



18º Congresso de Iniciação Científica

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

Autor(es)

ANELIZE SARTORI ALVES DOS SANTOS

Orientador(es)

MARIA LUIZA OZORES POLACOW, ELAINE CALDEIRA DE OLIVEIRA GUIRRO

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPQ

1. Introdução

A pele humana é uma interface entre o corpo humano interno e o meio ambiente e a perda de sua integridade pode levar a um aumento da perda de fluido, infecção, comprometimento do sistema imunológico, invasões por células carcinogênicas e hipotermia. Além disso, pode originar cicatriz, com aumento ou diminuição da sensibilidade e mudança na imagem corporal (WYSOCKI, 1999). Diante de um traumatismo tecidual, desencadeia-se um complexo conjunto de eventos vasculares, celulares e bioquímicos que visam a substituição de células mortas ou imperfeitas por células saudáveis, desencadeando um processo de reparação tecidual. O resultado muitas vezes é o fechamento da ferida por tecido cicatricial, faltando folículos pilosos e outros apêndices dérmicos, exibindo um padrão desorganizado de deposição de colágeno, e menor resistência tênsil quando se compara com a pele intacta (DANG e BEANES et al., 2003).

Fundamentada por evidências científicas a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) vem ganhando aceitação tanto na pesquisa quanto na área clínica (PETERS et al., 2001, GARCIA e GUIRRO, 2005).

A EEAV é caracterizada por uma corrente pulsada monofásica de pico duplo, com duração de pulso variando de 5 a 100µs (microsegundos), com tensão acima de 100 V (DAVINI et al.; 2005b). Diversos estudos evidenciam a utilização da EEAV na cicatrização de úlceras crônicas (Feedar, Kloth e Gentzkow, 1991; Fitzgerald e Newsome, 1993; Griffin et al., 1999; Peters et al., 2001; Houghton et al., 2003; Rogenski e Santos, 2005 e Davini et al., 2005a), porém há escassez de estudos que avaliem os efeitos desse recurso em lesões agudas.

Apesar de usada com sucesso em lesões com diferentes etiologias, não têm sido estabelecidos parâmetros ótimos de estimulação com a EEAV para a cicatrização de feridas, é o que aponta Rogenski e Santos (2005) em um estudo, onde analisaram a incidência de úlceras de pressão, a qual incidia em quase 40% dos pacientes.

Configura-se a hipótese de que a EEAV possa abreviar o processo de regeneração tecidual, mediada por diferentes parâmetros físicos e relação dose-dependente nas características morfométricas da lesão aguda.

2. Objetivos

Avaliar os efeitos da EEAV com alternância de polaridade sobre a área e características morfométricas da regeneração tegumentar aguda.

3. Desenvolvimento

Foram utilizados 21 ratos *Wistar* machos, com peso médio de 262,09 g, distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (n=7): Controle (C) - animais com lesão e sem tratamento; Sham (S) - com lesão, porém tratados com o aparelho desligado; (E±) - com lesão e tratados com polaridade alternada.

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

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

Após pesagem os animais foram anestesiados com uma mistura de Dopalen® (Cloridrato de Ketamina) 1,16 g/10 mL e Rompun® (Cloridrato de Xilazina) 2 g/100 mL, na proporção 3:2, em dose de 0,09 mL/100 g e 0,06 mL/100 g de massa corporal,

respectivamente e tricotomizados na região dorsal e abdominal. Logo após, removeu-se 1 cm² da pele do dorso, utilizando um gabarito vasado milimetrado de plástico e bisturi de lâmina 11.

O tratamento com EEAV foi efetuado com o equipamento Neurodyn High Volt - ANVISA 10360310008 - IBRAMED®, sob anestesia e tendo início 24 horas após a cirurgia com estimulação alternada, no limiar motor, diariamente (durante 7 dias), por 30 minutos, frequência de 100 Hz, tensão necessária para um bom nível de estimulação, com aumento da mesma durante as aplicações.

