



18º Congresso de Iniciação Científica

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM EM DIFERENTES
PARÂMETROS NA LESÃO TEGUMENTAR. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM RATOS**

Autor(es)

EDUARDA LAZARI GUIDETTI

Orientador(es)

MARIA LUIZA OZORES POLACOW

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPQ

1. Introdução

A cicatrização é um mecanismo homeostático para restaurar o equilíbrio fisiológico do tecido lesado e envolve três fases: inflamação, proliferação e remodelagem (KITCHEN E YOUNG, 1998 E ROBINSON, 1995).

O tratamento ideal de uma ferida cutânea é a instituição de medidas profiláticas, porém uma vez instalada, deve-se intervir precocemente, objetivando evitar ou minimizar os riscos recorrentes, bem como facilitar o processo de cicatrização.

A incorporação da corrente de alta voltagem como instrumento terapêutico para cicatrização de feridas, tem obtido resultados satisfatórios na área da saúde em lesões com diferentes etiologias (DAVINI, et al., 2005b), embora ainda apresente pouca comprovação experimental, o que gera de um lado, incertezas quanto às suas reais ações e de outro, atribuições não pertinentes a essa forma de estimulação.

Ao realizar uma revisão bibliográfica com o objetivo de descrever os efeitos da EEAV nas diferentes intervenções fisioterapêuticas, Davini, et al. (2005a) levantou duas hipóteses para a ocorrência dos resultados positivos desse tratamento. São elas: alterações eletroquímicas no local da úlcera e aumento da microcirculação da região.

A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV), segundo Robinson (1995) e Watson (1998), é uma corrente pulsada monofásica de pico duplo de curta duração e elevada intensidade. Embora sua aplicação seja realizada num determinado segmento corpóreo ou patologia específica, suas ações apresentam envolvimento sistêmico (DAVINI, et al., 2005a).

A grande incidência de úlceras de pressão (39,8% dos pacientes) descrita por Rogenski e Santos (2005) em uma pesquisa realizada no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), aponta a necessidade de estudar os parâmetros ótimos de EEAV para a cicatrização de feridas, uma vez que os mesmos não têm sido bem estabelecidos pela literatura.

Existem inúmeros trabalhos com aplicação da EEAV em úlceras cutâneas crônicas, porém em lesões agudas no modelo animal, que possibilitam estudos histológicos, os trabalhos são escassos.

Com base nas informações apontadas configura-se a hipótese de que a EEAV possa abreviar o processo de regeneração tecidual mediada por diferentes parâmetros físicos.

2. Objetivos

Estudar os efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) com diferentes parâmetros físicos (corrente catódica e anódica) sobre as características morfométricas da regeneração tegumentar em ratos.

3. Desenvolvimento

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, protocolado sob o número 002/10.

Foram utilizados ratos Wistar machos, entre 3 a 4 meses de idade, distribuídos em 4 grupos, com 7 animais cada: controle (C) - animais com lesão e sem EEAV; (E+) - animais com lesão e EEAV pólo +; (E-) animais com lesão e EEAV pólo -; sham (S) - animais com lesão, porém submetidos à EEAV placebo.

Os animais foram mantidos em biotério, acondicionados em gaiolas individuais, nutridos com ração e água ad libitum, período claro/escuro de 12/12 horas e temperatura ambiente de 23°C.

O procedimento cirúrgico consistiu na remoção de 1 cm² de pele incluindo a hipoderme, utilizando um gabarito vazado milimetrado e bisturi de lâmina 11, e foi realizado após a aplicação de anestesia intramuscular composta de uma mistura de Dopalen® (Cloridrato de Cetamina) e Rompun® (Cloridrato de Xilazina) e tricotomia manual da região dorsal.

A estimulação foi efetuada com o equipamento Neurodyn High Volt – ANVISA 10360310008 - IBRAMED® e teve início após 24 horas da realização da cirurgia. Os ratos foram estimulados com pólo+ (grupo E+) e pólo- (grupo E-) no limiar motor, durante 30 minutos, por 7 dias consecutivos, frequência de 100 Hz e intensidade no limiar motor. A cada 5 minutos de estimulação, aumentava-se a intensidade, a fim de minimizar a acomodação da corrente.

