com o negativo e do grupo controle no final 14º dia. Neste estudo foi observado que a estimulação elétrica,

independente da polaridade, obteve benefícios no processo de cicatrização. Para se compreender melhor os efeitos dos mecanismos da estimulação elétrica na cicatrização de feridas, o autor sugere a avaliação do potencial elétrico no local da ferida durante todo o período de cicatrização.

BORBA *et al*, (2011) avaliaram os efeitos da estimulação elétrica pré-operatória sobre a cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Utilizaram 40 ratos machos wistars distribuídos em 2 grupos: grupo controle que foi submetido a uma incisão no dorso dos animais e outro grupo experimental submetido a estimulação elétrica no período pré-operatório seguido de uma incisão cutânea. Foi utilizada a corrente pulsada monofásica retangular, com uma frequência de 7,7Hz e intensidade de 8mA, durante 30 minutos, com o eletrodo positivo no dorso dos animais. Foram utilizadas esponjas umedecidas com soro fisiológico sob os eletrodos de cobre, fixadas diretamente na pele da região dorsal do animal e, o eletrodo negativo, na parede abdominal. Foi realizada apenas uma aplicação da estimulação elétrica e em seguida foi realizada uma incisão de 7 cm no dorso do animal. As amostras de pele foram obtidas no 7º e 14º pós-operatório (PO). Nos resultados verificaram que o número de vasos neoformados, fibroblastos e fibras colágenas tipo III, no grupo estimulação elétrica no 7º PO, foram maiores que o do grupo controle, já no 14º PO não houve resultados significantes. Os autores concluíram que a estimulação elétrica no pré-operatório com polaridade positiva afeta positivamente a proliferação de fibroblastos e angiogênese.

### **3.2 Recursos eletrofísicos na liberação de neuropeptídeos CGRP e SP.**

#### **3.2.1 Na raiz do Gânglio Dorsal**

TANAKA *et al.* (2001) realizaram um estudo com estimulação elétrica direto na medula espinal em ratos Sprague-Dawley. Foram utilizados os parâmetros de 50Hz, 0,2ms e intensidades de estímulos 30, 60 ou 90% do limiar motor. O eletrodo unipolar foi colocado no dorso do rato dos lados esquerdo e direito de superfície subdural com 10 minutos decorridos entre as aplicações da medula espinal. O grupo 1 (9 animais) foi submetido a estimulação elétrica, seguido de hexametônio injetável (10 mg/kg, i.v), CGRP-(8-37) (2,6 mg/kg, i.v) e os efeitos foram medidos após cada administração. No grupo 2 (5 animais) foi utilizada a corrente elétrica para excluir uma possível interação de hexametônio injetável com CGRP-(8-37). O fluxo sanguíneo na pata foi gravado com laser Doppler, a pata direita mostrou que estimulação elétrica aos 30, 60 e 90% do limiar motor não aumentou o fluxo sanguíneo cutâneo após hexametônio injetável e CGRP-(8-37) administrados em conjunto. Os resultados indicaram que o CGRP causou uma vasodilatação, sugerindo que, na estimulação elétrica experimental, em todas as intensidades testadas (sendo elas abaixo do limiar motor) produziu-se vasodilatação por sentido antidromico, ativando nervos sensoriais para causar a liberação local de CGRP.

ROKUGO *et al.* (2002) verificaram o efeito da estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS), com estímulo diretamente no gânglio da raiz dorsal (DRG) e no corno dorsal da medula espinal em ratos Sprague-Dawley. Em todos os animais o nervo ciático direito foi ligado a um eletrodo de gancho para a estimulação e a pata inferior direita ligada a um eletrodo de anel. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: controle, formalina, e estimulação TENS com formalina. Foi utilizado 50µl(microlitros) de formalina a 5% injetado na pata direita. Simultâneo a esse processo, a estimulação elétrica foi utilizada com parâmetros de 50Hz,

50V durante 5 minutos, com aplicação através do eletrodo de anel. Logo após a estimulação, os componentes do nervo ciático foram removidos da quarta à sexta vértebra lombar e parte da medula espinal. Os resultados mostraram que os níveis de SP na DRG no grupo formalina e no grupo TENS, foram significativamente reduzidos quando comparados com o grupo de estimulação e formalina. O estudo concluiu que a estimulação elétrica reduziu a produção de SP no DRG, e mostrou efeitos analgésicos por nocicepção suprimindo a via fibra-C nos nervos periféricos.

### 3.2.2 Na Pele

HOCHMAN *et al.* (2014) investigaram o efeito da Terapia Laser de Baixa Intensidade (LLLT, *Low Level Laser Therapy*) e o *Light Emitting Diode* (LED) na liberação do CGRP e SP na pele íntegra de ratos. Foram distribuídos aleatoriamente 40 ratos em 5 grupos com 8 animais cada: Grupo Controle; Grupo LED Azul (470 nm, 350 mW de potência); Grupo LED vermelho (660 nm, 350 mW de potência); Grupo Laser Vermelho (660 nm, 100 mW de potência) e Grupo Laser Infravermelho (808 nm, potência de 100 mW). A pele dos animais do grupo experimental foi irradiada utilizando a técnica de contato pontual, com uma energia total de 40 J, dose única padronizada em um ponto na região dorsal. Após 14 minutos de irradiação, as amostras de pele foram recolhidas para quantificação de CGRP e SP através da análise de transferência de Western Blot. Os autores observaram a presença de SP no Grupo Laser Infravermelho ( $p = 0,01$ ), porém, não houve diferença no neuropeptídeo CGRP. Portanto, a LLLT no espectro infravermelho (808 nm) aumentou a secreção do neuropeptídeo SP na pele íntegra de ratos.

RAYMUNDO *et al.* (2014) investigaram a injeção subcutânea de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na liberação de neuropeptídeos CGRP e SP, na pele de ratos. Utilizaram 56 ratos Wistar-EPM, distribuídos em 2 grupos: um para análise de CGRP, outro para análise SP. Cada grupo foi distribuído em quatro subgrupos com sete animais: controle (Cont); controle com agulha (ContNd); injeção de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>Inj) e injeção de ar atmosférico (AirInj). Foi realizada apenas uma aplicação de tratamento. As análises de amostras de pele parcial foram conduzidas pelo método Western Blot (WB). Os autores observaram uma diminuição na quantidade de neuropeptídeos SP nos subgrupos CO<sub>2</sub>Inj e AirInj. Da mesma forma que, no grupo de CGRP, houve uma diminuição na quantidade de neuropeptídeos pró-CGRP (15 kDa) em subgrupos CO<sub>2</sub>Inj e AirInj; No entanto, não houve diminuição na quantidade de CGRP (5 kDa) em quaisquer subgrupos. A injeção subcutânea de CO<sub>2</sub> e ar atmosférico diminuiu a quantidade de SP e pró-CGRP (15 kDa) em pele de ratos.



## **MÉTODOS**

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Desenho de Pesquisa

O presente estudo foi experimental, primário, intervencional, transversal, analítico, controlado, aleatorizado e unicego. Os experimentos tiveram início após liberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP) 0641/11. (Apêndice 1)

### 4.2 Amostra

Para realização deste estudo foram utilizados 28 ratos (*Rattus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), da linhagem Wistar EPM-1 adultos, machos, com 8 semanas de idade e peso entre 270g e 350g, oriundos do biotério central do Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP.

Os animais permaneceram no biotério, em gaiolas individuais de polipropileno, com tampa metálica própria para dispor o recipiente com água e ração comercial, a serem consumidas *ad libitum*. O ambiente foi mantido, por meio de dispositivos eletrônicos, em temperatura constante de 22°C, em manutenção do grau de umidade e em ciclo claro-escuro de 12 horas.

### 4.3 Delineamento experimental

No presente estudo, os 28 ratos foram distribuídos em 4 grupos, contendo 7 ratos cada grupo (Figura 1). Os animais foram distribuídos aleatoriamente pelo site ([www.randomization.com](http://www.randomization.com)) (Apêndice 2).