O eletrodo ativo de silicone-carbono, medindo 2,0 x 2,0 cm foi posicionado sobre a lesão e o dispersivo, medindo 4,0 x 4,0 cm, paralelo ao ativo. O acoplamento do eletrodo ativo foi efetuado por gaze estéril embebida em soro fisiológico e o do dispersivo por gel estéril. O grupo S passou pelos mesmos procedimentos do grupo E±, porém sem a liberação da corrente. O grupo C também foi operado, contudo não recebeu nenhum tratamento. A eutanásia dos animais ocorreu no 8º dia pós-operatório, e as lesões foram removidas, fixadas em solução tamponada de formol a 10% por 48 horas e tratadas para inclusão em Paraplast e coloração em Hematoxilina e Eosina.

Foram analisadas medidas lineares da reepitelização (µm), as quais mostraram o avanço da epiderme sadia no tecido lesado. Para ser mensurada, a epiderme em regeneração foi quantificada a partir do bordo da lesão, em ambos os lados, com uma ocular milimetrada Carl Zeiss (KF 10x/18), e objetiva de 4x. Sabendo que o aumento da objetiva gera uma distorção na imagem, foi realizada a calibração da objetiva por meio do coeficiente micrométrico, segundo Mandarim de Lacerda, (1994). Posteriormente, os valores dos dois bordos foram somados, sendo utilizados 15 cortes não seriados por animal.

Para a quantificação da densidade de área dos vasos sanguíneos, inclusive do número dos mesmos, cinco cortes não seriados de cada animal foram selecionados e de três áreas de cada corte foram captadas imagens, sendo uma na região central da lesão e as outras duas próximas aos bordos laterais, totalizando 15 áreas por animal.

Para captação das áreas foi utilizado o *software* Image Pró-Plus® 4.0 (*Media Cybernetics*) e uma câmera digital (JVC), sendo a mesma acoplada a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com objetiva de 10x, e o *software* permitiu visualizá-las em uma área da tela (área de flame) de aproximadamente 190464,12 µm².

Em cada área foi computado o número de vasos sanguíneos e a densidade de área dos mesmos foi obtida por meio de um sistema de planimetria por contagem de pontos, segundo Mathieu et al. (1981) e Mandarim de Lacerda (1994), utilizando-se o mesmo *software*.

A área da lesão foi avaliada por um registro fotográfico padronizado, onde a câmera digital (SAMSUNG - S730) foi posicionada 40 cm perpendicular a superfície da lesão.

O *software* Mateus Poli – versão 2.0, foi utilizado para calcular a distância em pixels (DPixels), referente a 1 cm da régua fotografada junto a lesão. Para mensurar a área da lesão, o registro fotográfico referente ao leito da ferida ainda não cicatrizada, foi marcado na cor preta, através do programa Paint, procedimento realizado para cálculo automático do número pixels pretos na imagem (NPixels). Para o cálculo, a área de 1 pixel (APixel) é dada pela fórmula $(1/(DPixels)) * (1/(DPixels))$, onde 1 corresponde a 1 cm da régua. Para o cálculo da área o programa aplica esta fórmula: NPixels * APixel.

A análise estatística foi realizada 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

Após a análise da área da lesão pelo software, foi observado uma redução das lesões eletroestimuladas em 7 dias, ao comparar com os grupos S e C.

Embora o grupo E± tenha apresentado maior redução de área em relação aos grupos C e S, não foi significativo ($p > 0,05$), como mostra a Tabela 1.

Vários trabalhos como Houghton, et al., (2003) Feedar et al. (1991) e Silva (2009) mostraram redução da área de feridas crônicas tratadas com EEAV.

Neste trabalho, aponta-se o fato da polaridade negativa ser utilizada ao iniciar o tratamento, pelos resultados de um estudo que demonstrou atraso na cicatrização e no fechamento de feridas com aplicação de polaridade positiva nos primeiros quatro dias (BROWN, et al., 1989).