Um eletrodo ativo de silicone-carbono foi posicionado sobre a lesão e outro, dispersivo, sobre a região abdominal. Como meio de acoplamento, foi utilizado gel estéril (eletrodo dispersivo) e gaze estéril embebida em soro fisiológico (eletrodo ativo).

O grupo S foi anestesiado e preparado para receber a eletro estimulação, porém o equipamento não foi ativado. O grupo C sofreu a cirurgia, sendo mantido em biotério.

Após eutanásia dos animais (8º dia), as lesões foram removidas e preparadas para análise histológica. Os procedimentos envolveram: fixação, desidratação, diafanização, embebição, inclusão, microtomia, (cortes com 6 µm de espessura) e coloração em Hematoxilina e Eosina.

Medidas lineares da reepitelização (em µm) avaliaram o avanço da epiderme no tecido lesado. A regeneração foi mensurada em 15 cortes não seriados por animal, a partir do bordo da lesão em ambos os lados, obtendo-se a somatória dos mesmos, utilizando-se objetiva de 4X e ocular milimetrada (Carl Zeiss KF 10x/18). Com o objetivo de corrigir a distorção do aumento, ao final da análise foi realizada a calibração da objetiva por meio do coeficiente micrométrico.

O número e a densidade de área dos vasos sanguíneos foram examinados em 5 cortes histológicos não seriados de cada animal, 3 áreas de cada corte, foram captadas por um software Image Pró-Plus® 4.0 (Media Cybernests) e câmera digital (JVC) acoplada a um microcomputador totalizando 15 áreas por animal. As imagens foram captadas com resolução de 640 por 480 pixels com objetiva de 10X, sendo que o software permitiu visualiza-las em uma área de campo de 190464,12 µm². Nestas áreas foram computados o número de vasos sanguíneos.

A densidade de área dos vasos sanguíneos foi obtida por meio de um sistema de planimetria por contagem de pontos, segundo Mathieu et al. (1981) e Mandarin de Lacerda (1994). A quantificação foi realizada no software por meio de uma tela quadriculada, composta por 336 quadrados.

Com a finalidade de uma documentação mais detalhada dos resultados, as lesões no dorso dos animais foram submetidas a 3 registros fotográficos padronizados (após a cirurgia, no 3º dia e no 7º dia de tratamento com EEAV) realizados por uma câmera digital (SAMSUNG - S730).

A câmera foi posicionada a 40 cm, perpendicularmente a lesão. Um programa computadorizado (AREA®) foi utilizado especificamente para calcular a distância em pixels referente à 1cm na régua fotografada junto a lesão.

Após análise pelo teste de Levene que avalia a homocedasticidade, aplicou-se a Anova F com medidas repetidas, considerando repetição das fotos, seguido do Post Hoc de Tukey, com nível de significância de 5%.

4. Resultado e Discussão

Pela análise das imagens nas 3 fases do tratamento utilizando o software AREA® foram observados resultados que demonstram uma redução média da área da ferida de 61,7% para o grupo C ; 57,5% para o grupo S; 77,9% para o grupo E+ e 79,0% para o grupo E-, como mostra a Tabela 1.

Pelos resultados apresentados foi possível constatar que a redução média da área da lesão do grupo C e do grupo S foi semelhante. Esse fato demonstra a confiabilidade das medidas analisadas pelo AREA®.

A média da área de lesão dos grupos E- e E+ foi significativamente menor ($p=0,04$) que os grupos S e C, o que evidencia um eficiente potencial de cicatrização para o tratamento com ambas as polaridades, isoladamente, no período de 7 dias.

Na tentativa de se conseguir um melhor controle das influências que pudessem interferir na cicatrização, foram utilizados ratos da mesma idade e raça, com o mesmo mecanismo de lesão, tratados com a mesma dieta e mantidos em ambiente controlado. Os níveis de estresse também foram considerados, com a utilização de um grupo sham, que passou por cirurgia, manuseio e anestesia diariamente, e não diferiu do controle, nas variáveis analisadas.