Grupo Controle (GC): Os animais foram submetidos a tricotomia no dorso e, após 1 hora, foram retiradas as amostras;

Grupo Sham (GS): Os animais foram submetidos a tricotomia, e após 1 hora, os eletrodos foram dispostos, um na linha mediana dorsal e o outro na linha mediana ventral, com aparelho desligado, durante 30 minutos, após 1 minuto de estimulação foram retiradas as amostras;

Grupo Polo Positivo (GPP): Os animais foram submetidos a tricotomia e, após 1 hora, foi realizada a estimulação elétrica por 30 minutos com polaridade positiva disposta sobre a linha mediana dorsal, e o dispersivo com polaridade negativa sobre a linha mediana ventral. Após um minuto, foram retiradas as amostras de pele.

Grupo Polo Negativo (GPN): Os animais foram submetidos a tricotomia e, após 1 hora, foi realizada a estimulação elétrica por 30 minutos com polaridade negativa disposta sobre a linha mediana dorsal, e o dispersivo com polaridade positiva sobre a linha mediana ventral, após um minuto, foram retiradas as amostras de pele.

Todos animais foram tricotomizados na região dorsal, e foi realizada somente uma aplicação.

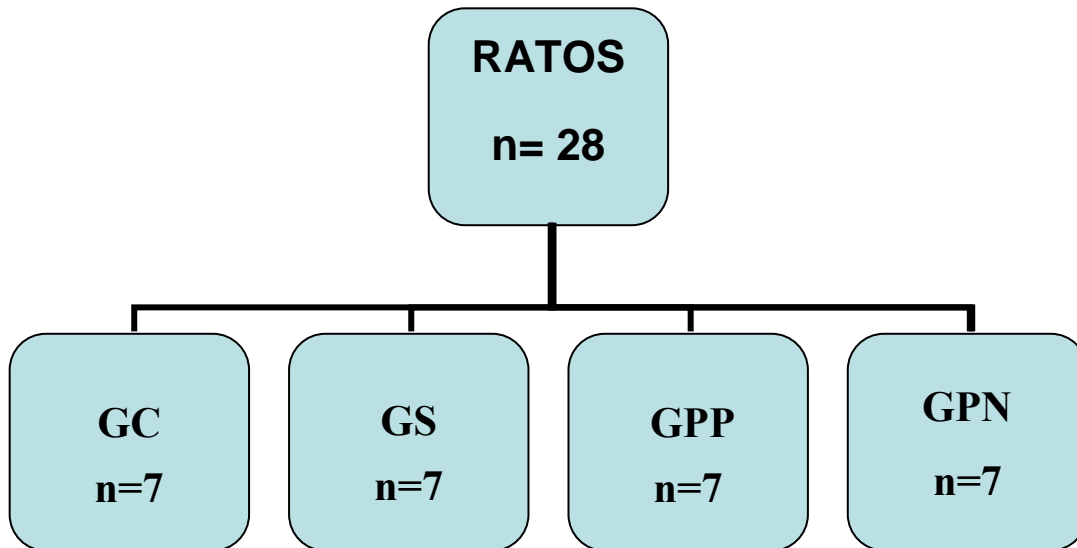


Figura1–Fluxograma da distribuição dos grupos.

## 4.4 Procedimentos Experimentais

### 4.4.1 Anestesia

No dia da realização da estimulação elétrica, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular, no músculo gastrocnêmio direito com cloridrato de Quetamina (100mg/kg) e cloridrato de Xilazina (50mg/kg).

Após 3 minutos da indução anestésica, foi realizada a tricotomia máxima com máquina cortadora de pelos (WAHL<sup>®</sup>) no dorso do rato com uma área de 8x4cm (Anexo 1).

### 4.4.2 Aplicação da Estimulação Elétrica

Foi utilizado um equipamento gerador universal de correntes da marca Quark<sup>®</sup>, (Piracicaba – São Paulo) modelo Dualpex<sup>®</sup> 071, digital, controlado por microprocessador, com um canal de saída destinado a corrente pulsada monofásica retangular, amplitude em miliamper (mA) (Figura 2).

O aparelho foi aferido antes do início da fase experimental e ao término da mesma, em instituição credenciada (Apêndice 3).

A estimulação elétrica foi utilizada com uma frequência de 150Hz, duração de pulso de 400 $\mu$ s, amplitude de 8mA, durante 30 minutos. No mesmo dia do estímulo elétrico, ao término de 1 minuto desse período, foi realizada a retirada da amostra de pele no dorso dos ratos.

A amplitude da corrente iniciou com 2mA, e a cada 3 minutos foi aumentado mais 2mA, até chegar a amplitude máxima de 8mA em um total de tempo de 12 minutos, os 18 minutos restantes foram mantidos com uma amplitude total de 8mA, sem alterações.



Figura 2 – Aparelho de eletroestimulação

#### 4.4.3 Posicionamento dos eletrodos

Foram posicionados eletrodos de cobre, com dimensões de 5,0 x 3,0 cm em esponja de celulose umedecida em solução Cloreto de Sódio 0,9%, em uma quantidade de 10ml do mesmo tamanho dos eletrodos. O conjunto eletrodo-esponja foi fixado por meio de fita elástica com velcro, os eletrodos foram utilizados de acordo com a polaridade a qual o grupo pertencia (Figura 3a e 3b).



Figura 3a - Aplicação da polaridade positiva estimulada no dorso do GPP



Figura 3b - Aplicação do dispersivo de polaridade negativa no abdome do GPP.

#### 4.5 Exérese da amostra

Após um minuto de aplicação da estimulação elétrica, os animais foram submetidos à morte assistida indolor por meio de hiperdosagem anestésica e secção dos vasos cervicais, para a retirada das amostras de pele.

Em seguida, o animal foi firmemente segurado nas suas extremidades caudal e cranial, de modo a manter a pele do dorso fixada, expondo a região estimulada (Figura 5).

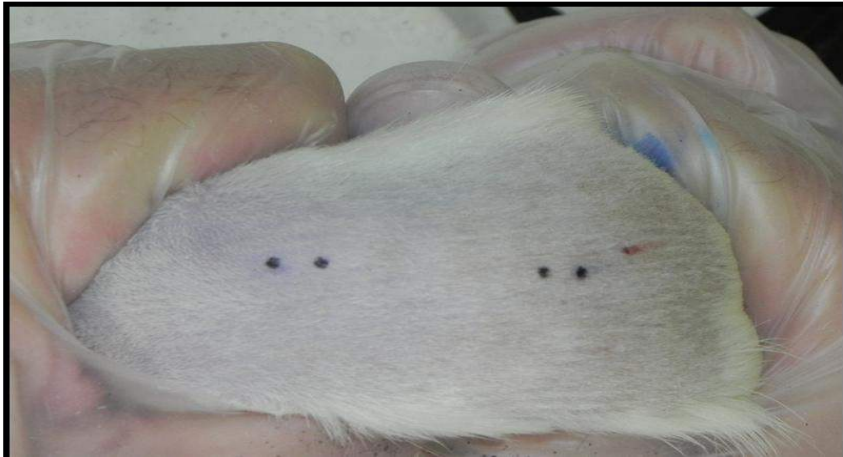


Figura. 5 – Forma de imobilizar o animal para a retirada da amostra.

Logo após, foi utilizado um dermatômo elétrico (Padgett®) (Figura 6), pelo qual foi retirada uma peça de pele parcial do dorso do rato, com espessura de 500 $\mu$ m, que continha a marcação do quadrante da placa de eletrodo em seu centro, com no mínimo 1cm das suas margens (Figura 7a e 7b).



Figura 6 – Dermatômo elétrico no dorso do animal, para retirada da amostra. Na seta demonstra a região da estimulação elétrica.