Willians e Carey, (1959), observaram que a polaridade positiva pode induzir a aglutinação de leucócitos e trombose em pequenos vasos, efeitos os quais podem se evitados usando-se a polaridade negativa, portanto, apontam que um protocolo de troca intermitente de polaridade possa reiniciar o processo de cicatrização, fato também observado por Reich e Tarjan (1990).

Pode-se considerar como efeitos inerentes da polaridade positiva e negativa, respectivamente, a contribuição para a reepitelização e diminuição da inflamação e infecção (NELSON; HAYES; CURRIER, 2003).

Na análise histológica da reepitelização não foram obtidos dados significativos entre os diferentes grupos, como mostra a Tabela 2. No entanto observa-se no grupo E± uma média muito maior. Muito provavelmente isto se deva à variabilidade das amostras, detectada pelo desvio padrão elevado. Sugere-se que este estudo histomorfométrico seja acrescido de análises com um maior número de cortes histológicos, para verificar se mantém as diferenças individuais, dentro do mesmo grupo. Outro fator que pode ser considerado é que a maioria dos trabalhos usam polaridades isoladas (BROWN, et al., 1989; WILLIANS e CAREY, 1959; KLOTH e McCULLOCK, 1996; HESS, 2002; NELSON; HAYES; CURRIER, 2003). Outro utiliza polaridade alternada (Reich e Tarjan, 1990), porém com mais dias de tratamento em cada uma das polaridades.

Não foram também encontradas diferenças estatísticas significativas no número ($p = 0,7$), nem na densidade de área de vasos ($p = 0,09$) nos diferentes grupos experimentais (Tabela 3).

Drinkwater et al., (2002), compararam os fluídos de úlceras crônicas e agudas, demonstraram que o exudato das feridas crônicas inibiu a angiogênese. Considerando este fato, no presente trabalho, por se tratar de lesão aguda, não houve inibição da formação de vasos (angiogênese) como seria se a ferida fosse crônica.

Existem eventos fisiológicos que acontecem nas úlceras crônicas, tais como, disfunção celular, desequilíbrio bioquímico, entre outros, que se distinguem das feridas agudas. Portanto se houver alterações em algum dos componentes do processo de cicatrização, como crescimento, proteases e citocinas, há um prejuízo maior nas feridas crônicas em relação à sua cicatrização (ENOCH e HARLING, 2003). Possivelmente seja por este motivo que a EEAV tenha resultados mais eficazes nos estudos com lesões crônicas do que neste trabalho, com lesão aguda.

Outro fato a se considerar é que neste trabalho, as lesões não apresentaram processo infeccioso, ao contrário de uma ulceração em humanos, que tem um déficit vascular muito grande e um acentuado processo infeccioso.

Sugere-se que em futuros estudos, avalie-se melhor a aplicação dos parâmetros da EEAV, como aumento das repetições de dias dos pólos alternados, bem como alteração no modelo experimental, como indução de diabetes, por exemplo.

5. Considerações Finais

A EEAV com pólos alternados, no modelo experimental utilizado, não acelerou a regeneração tegumentar aguda em ratos. Portanto, sugere-se a necessidade de mais estudos que comprovem seu mecanismo de ação.

Referências Bibliográficas

BROWN, M.; MCDONNELL, M. K.; MENTON, D. N. Polarity effects on wound healing using electric stimulation in rabbits. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 70, p. 624 - 627, 1989.

DANG, C.M.; BEANES, S.R. ; SOO, C. ; TING, K. ; BENHAIM, P. ; HEDRICK, M. H.; LORENZ, H. P. Decreased Expression of Fibroblast and Keratinocyte Growth Factor Isoforms and Receptors during Scarless Repair. **Plastic and Reconstructive Surg.** v. 111, p. 1969 - 1979, 2003.

DAVINI R.; NUNES C. V.; GUIRRO E. C. O.; GUIRRO R. R. J. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento.

Rev. Bras. Fisioter., v. 9, n. 3, p. 249 - 255, 2005a.

DAVINI R.; NUNES C. V.; GUIRRO E. C. O.; GUIRRO R. R. J. Tratamento de úlceras cutâneas crônicas por meio da estimulação elétrica de alta voltagem. **Rev Ciênc Méd PUCCAMP**, v. 14, n. 3, 249 - 258, 2005b.