Pela análise histológica da reepitelização não foram obtidos dados expressivos entre os diferentes grupos, embora a média da reepitelização do grupo tratado com E- seja maior que os demais grupos, não foi significativo. Provavelmente isto se deva à variabilidade das amostras (desvio padrão elevado), como pode ser observado na Tabela 2. Sugere-se que este estudo histomorfométrico seja acrescido de análises em um maior número de cortes histológicos, para verificar se mantém as diferenças individuais, dentro do mesmo grupo.

Neste estudo, os animais estimulados com polaridade negativa não apresentaram aumento significativo para a angiogênese (Tabela 3). Esse fato pode ser justificado, pelo tempo para o retorno ao fluxo sanguíneo normal. Os animais utilizados neste experimento foram sacrificados 24 h após a última sessão o que não proporcionou a análise dos efeitos imediatos provocados no local.

Pela análise de correlação de Pearson, houve correlação altamente positiva ($r=0,82$) entre as variáveis número e densidade de área de vasos no grupo E+. No entanto, estes resultados não tem relação com a melhora na redução da ferida, observada na análise computacional da área, onde também os animais do grupo E- obtiveram redução de área significativamente menor.

O mecanismo que possibilita a formação de novos vasos e a melhora da circulação ainda não está bem definido na literatura. Kniffki, Mense e Schmidt (1981), sugerem que a estimulação de receptores aferentes (fibras tipo III e tipo IV) é responsável pelos ajustes no reflexo cardiovascular durante a contração muscular. Estes receptores podem ser ativados por vários estímulos como alongamento, contração muscular, dor e estímulos químicos e metabólicos.

Silva (2009) observou em úlceras crônicas em humanos que a EEAV não só diminuiu a área da ferida como também proporcionou alívio de dor, e conseqüentemente, melhorou a amplitude de movimento do tornozelo do membro acometido, fato sugestivo de que pode estar relacionado com o incremento circulatório. Davini, et al. (2005b) examinou os efeitos da EEAV em quatro pacientes portadores de úlceras crônicas, utilizando parâmetros semelhantes e atribuiu os resultados positivos observados às alterações eletroquímicas e ao aumento da microcirculação da região. No presente trabalho, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas no número ($p=0,73$), nem na densidade de área de vasos ($p=0,09$) nos diferentes grupos experimentais.

É importante salientar que a maioria dos trabalhos que apontam reação ao recurso, aplicou-o em úlceras crônicas que podem ter diferentes origens, porém sua principal etiologia está associada a uma disfunção vascular (FRADE et al, 2005). Neste trabalho utilizamos como modelo experimental uma ferida de segunda intenção, aguda e abrangeu a fase inflamatória e proliferativa, onde se observou grande número de células e vasos sanguíneos – tecido de granulação, e sem infecção.

A este respeito, Simões e colaboradores (1985) estudaram os aspectos ultra-estruturais do processo de reparação da pele de ratos albinos, e observaram que, no 7º dia pós lesão (sem nenhuma intervenção), há presença de fibroblastos com grande quantidade de vesículas intracitoplasmáticas contendo fibrilas colágenas, grande concentração de neutrófilos e alguns macrófagos. Isto é, no modelo experimento utilizado, o animal controle (não tratado) tem uma excelente capacidade de regeneração da lesão tegumentar. Isto pode explicar porque o recurso utilizado (EEAV) não apresentou resultados tão importantes quanto os relatados na literatura para úlceras crônicas.

Em relação ao efeito sobre o crescimento bacteriano, neste trabalho, o tratamento com EEAV não poderia acelerar a regeneração das lesões, pois as mesmas não eram infectadas. Este efeito, porém, deve ser considerado no tratamento de feridas crônicas, o que não era objetivo deste trabalho.

Os resultados aqui apresentados reforçam a necessidade de se estudar histologicamente este recurso em modelos experimentais cujas lesões tenham um déficit circulatório ou infecção.

5. Considerações Finais

Conclui-se que a EEAV utilizada com pólos isolados é um recurso interessante para acelerar a regeneração de feridas cutâneas, mas, histologicamente necessita de mais estudos que avaliem seu mecanismo de ação.