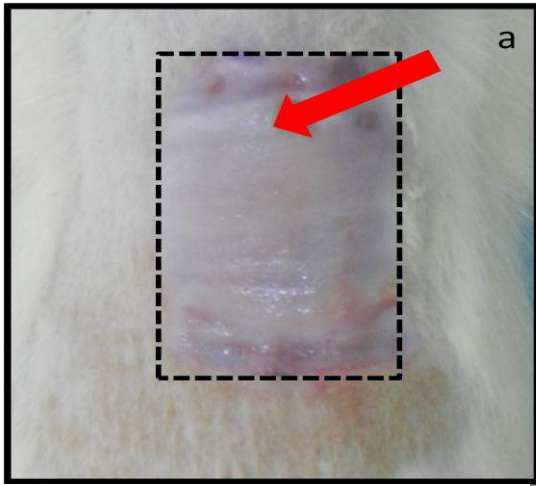


Figura 7a - Dorso do rato após exérese de pele.



Figura 7b - amostra de pele após retirada pelo dermatômo elétrico.

Finalmente, para remoção da amostra final, foi utilizado um *punch* cutâneo de 8mm (Figura 8) no centro da peça de pele, sendo que este foi dividido em 2 fragmentos de pele em “meia-lua”, com espessura constante e formato idêntico (Figura 9). Esses 2 fragmentos, referentes a cada rato, foram definidos como amostra, sendo que um fragmento foi utilizado para a análise de CGRP e outro para SP.



Figura 8 - Punch cutâneo de 8 mm.



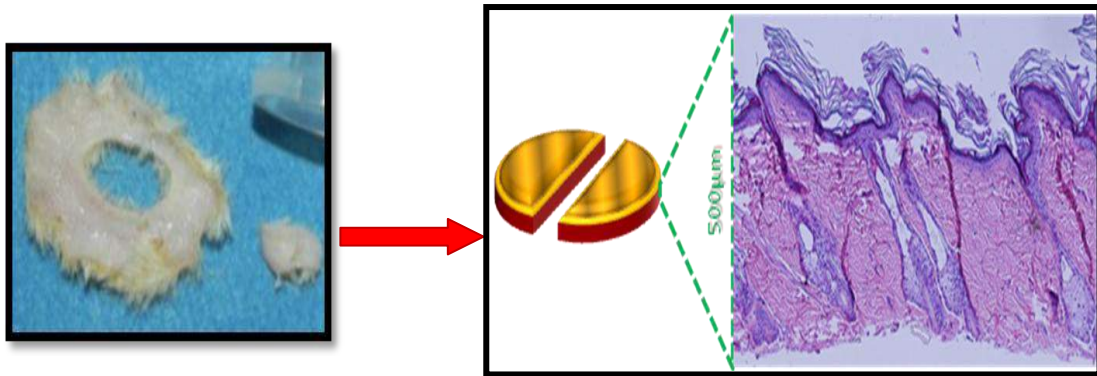


Figura 9 – Retirada da amostra em 2 fragmentos de pele parcial constantes em forma e espessura.

#### 4.5.1 Análise por Western Blotting (WB)

O método de WB foi utilizado para quantificação de SP e CGRP nas amostras retiradas. O *kit* para avaliação de CGRP provê anticorpos para pró-CGRP e CGRP (forma ativa) e ambos foram testados. No entanto, foi necessário o desenvolvimento de modificações laboratoriais pioneiras nas técnicas clássicas de WB para suplantar certas dificuldades técnicas. O desenvolvimento do WB para quantificar neuropeptídeos em pele foi realizado no Laboratório de Neurocirurgia Experimental - LIM 45 da Universidade de São Paulo, USP (Coordenador: Prof. Dr. Gerson Chadi).

As amostras retiradas de cada animal foram homogeneizadas em solução tampão para extração da proteína total. Primeiramente, as amostras foram lisadas e homogeneizadas, com auxílio de um homogeneizador, utilizando-se 350µL de tampão de lise constituído de NP40 (1%), deoxicolato de sódio (0,5%), SDS (1%), EDTA (1mmol/L), EGTA (1mmol/L) e coquetel inibidor de proteases (Sigma, 1%) em PBS (Ph 7,4).

Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi obtido e a quantidade de proteína foi determinada usando o método de Bradford (BRADFORD,1976).

As amostras foram diluídas em tampão de lise a fim de se obter quantidade de 60µg em 25µL, que foram desnaturadas à 100°C durante 3 minutos e aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida a 12% para fracionamento. Em um dos poços da placa, foram aplicados 5µL de marcador de peso molecular (Kaleidoscope, pré-corado, Bio-Rad, EUA). O tampão de corrida foi preparado com Trizma® (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e SDS (0,1%), as proteínas foram separadas através de aplicação de 100 volts durante 1 hora e 30 minutos. Após a “corrida”, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Bio-Rad) utilizando tampão de transferência gelado contendo Trizma® (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e metanol (10%) durante 1 hora a 100V.

A membrana foi, então, incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados, durante 15 minutos à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi constituída à base de leite (10%) em TBS-T (tampão Trizma®-salina com *Tween-20* a 0,05%). Após este bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anticorpo policlonal anti-SP feito em cabra (1/100, Santa Cruz) e anticorpo policlonal anti-CGRP feito em coelho (1/300, Sigma) diluídos, todos, em leite (3%) em TBS-T, durante 24 horas a 4°C sob agitação constante. Após esta incubação, as membranas foram lavadas por duas vezes em TBS-T por dez minutos e incubadas com os anticorpos secundários anticabra (1/2000, GE) e anticoelho (1/10.000, GE) conjugados a uma peroxidase (HRP-conjugado), diluídos em leite (3%) em TBS-T e incubados durante 1 hora em temperatura ambiente.

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas por duas vezes com TBS-T e uma vez com TBS durante dez minutos, cada. A reação aconteceu através de incubação com reagente quimioluminescente (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, ECL kit, Perkinelmer, EUA) durante exatamente um minuto. As membranas foram expostas a filme sensível a quimioluminescência (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) durante o período de 30 segundos a cinco minutos (segundo orientação do fabricante) para cada anticorpo, e revelados.

Após revelação dos filmes, as membranas foram lavadas e submetidas à nova marcação com anticorpo contra a beta-actina, uma proteína, a fim de normalizar os valores proteicos. Para isso, as membranas foram incubadas com anticorpo primário contra  $\beta$ III-tubulin diluído a 1:30.000 (Sigma, EUA) em TBS-T contendo BSA a 1% durante uma hora em temperatura ambiente, seguida de duas lavagens com TBS-T (por dez minutos, cada) e de incubação (por 45 minutos à temperatura ambiente) com o anticorpo secundário (anticoelho, HRP conjugado, Amersham) diluído a 1/10.000 em TBS-T com BSA 1%. Após estas incubações, as membranas foram lavadas como descrito anteriormente, seguidas da reação e revelação do filme. Os filmes foram quantificados através de densitometria óptica usando um sistema de análise de imagens (CHADI *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2011).

#### 4.6 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram analisados e comparados. Os resultados foram expressados em média  $\pm$  erro padrão ( $M \pm EP$ ).

Para verificar as diferenças significantes na liberação de neuropeptídeos CGRP e SP entre os quatro grupos do estudo foi utilizado o Teste ANOVA. Tendo sido fixado em 0,05, ou 5%, o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

A aplicação de 30 minutos da estimulação elétrica não causou diferença na liberação de Substância P (SP) e Peptídeo Relacionado com Gene de Calcitonina (CGRP) de 5 e 15 kDa entre os grupos estimulados (Eletrodo negativo e Eletrodo positivo) em relação aos não-estimulados (Sham e Controle) (Tabelas de 1 a 3).