DRINKWATER, S. L.; SMITH, A.; SAWYER, B. M.; BURNARD, K. G. Effect of venous ulcer exudates on angiogenesis in vitro. **Br J Surg**, v. 6, n. 89, p. 709-715, 2002.

ENOCH, S.; HARDING, K. Wound bed preparation: The Science behind the removal of barriers to healing. **Wounds**, v. 7, n. 15, p. 213-229, 2003.

FEEDAR, J. A.; KLOTH, L. C.; GENTZKOW, G. D. Chronic dermal ulcer healing enhanced with monophasic pulsed electrical stimulation. **Physical Therapy**, v. 71, n. 9, p. 639 - 649, Sept 1991.

FITZGERALD, G. K.; NEWSOME, D. Treatment of a large infected thoracic spine wound using high voltage pulsed monophasic current. **Physical Therapy**, v. 73, n. 6, p. 355 - 360, Jun 1993.

GARCIA, L. B.; GUIRRO, E. C. O. Efeitos da estimulação de alta voltagem no linfedema pós-mastectomia. **Rev. Bras. Fisioter.**, v. 9, n. 2, p. 243 - 248, 2005.

GRIFFIN, J. W.; TOOMS, R. E.; MENDIUS, R. A.; CLIFFT, J. K.; ZWAAG, R. V.; EL-ZEKY, F. Efficacy of high voltage pulsed current for healing of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. **Physical Therapy**, v. 71, n. 6, p. 433 - 12, Jun. 1999.

HESS, C. T. **Tratamento de feridas e úlceras**. 4. ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso editores, 2002.

HOUGHTON, P. E.; KINCAID, C. B.; LOVELL, M.; CAMPBELL, K. E.; KEAST, D. H.; WOODBURY, M. G.; HARRIS, K. A. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. **Physical Therapy**, v. 83, n. 1, p. 17 - 28, 2003.

KLOTH, L. C.; MCCULLOCH, J. M. Promotion of wound healing with electrical stimulation. **Advances in wound care**, v. 9, n. 5, p. 42 - 45, 1996.

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.

NELSON, R.M.; HAYES, K.W.; CURRIER, D.P. **Eletroterapia Clínica**. 3ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 2003.

PETERS, E. J.; LAVERY, L. A.; ARMSTRONG, D. G.; FLEISCHLI, J. G. Electric Stimulation as an adjunct to heal diabetic foot ulcers: A randomized clinical trial. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v. 82, n. 6, p. 721 - 725, 2001.

REICH, J. D.; TARJAN, P. P. Electrical stimulation of skin. **International Journal of Dermatology**, v. 29, n. 6, p. 389-458, 1990.

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**, v. 13, n. 4, p. 474 - 480, julho-agosto 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.

WILLIAMS, R. D.; CAREY, L. C. Studies in the production of "standart" venous thrombosis. **An Surg**, v. 3, n. 149, p. 381-387, 1959.

WYSOCKI, A. B. Skin Anatomy, Physiology and Pathophysiology. **Wound Care Management**, v. 34, n. 4, p. 777 - 196, 1999.

Anexos

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
C	12,55 \pm 4,28	16,29 \pm 3,67
S	13,94 \pm 4,51	21,23 \pm 3,49
E \pm	10,40 \pm 3,21	21,08 \pm 5,13

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

Grupo	Média (μm)	Desvio padrão
C	1611,15	753,49
S	1534,16	285,27
E \pm	3190,01	1022,81

Tabela 1 – Média (cm^2) \pm desvio padrão da área da lesão antes e após tratamento e porcentagem de redução das lesões nos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Antes do tratamento	Após o tratamento	Redução da área da ferida em %
C	1,09 \pm 0,11	0,42 \pm 0,14	61,4
S	1,21 \pm 0,15	0,46 \pm 0,16	61,9
E \pm	1,16 \pm 0,21	0,32 \pm 0,11	72,4