Referências Bibliográficas

- DAVINI, R.; NUNES, C. V.; GUIRRO, E. C. O.; GUIRRO, R. R. J. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, v. 9, n. 3, p. 249-256, 2005a.
- DAVINI, R.; NUNES, C. V.; GUIRRO, E. C. O.; GUIRRO, R. R. J.; FASCINA, E.; OLIVEIRA, M.; POLLI, M.; GARCIA, M.; DOMINGUES, P. Tratamento de úlceras cutâneas crônicas por meio da estimulação elétrica de alta voltagem. *Revista de Ciências Médicas*, v. 14, n. 3, p. 249-258, 2005b.
- FRADE, M. A. C.; CURSI, I. B.; ANDRADE, F. F.; SOARES, S. C.; RIBEIRO, W. S.; SANTOS, S. V.; FOSS, N. T. Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora – MG (Brasil) e região. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, n. 1, p. 41-46, 2005.
- KITCHEN, S.; YOUNG, S.; Reparo dos tecidos. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S.; *Eletroterapia de Clayton*, São Paulo, Ed. Manole, 10ª ed., p.46-58, 1998.
- KNIFFKI, K. D.; MENSE, S.; SCHMIDT, R. F. Muscle receptors with fine afferent fibers which may evoke circulatory reflexes. *Circulation Research*, 48 suppl., p. 25-31, 1981.
- MANDARIM de LACERDA, C. A. Manual de Quantificação Morfológica: Morfometria, Alometria, Estereologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Cébio, 1994. 83 p.
- MATHIEU, O. et al. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *Journal of Microscopy*, v. 121, p. 75-88, 1981.
- ROBINSON, A. J. Electrical stimulation to augment healing of chronic wounds. In: ROBINSON A. J.; SNYDER-MACKLER, L. *Clinical electrophysiology: electrotherapy and electrophysiology testing*. 3ª ed. Williams & Wilkins, 1995.
- ROGENSKI, M. N. B.; SANTOS, V. L. C. G. Estudo sobre a incidência de úlcera por pressão em um hospital universitário. *Revista Latino-Americana Enfermagem*, julho-agosto, v. 13, n. 4, p. 474-80, 2005.
- SILVA, E. F. H.; Estimulação Elétrica de Alta Voltagem em Úlceras Crônicas de Membros Inferiores. 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2009.
- SIMÕES, M. J.; UZUNIAN, A. MORA, O. A. SASSO, W. S. Aspectos ultra-estruturais do processo de reparação da pele de ratos albinos. *Revista Paulista de Medicina*, v. 103, n. 3, p. 123-126, 1985.
- WATSON, T. Estimulação elétrica para a cicatrização de feridas. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S.; *Eletroterapia de Clayton*, São Paulo, Ed. Manole, 10ª ed., p.46-58, 1998.

Anexos

Tabela 1 – Média (cm²) ± desvio padrão da área da lesão e porcentagem de redução nos diferentes tempos após a lesão.

Grupo experimental	Antes do tratamento	3º dia de tratamento	7º dia de tratamento	Redução da
				área da ferida em %
C	1,07 ± 0,13	0,76 ± 0,15	0,41 ± 0,14	61,7
S	1,06 ± 0,34	0,72 ± 0,21	0,45 ± 0,14	57,5
E +	1,18 ± 0,14	0,79 ± 0,09	0,26 ± 0,10	77,9*
E -	1,24 ± 0,18	0,68 ± 0,07	0,26 ± 0,08	79,0*

* diferença significativa (p=0,04) dos grupos S e C.

Tabela 2 – Média e desvio padrão (em µm) da extensão da epiderme, considerando-se a somatória dos dois bordos, sobre o leito da ferida.

Grupo	Média	Desvio padrão
C	1611,15	753,49
S	1534,16	295,27
E +	1221,02	376,07
E -	2638,76	1198,48

Tabela 3 – Média \pm desvio padrão do número de vasos e da densidade de área de vasos (em %).

Grupo	Número de vasos	Densidade de área de vasos (em %)
C	12,56 \pm 4,28	16,30 \pm 3,67
S	13,95 \pm 4,51	21,23 \pm 3,49
E +	12,34 \pm 2,05	21,67 \pm 3,51
E -	14,41 \pm 4,29	20,83 \pm 5,50