Tabela 1 - Quantificação de Substância P (SP) de acordo com a polaridade do eletrodo

Grupo	Média <sup>†</sup>	Desvio-padrão	Min-Máx	N (amostra)	p (Anova)
Sham	6,98	2,29	3,40 - 9,98	7	0,33
Controle	6,64	1,40	4,65 - 8,28	7	
Eletrodo negativo (anodo)	5,34	1,95	2,16 - 7,17	7	
Eletrodo positivo (catodo)	5,49	2,15	2,08 - 8,57	7	

<sup>†</sup> Unidades arbitrárias determinadas pela análise de Western blot

Tabela 2 - Quantificação de Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (CGRP) de 15 kDa de acordo com cada polaridade do eletrodo

Grupo	Média <sup>†</sup>	Desvio-padrão	Min-Máx	N (amostra)	p (Anova)
Sham	31,81	8,16	21,68 - 43,57	7	0,57
Controle	30,67	6,55	24,32 - 40,15	7	
Eletrodo negativo (anodo)	25,92	7,68	15,98 - 40,43	7	
Eletrodo positivo (catodo)	31,40	6,98	22,39 - 43,63	7	

<sup>†</sup> Unidades arbitrárias determinadas pela análise de Western blot

Tabela 3 - Quantificação de Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (CGRP) de 5 kDa de acordo com a polaridade do eletrodo

Grupo	Média <sup>†</sup>	Desvio-padrão	Min-Máx	N (amostra)	p (Anova)
Sham	34,93	4,06	30,32 - 42,01	7	0,18
Controle	32,12	7,51	21,24 - 42,03	7	
Eletrodo negativo (anodo)	34,42	7,12	22,26 - 41,7	7	
Eletrodo positivo (catodo)	27,95	6,25	21,76 - 38,81	7	

<sup>†</sup> Unidades arbitrárias determinadas pela análise de Western blot

**DISCUSSÃO**



## 6. DISCUSSÃO

Os principais neuropeptídeos relacionados à inflamação neurogênica da pele são o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e a Substância P (SP). (WATSON RE *et al.*, 2002). A SP é uma taucininina com potente propriedade vasodilatadora, pois estimula a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais. É, geralmente, encontrada nas fibras e terminações nervosas da derme e epiderme, bem como nas glândulas sudoríparas. Possui importantes funções no sistema imune em níveis celular e humoral, participando de processos inflamatórios. (Schmelz M & Petersen LJ, 2001)

Já o CGRP é o peptídeo mais abundante na pele, possui efeito vasodilatador. Constante nas arteríolas de todas as espécies estudadas, tem ação direta na camada muscular e vascular. (Wu *et al.*, 2007; Kalil, 2003). Também sintetizado a partir do gânglio posterior da medula, porém na forma de pró-CGRP (15 KDa), e, após sua clivagem, é liberada na terminação nervosa em sua forma ativa (5KDa) (Xu *et al.*, 2005).

Ambos, SP e CGRP, estão frequentemente presentes na mesma fibra nervosa, e são dependentes do Fator de Crescimento Neural. E existe uma correlação entre eles, sendo que, a liberação SP induz a co-liberação de CGRP que, por sua vez, aumenta a ação de SP, apesar de CGRP poder ter efeitos duradouros (HOCHMAN *et al.*, 2014).

Assim, a liberação desses neuropeptídeos no início da fase de inflamação neurogênica e suas ações locais podem determinar a intensidade de todo o processo inflamatório da cicatrização. Por este motivo, o presente

estudo avaliou a liberação destes neuropeptídeos através de um modelo experimental.

Os neuropeptídeos têm estrutura molecular frágil, são facilmente liberados pelas terminações nervosas, têm padrão de disponibilidade na pele e internalização celulares pouco estudadas (BRAIN & CAMBRIDGE, 1996; WEIDNER *et al.*, 2000), com base nessa informação, este estudo optou pela realização da tricotomia no dorso dos animais.

Após a tricotomia, no presente estudo foi estabelecido um tempo de 60 minutos como padrão para iniciar a estimulação elétrica, pois se a tricotomia liberar neuropeptídeos, as concentrações de ambos os neuropeptídeos já estariam comprovadamente em níveis fisiológicos, de acordo com o estudo de HOCHMAN *et al.*, (2014) e Raymundo *et al.* (2014) que aguardaram esse mesmo período após a tricotomia.

Neste modelo experimental, não foi realizada uma incisão cutânea, o que difere do estudo de Borba *et al.*, (2011) que utilizaram o mesmo tipo de estimulação elétrica, porém, após a estimulação foi realizada uma incisão, avaliando outros efeitos no processo de cicatrização. Uma vez que, a incisão cutânea poderia ser um viés por si só no presente estudo, já que haveria uma maior liberação de substâncias inflamatórias no local da lesão (estímulo nociceptivo), o que levaria a uma liberação de neuropeptídeos e seria difícil diferenciar os neuropeptídeos liberados a partir da incisão ou da estimulação elétrica.

Para a estimulação elétrica, o método utilizado foi equitativo ao estudo de Borba *et al.*, (2011), principalmente em relação as padronizações de acoplamento de esponja-eletrodos, tempo e amplitude de aplicação, buscando avaliar através do resultado encontrado uma possível correlação do efeito da estimulação elétrica pré-incisional na liberação

neuropeptidérgica. Além disso, no presente estudo, foi utilizada uma única aplicação da estimulação elétrica, assim como estudo de Borba *et al.*, (2011) e Hochman *et al.*, (2014).

Após a estimulação elétrica, os animais foram submetidos à morte induzida para a retirada de pele com uso de um dermatômetro elétrico. A utilização desse dermatômetro foi necessária para que a espessura da pele fosse sempre constante, gerando amostras de volume iguais e não conter inadvertidamente acompanhamento de tecido subcutâneo ou panículo carnoso. Todavia, as amostras de pele em alguns estudos como o de BORBA *et al.*, (2011) e BONATTI *et al.*, (2013) foram retiradas por dissecação manual contendo pele total, o que acaba gerando amostras com volumes diferentes de tecido subcutâneo e poderia gerar quantidades diferentes de neuropeptídeos.

Além disso, RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSO ( 2005), demonstraram que as terminações nervosas se concentram na epiderme e na metade superior da derme e que os folículos pilosos, por serem ricamente inervados e abundantes de neuropeptídeos (NP's), poderia mascarar a liberação desses pela estimulação elétrica. O mesmo autor ainda descreve que a espessura total da pele do dorso do rato fica entre 900 e 1000 $\mu\text{m}$  e que os folículos pilosos são abundantes em profundidade maior que 500 $\mu\text{m}$ . Por esse motivo, o presente estudo optou pela espessura parcial constante de 500 $\mu\text{m}$ .

Além da padronização da espessura das amostras, também foi utilizado um punch cutâneo de 8 milímetros para que as dimensões destas amostras também fossem semelhantes, principalmente devido a sensibilidade do método de avaliação.

Para a avaliação de neuropeptídeos, o presente estudo buscou uma maneira de quantificação direta desses neuropeptídeos na pele, tentando obter resultados mais confiáveis e reprodutíveis. O método de escolha para quantificação direta foi o *Western blotting* (WB). No entanto, foi necessário o desenvolvimento de modificações laboratoriais pioneiras nas técnicas clássicas de WB para suplantiar certas dificuldades técnicas, discutidas adiante. O desenvolvimento do WB para quantificar NP's deu-se no Laboratório de Neurocirurgia Experimental - LIM 45 da Universidade de São Paulo - USP (Coordenador: Prof. Dr. Gerson Chadi). Estudo de Raymundo *et al.*, 2014, também utilizou a mesma análise de WB, a fim de verificar a liberação desses NP'S após aplicação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Optou-se pelo Western Blot (WB) por ser um método viável para detecção de neuropeptídeos na pele, com alta sensibilidade e especificidade, reprodutibilidade além de acessibilidade técnica e econômica. No entanto, por se tratar de uma técnica demorada e com várias etapas de execução, o WB tem aplicação prática dificultada, principalmente quando se emprega número de amostras significativas. Por isso, sua utilização costuma ser restrita aos estudos de pesquisa, em detrimento de outras metodologias que são mais rápidas e de fácil execução, como a imunohistoquímica (IHQ). A técnica de WB utilizada nesse estudo contorna sua principal desvantagem que é a dificuldade decorrente da extração proteica de um tecido de alta densidade como a derme. Tais limitações foram ultrapassadas adaptando as técnicas clássicas de WB, como: (1) manipulação específica das amostras, com séries de congelamentos e descongelamentos, maceração mais cuidadosa e uso de homogeneizador mais potente; (2) utilização de reagentes de lise em proporções maiores; (3) inibição de proteases em proporções maiores e (4)

utilização de meios de transferência proteica específicos para a pele, como a membrana de PVDF, já que a membrana habitual de nitrocelulose não foi eficaz.

Para o WB, o *kit* de CGRP, foram utilizados anticorpos para quantificação de sua forma ativa, com 5 kda, e de sua forma precursora, com 15 kda. O pró-CGRP é uma molécula de aproximadamente 15 kda que, após sofrer clivagem, dá origem a moléculas da forma ativa de CGRP (MISHIMA *et al.*, 2011). O pró-CGRP não tem outras funções biológicas específicas conhecidas e sua quantificação não foi considerada um objetivo desse estudo, já que faz parte apenas da síntese do CGRP. No entanto, como MISHIMA *et al.* (2011) comentaram em seu estudo, a quantificação do pró-CGRP auxilia e é um grande indicador do comportamento do CGRP na sua forma ativa, visto que este último tem degradação rápida e comportamento ainda pouco estabelecido na literatura (BRAIN & WILLIAMS, 1989).

O WB não distingue qual a localização do neuropeptídeo dentro da amostra, isto é, não é possível dizer se ele está dentro de vesículas nas terminações nervosas, se ele já foi excretado e se encontra no meio intersticial ou, ainda, se já foi internalizado na célula-alvo. Ele permite a análise quantitativa e segura dos neuropeptídeos, pois possibilita a retirada dos valores do *background* do filme e a normatização dos valores específicos do marcador em questão, em cada amostra, pelos valores de um marcador estrutural, a beta-tubulina.

Quanto aos resultados encontrados no presente estudo, observamos que, na quantificação de SP, houve uma diminuição, quando analisadas os grupos polo positivo (GPP) e negativo (GPN) em relação ao grupo controle e ao grupo Sham. Porém, não significativa. O que difere dos achados encontrados por HOCHMAN *et al.* (2014), que obtiveram um aumento de

SP em modelo experimental de pele integra igual ao do presente estudo, utilizando, entretanto, a fototerapia de baixa intensidade, com resultados apenas no espectro infravermelho. Assim como os resultados de RAYMUNDO *et al.* (2014), que também observaram um aumento de SP no mesmo modelo experimental, com a injeção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Já no presente estudo, quando observados os resultados de pró-CGRP (15Kda) não houve resultado significativo. O que difere, novamente, do estudo de RAYMUNDO *et al.*(2014), onde foi observado um aumento do pró-CGRP. Em contra partida, não houve diferença quando analisados os níveis de CGRP (5Kda). O que corrobora com HOCHMAN *et al.* (2014) e com o presente estudo.

Uma possível explicação para os resultados neste estudo apontados poderia ser o mesmo que LIEBANO *et al.*(2006) discutem em seu estudo: que a estimulação elétrica agiria em fibras antidrômicas ou nociceptivas e, com base neste princípio, quando se tem uma estimulação sensorial ou motora, não há ativação de fibras nociceptivas C e A- $\delta$ . Desta maneira, poderiam ser questionados alguns parâmetros do presente estudo: um desses parâmetros seria a amplitude, que foi mantida em 8mA e talvez não tenha sido suficiente para ativação das fibras nervosas; outro seria o período de 30 minutos de estimulação, que talvez tenha sido um período muito longo a um ponto de haver adaptabilidade das fibras nervosas, uma vez que a corrente ultraexcitante foi estimulada por via subcutânea.

Porém, WALLENGREN *et al.*, (2005) utilizaram uma estimulação elétrica com o mesmo tempo de estímulo elétrico do presente estudo, de 30 minutos por 10 dias consecutivos, e observaram que a intensidade moderada da estimulação elétrica provocou proliferação das fibras sensitivas do nervo cutâneo no rato, mas não ativou a raiz do ganglio dorsal. Já o estudo de TANAKA (2001), que utilizou uma corrente elétrica

e estimulou direto na raiz do gânglio dorsal, mostrou que houve uma liberação de CGRP após aplicação de estimulação elétrica, sendo utilizada uma intensidade abaixo do limiar motor, mas, em contrapartida, se fez uso de um vasodilatador em conjunto com o estímulo elétrico.

Outra explicação para os resultados encontrados poderia estar relacionada ao número da amostra, que talvez tenha sido insuficiente para ser obtida uma diferença significativa entre os grupos com a estimulação elétrica apesar de ter sido realizado o cálculo amostral antes do experimento deste estudo. Além disso, HOCHMAN *et al.*, 2014, e RAYMUNDO *et al.* (2014), entretanto, utilizaram o mesmo número amostral do presente estudo e obtiveram diferença significativa na liberação de SP e CGRP.

Um achado no presente estudo, ainda que não objetivado inicialmente, foi o resultado significativo entre a liberação dos neuropeptídeos: tendo ocorrido uma diminuição de SP em relação ao CGRP. Tal questão corroboraria com o estudo de ROKUGO *et al.*, 2002 que encontraram uma diminuição de SP após uma estimulação elétrica (porém, com uma corrente diferente do presente estudo, menor período e com estímulo aplicado diretamente no gânglio da raiz dorsal do rato, além do uso, em conjunto, de um reagente e a não observação da liberação de CGRP). Com isso, cabe a avaliação, em trabalhos futuros: ainda que SP e CGRP estejam presentes na mesma fibra nervosa (e há a possibilidade de serem dependentes), a liberação SP estaria correlacionada com a liberação de CGRP? Outras perspectivas são sugeridas: utilizar diferentes tipos de estimulação elétrica como a Estimulação Elétrica Transcutânea – (TENS); aplicações por mais dias consecutivos em uma pele íntegra e/ou pré e pós-incisional, no intuito de avaliar a liberação destes neuropeptídeos e futuramente, talvez, poder avaliar uma biomodulação pré-operatória na

cicatrização (ou em distúrbios fibroproliferativos) e, finalmente, utilizar outro método de avaliação de neuropeptídeos na pele para termos certeza se a estimulação elétrica liberaria SP e/ou CGRP, bem como se poderia ser degradado uma vez que o método de WB não difere entre os neuropeptídeos da região interna ou externa da fibra nervosa.



**CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

A estimulação elétrica ultraexcitante não influenciou na liberação de neuropeptídeos, CGRP e SP, em pele de ratos.

## **REFERÊNCIAS**

## 8. REFERÊNCIAS

Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: Neurogenic inflammation hypotheses. *Medical Hypotheses*. 2008;71:32–8.

Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, et al. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res*. 2011;13(94):90-104.

Biro T, Acs G, Acs P, Modarres S, Blumberg PM.: Recent advances in understanding vanilloid receptors: a therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1997;2:56-60.

Bock O, Mrowietz U. Keloids. A fibroproliferative disorder of unknown etiology. *Hautarzt*. 2002;53(8):515-23.

Bonatti S. Terapia a laser de baixa intensidade (808 nm) em baixa e alta dosagem na cicatrização de ferida incisional em pele de ratos [dissertação]. [São Paulo]: Universidade Federal de São Paulo; 2013.102p.

Borba GC, Hochman B, Liebano RE, Enokihara MM, Ferreira LM. Does preoperative electrical stimulation of the skin alter the healing process? *J Surg Res*. 2011;166(2):324-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;7(72):248-54.

Brain SD, Cambridge H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol*. 1996;27(4):607-11.

Brain SD, Williams TJ. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. *Br J Pharmacol*. 1989;97(1):77-82.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M et al.: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;3(89):816-24.

Cannon DT, Wu Y. Topical capsaicin as an adjuvant analgesic for the treatment of traumatic amputee neurogenic residual limb pain. *Arch Phys Med Rehabil*. 1998;79(5):591-3.

Craft RM, Porreca F. Treatment parameters of desensitization to capsaicin. *Life Sci.* 1992;51(23):1767-75.

Caviedes-Bucheli J, Rojas P, Escalona M, Estrada A, Sandoval C, Rivero C, Lombana N, Muñoz HR. The effect of different vasoconstrictors and local anesthetic solutions on substance P expression in human dental pulp. *J Endod.* 2009;35(5):631-3.

Chadi G, Silva C, Maximino JR, Fuxe K, da Silva GO. Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. *Brain Res.* 2008;23(1190):23-38.

Fujii Y, Sengoku T, Takakura S. Repeated topical application of glucocorticoids augments irritant chemical-triggered scratching in mice. *Arch Dermatol Res.* 2010;302(9):645-52.

Glinski W, Brodecka H, Glinska – Ferrenz M, Kowalski D. Neuropeptides in psoriasis: possible role of beta-endorphin in the pathomechanism of the disease. In *J Dermatol.* 1994;33(5):356-60.

Gibbons CH, Wang N, Freeman R. Capsaicin induces degeneration of cutaneous autonomic nerve fibers. *Ann Neurol.* 2010;68(6):888-98.

Hochman B, Ferreira LM. Quelóide. In: Ferreira LM. *Guias de Medicina ambulatorial e hospitalar UNIFESP – Escola Paulista de Medicina – Cirurgia Plástica.* São Paulo: Manole;2007.p.65-74.

Hochman B, Pinfildi CE, Nishioka MA, Furtado F, Bonatti S, Monteiro PK, Antunes AS, Quieregatto PR, Liebano RE, Chadi G, Ferreira LM. Low-level laser therapy and light-emitting diode effects in the secretion of neuropeptides SP and CGRP in rat skin. *Lasers Med Sci.* 2014May;29(3):1203-8.

Hochman B, Tucci-Viegas VM, Monteiro PKP, França JP, Gaiba S, Ferreira LM. The action of CGRP and SP on cultured skin fibroblasts. *Cent Eur J Biol.* 2014;9(7):717-26.

Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J.: Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* 1967;31:138-51.

Jarvikallio A, Harvina IT, Naukkarinen A. Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch Dermatol Res.* 2003;295(1):2-7.

Kalil Gaspar P. Neuropeptídeos na Pele. Revisão. *Na Bras Dermatol.* 2003;78(4):483-98.

Karanth SS, Springall DR, Lucas S, Levy D, Aschby P, Levene MM et al.: Changes in nerves and neuropeptides in skin from 100 leprosy patients investigated by immunocytochemistry. *J Pathol* 1989;157:15-26.

Koltzenburg, G. Lundberg, L.E.R., and Torebjörk, H.E. Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin. *Pain.* 1992;51:207-19.

Mehmandoust FG, Torkaman G, Firoozabadi M, Talebi G. Anodal and cathodal pulsed electrical stimulation on skin wound healing in guinea pigs. *J Rehabil Res Dev.* 2007;44(4):611-8.

Mishima T, Ito Y, Hosono K, Tamura Y, Uchida Y, Hirata M, et al. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(2):431-9.

Misery L. Atopic dermatitis and the nervous system. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;41(3):259-66.

Ogawa R. Keloid and hypertrophic scarring may result from a mechanoreceptor or mechanosensitive nociceptor. *Disorder Medical Hypotheses.* 2008;71:493-500.

Pavlovic S, Liezmann C, Blois SM, Joachim R, Kruse J, Romani N, et al. Substance P is a key mediator of stress-induced protection from allergic sensitization via modified antigen presentation. *J Immunol.* 2011;186(2):848-55.

Rajkovic V, Matavulj M, Johansson O. The effect of extremely low frequency electromagnetic fields on skin and thyroid amine- and peptide-containing cells in rats: an immunohistochemical and morphometrical study. *Environ Res.* 2005;99(3):369-77.

Raymundo EC, Hochman B, Nishioka MA, Gonçalves de Freitas JO, Maximino JR, Chadi G, Ferreira LM. Effects of subcutaneous carbon

dioxide on calcitonin gene related peptide and substance P secretion in rat skin. *Acta Cir Bras.* 2014;29(4):224-30.

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

Liebano RE, Abla LEF, Ferreira LM. Efeito da estimulação elétrica nervosa transcutânea em alta frequência na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cir Bras.* 2006;21(3):133-8.

Robbins WR, Staats PS, Levine J, Fields HL, Allen RW, Campbell JN, Pappagallo M. Treatment of intractable pain with topical large dose capsaicin: preliminary report. *Anesth Analg.* 1998;86(3):579-83.

Rokugo T, Takeuchi T, Ito H. A histochemical study of substance P in the rat spinal cord: effect of transcutaneous electrical nerve stimulation. *J Nippon Med Sch.* 2002;69(5):428-33

Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 2006;86(4):1309-79. Review.

Rosenblatt MI, Dickerson IM. Endoproteolysis at tetrabasic amino acid sites in procalcitonin gene-related peptide by pituitary cell lines. *Peptides.* 1997;18(4):567-76.

Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol.* 1998;7(2):81-96.

Snyder SK, Byrnes KR, Borke RC, Sanchez A, Anders JJ. Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633 nm low power laser treatment. *Lasers Surg Med.* 2002;31(3):216-22.

Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci.* 2001;16:33-7. Review.

Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 1999;51(2):159-211.

Tanaka S, Barron KW, Chandler MJ, Linderoth B, Foreman RD. Low intensity spinal cord stimulation may induce cutaneous vasodilation via CGRP release. *Brain Research*. 2001;896:183–7.

Tredget EE, Nedelec B, Scott PG, Ghahary A. Hypertrophic scars, keloids and contractures. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):701-31.

Torii H, Hosoi J, Asahina A, Granstein RD.: Calcitonin gene-related peptide and Langerhans cell function. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1997;2:82-6.

Xu P, Van Slambrouck C, Berti-Mattera L, Hall AK. Activin induces tactile allodynia and increases calcitonin gene-related peptide after peripheral inflammation. *J Neurosci*. 2005;25(40):9227-35.

Wallengren J, Moller K, Sundler F. Cutaneous Field Stimulation with Moderate Intensity Current Induces Nerve Proliferation in Rat Skin But Has No Effect on Dorsal Root Ganglia. *Acta Derm Venereol*. 2005;85: 324–8.

Watson RE, Supowit SC, Zhao H, Katki KA, Dipette DJ. Role of sensory nervous system vasoactive peptides in hypertension. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(9):1033-45.

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

Weidner C; Klede M; Rukwied R; Lischetzki G; Neisius U; Skov PS; Petersen LJ; Schmelz M. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin--a microdialysis study. *J Invest Dermatol*. 2000;115(6):1015-20.

Wu H, Guan C, Qin X, Xiang Y, Qi M, Luo Z, Zhang C. Upregulation of substance P receptor expression by calcitonin gene-related peptide, a possible cooperative action of two neuropeptides involved in airway inflammation. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20:513-24

Zegarska B, Lelinska A, Tyrakowski T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep*. 2006;58(1):13-21.



## **NORMAS ADOTADAS**

## NORMAS ADOTADAS

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos da experimentação animal, quando utilizados [Internet]. 1991 [citado em 8 de Abril de 2013] Disponível em: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>.

DeCS - Descritores em Ciências da Saúde [Internet]. São Paulo: BIREME; [citado em 20 de Maio de 2010]. Disponível em: <http://decs.bvs.br>.

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

SBCA/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). [Internet]. Princípios éticos da experimentação animal. Disponível em: <http://www.cobea.org.br>.

## ABSTRACT

**Introduction:** A dysfunction in the release of neuropeptides cause changes in the skin, and may cause disturbances in the healing process and/or skin disorders. Therefore the release of neuropeptides has been studied in the literature, connecting the use of electrophysical agents. **Objective:** To investigate the effect of electrical stimulation on the release of neuropeptides SP and CGRP in rat skin. **Methods:** 28 animals were randomly divided into 4 groups, Control Group (CG): the samples were collected 60 minutes after shaving without electrical stimulation; Sham Group (SG): after 60 minutes of trichotomy were placed electrodes plates with damp sponge with sodium chloride 0.9% and superimposed on the dorsal midline and dispersive on the ventral region, with the equipment off for 30 minutes; Electrical Stimulation Positive Pole Group (GPP): later 60 minutes of trichotomy, electrical stimulation was performed on the dorsal midline with positive polarity and the Electrical Stimulation Group with negative polarity (NPG): the same parameters used above, with the change where the negative pole was passed into the dorsal midline. At the end of electrical stimulation, skin samples, tested by Western Blotting for analysis of neuropeptides CGRP and SP, were collected. For statistical analysis, analysis of variance (ANOVA) was used to identify differences between the groups. **Result:** There was a minor release of neuropeptides from the negative and positive polarity, however, not significant. **Conclusion:** The ultra-exciting electrical stimulation did not influence the release of neuropeptides, SP and CGRP, in rat skin.

**Keywords:** Calcitonin Gene Related Peptide – Neurogenic Inflammation – Neuropeptides – Skin – Substance P

## **APÊNDICES**

## PÊNDICE 1

### Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP – CEP.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 1 de julho de 2011.  
CEP 0641/11

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) ARAINY SUELY ANTUNES  
Co-Investigadores: Carlos Eduardo Pinfidi; Richard Eloin Liebano; Bernardo Hochman  
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “Efeito da estimulação elétrica no período pré operatório na cicatrização em pele de ratos.”.

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Estudo experimental crônico em ratos machos Wistar.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Não se aplica.

**OBJETIVOS:** Investigar o efeito estimulação elétrica no período pré-operatório na cicatrização em pele de ratos.

**RESUMO:** Serão utilizados 90 ratos da linhagem Wistar EPM-1 adultos, machos, com 8 semanas de idade e peso entre 270 e 350 gramas, provenientes do CEDEME da Unifesp. Os animais serão distribuídos em 3 grupos e subdivididos em 6 com 10 animais em cada grupo. Os animais serão anestesiados nos dias da realização dos estímulos elétricos com injeção intramuscular, no músculo gastrocnêmio direito, com cloridrato de quetamina e xilasina para depilação manual no dorso do rato para os procedimentos; no grupo 1, simulação (GS); grupo 2, polopositivo (GPP); grupo 3, polonegativo(GPN). Após a estimulação elétrica por 15 dias, todos os animais serão anestesiados e demarcados pelo mesmo método, onde será seccionada com bisturi e auxílio de uma pinça e tesoura, a pele será retirada um pedículo cutâneo do terceiro segmento que corresponderá o ponto medial da cicatriz, medindo 2cm de comprimento no total, incluindo 1cm de pele íntegra e cicatricial no lado esquerdo da incisão, e 1 cm de pele íntegra e cicatricial do lado direito, a partir do ponto médio das mesmas e de formas concêntrica ao trajeto cicatricial. Sendo que os subgrupos GS1, GPP1, GPN1 serão submetidos a retirada das amostras após o término da sutura, os subgrupos GS5, GPP5, GPN5 no quinto dia de pós-operatório e os subgrupos GS7, GPP7, GPN7 no sétimo dia de pós-operatório, os animais serão submetidos a eutanásia após a retirada das amostras por overdose de anestésicos. As amostras de pele serão incluídas em bloco de parafina para estudo de imunohistoquímica.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** .

**MATERIAL E MÉTODO:** Descritos os procedimentos experimentais.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo.

**CRONOGRAMA:** 14 Meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Não envolve obtenção de título.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **25/6/2012 e 25/6/2013.**

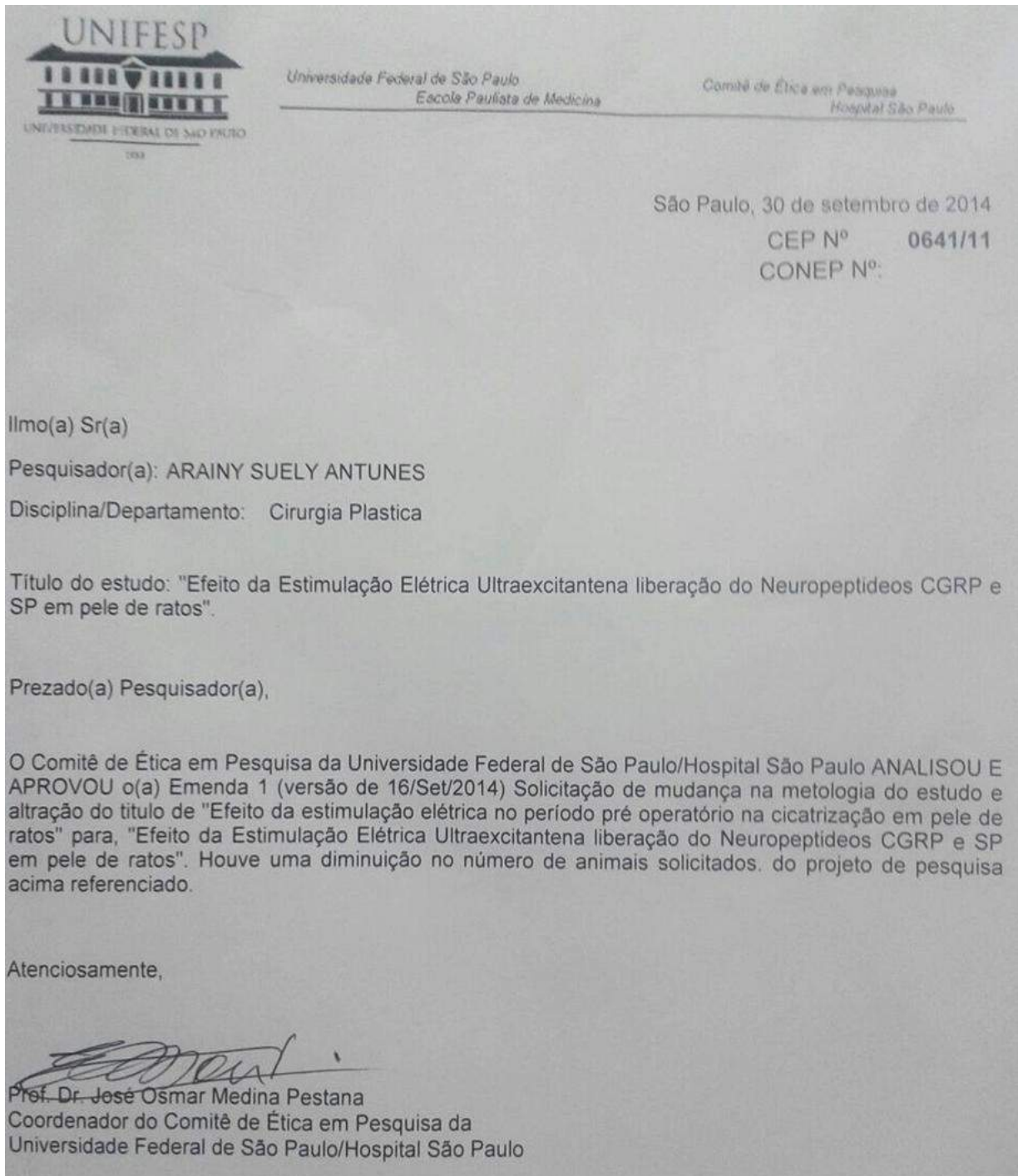
O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

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

0641/11



## APÊNDICE 2

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

1. Polo negativo \_\_\_\_\_
2. Controle \_\_\_\_\_
3. Controle \_\_\_\_\_
4. Shan \_\_\_\_\_
5. Shan \_\_\_\_\_
6. Polo negativo \_\_\_\_\_
7. Polo positivo \_\_\_\_\_
8. Polo positivo \_\_\_\_\_
9. Polo positivo \_\_\_\_\_
10. Shan \_\_\_\_\_
11. Polo positivo \_\_\_\_\_
12. Controle \_\_\_\_\_
13. Polo negativo \_\_\_\_\_
14. Shan \_\_\_\_\_
15. Controle \_\_\_\_\_
16. Polo positivo \_\_\_\_\_
17. Polo negativo \_\_\_\_\_
18. Polo negativo \_\_\_\_\_
19. Controle \_\_\_\_\_
20. Polo positivo \_\_\_\_\_
21. Polo negativo \_\_\_\_\_
22. Polo positivo \_\_\_\_\_
23. Shan \_\_\_\_\_
24. Polo negativo \_\_\_\_\_
25. Shan \_\_\_\_\_
26. Controle \_\_\_\_\_
27. Controle \_\_\_\_\_
28. Shan \_\_\_\_\_

28 subjects randomized into 1 block To reproduce this plan, use the seed 16091 along with the number of subjects per block/number of blocks and (case-sensitive) treatment labels as entered originally.



**APÊNDICE 3**

Quadro 1. Descrição dos valores de SP na amostra de cada animal, obtidos por WB (valores arbitrários).

<b>Shan</b>	<b>Controle</b>	<b>Polo -</b>	<b>Polo +</b>
6.452000	8.243000	3.244000	4.920000
3.408000	4.656000	2.166000	2.089000
7.720000	6.757000	7.170000	4.320000
6.280000	7.016000	6.509000	5.223000
9.986000	8.287000	5.104000	7.7390000
5.535000	6.495000	7.076000	5.597000
9.510000	5.073000	6.161000	8.575000

**APÊNDICE 4**

Quadro 2. Descrição dos valores de pró-CGRP (15KDa) na amostra de cada animal, obtidos por WB (valores arbitrários).

<b>Shan</b>	<b>Controle</b>	<b>Polo -</b>	<b>Polo +</b>
26.94600	24.32700	20.17500	28.96000
21.68500	30.77500	40.43000	37.60900
43.57100	39.22700	28.10600	43.63300
30.35900	40.15600	15.98400	29.09300
27.18400	26.27900	23.96800	28.34200
42.31300	28.97000	25.08500	22.39500
30.66900	24.97800	27.69700	29.78700

**APÊNDICE 5**


Quadro 3. Descrição dos valores de CGRP (5KDa) na amostra de cada animal, obtidos por WB (valores arbitrários).

Sham	Controle	Polo -	Polo +
35.33000	31.36800	41.70000	27.51500
42.01700	21.24400	33.69600	34.16000
35.02200	28.70000	40.99200	38.81100
37.84800	42.03000	22.26700	23.01000
31.11300	41.13300	29.57700	25.81900
32.87100	33.48500	40.18000	24.61100
30.32400	26.91300	32.53600	21.76600

## APÊNDICE 6

Laudo do ensaio de aferição do aparelho de eletroestimulação

**QUARK®**  
Produtos Médicos | Medical Products



Rua do Rioánte, 1776 - Centro  
Piracicaba/SP CEP 13400-186 - Brasil  
Fone/Fax: +55 (19) 2105.2800  
Razão Social: Mendes e Barbosa Produtos Médicos  
CNPJ: 71.769.673/0001-59  
E-mail: quark@quarkmedical.com.br  
Site: www.quarkmedical.com.br

**LAUDO DE ENSAIO E AFERIÇÃO Nº.223/14**

Equipamento: DUALPEX 071

NÚMERO DE SÉRIE: 09-006

Solicitante: MICHELE AKEMI NISHIOKA  
Endereço: RUA GUIRATINGA-588 APTO 82  
Fone: (11) 5083-1818

Cidade:SAO PAULO Estado:SP

Descrição	INSTRUMENTOS UTILIZADOS	Nº de Série	Nº do Certificado
BIOTEK 801-Pro		1105	NE0545
OSCILOSCÓPIO DIGITAL		121	R1206
MULTÍMETRO DIGITAL		116	R0738

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

Data: 16/12/13

  
Responsável Técnico  
André Luis Toledo Mendes

## **FONTES CONSULTADAS**

**FONTES CONSULTADAS**

Academia Brasileira de Letras. Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa. 5a. ed. São Paulo: Global 2009. 976p. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.academia.org.br/abl/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=2>

Ferreira ABH. Miniaurélio século XXI escolar. 4a ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2001.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. Acta Cir Bras. 2005;20 (Supl. 2):02-9.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential medical statistics. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied Linear Statistical Models. 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996.

Kitchen S. Eletroterapia baseada em evidências 11a ed. São Paulo: Manole; 2003.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

### Máquina de cortar cabelo – Marca WAHL®



Super Taper

- › Cortador poderoso com motor vibratório.
- › Ideal para grandes exigências e uso contínuo.
- › Lâmina profissional à prova de ferrugem
- › Motor Shunt de maior potência.
- › Regulador de nível de corte.
- › A máquina mais vendida da Wahl a nível mundial.
- › 2 anos de garantia.

#### ESPECIFICAÇÕES

■ **Cutting Length:** Pentas: nº1-3mm, nº2-6mm, nº3-10mm, nº4-13mm, nº5-19mm, nº8-25mm.

■ **Mains Voltage:** Disponível em 2 voltagens, 110 e 220.

Fonte: Wahlglobal [Internet]. Rio de Janeiro: Wahl Clipper Brasil; [citado em 8 de Abril de 2013]. Super Taper. Disponível em: <http://www.wahlglobal.com/brazil/wahl/linha-profissional/maquinas-decortar-cabelo/super-taper.html>



## ANEXO 2

### Dermátomo Eléctrico – Marca Integra/Padgett®

Product Information
Downloads
Request More Info.

**Model PI Electric Dermatome**

The Model PI Electric Dermatome was developed in response to requests by leading tissue banks. We gave it all of the superior quality, precision, dependability and value a surgeon has come to expect from Padgett Instruments. Now, you can harvest a skin graft up to six inches wide using Padgett's electric Dermatome Model PI. A six-inch wide graft can cover most adult hands or a small child's face without seams. Facts and Features:

- Only six-inch powered dermatome available
- Tested in tissue banks
- Fewer seams
- Two, three, four, five and six inch wide grafts
- Can cover most hands or a small child's face
- Constant on/off switch option

Order Numbers: 3539-600: PADGETT Model PI Dermatome, complete, 120 Volt  
 3539-600-230: PADGETT model PI Dermatome, complete, 230 Volts  
 3539-602: Sterile 6-Inch Dermatome Blades, Box of 10

If you prefer to receive this Instruction For Use in paper form, please contact our Technical Services Department by phone at 800-654-2873 or by e-mail at [ReconUSProductSupportNJ@integralife.com](mailto:ReconUSProductSupportNJ@integralife.com).



Fonte: Integra LifeSciences [Internet]. New Jersey: Integra LifeSciences Corporation; c2012. Jarit [citado em 8 de Abril de 2013]. Disponível em: <http://www.integralife.com/Jarit/Jarit-Product-detail.aspx?Product=121&ProductName=Model%20PI%20Electric%20Dermatome&ProductLineName=PADGETT%C2%AE&ProductLineID=158>