



19 Congresso de Iniciação Científica

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM ASSOCIADA À POMADA COM INSULINA NA LESÃO TEGUMENTAR. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM RATOS

Autor(es)

RAFAELA FERREIRA

Orientador(es)

MARIA LUIZA OZORES POLACOW

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPQ

1. Introdução

A reparação de feridas é um processo que integra complexos eventos biológicos e moleculares, com forte interferência entre células e o microambiente ao redor. Compreende várias fases: coagulação, inflamação, migração, proliferação e remodelação, que se sobrepõem no tempo e no espaço (LIU et al., 2009). Diversos estudos evidenciam a utilização da EEAV na cicatrização de úlceras crônicas (FITZGERALD; NEWSOME, 1993; GRIFFIN et al., 1999; PETERS et al., 2001; HOUGHTON et al., 2003; ROGENSKI; SANTOS, 2005; DAVINI et al., 2005a), porém há escassez de estudos que avaliem os efeitos desse recurso em lesões agudas. O uso da insulina em feridas foi relatado há muitas décadas, mas durante muitos anos foi ignorada. Aplicada na forma de spray foi utilizada com sucesso no tratamento de feridas cutâneas em humanos diabéticos (PIERRE et al., 1998) e mais recentemente, Liu et al (2009) mostraram que aplicada topicamente acelerou a reepitelização e a maturação da reparação de feridas, por estimulação da migração e diferenciação de queratinócitos. Como na clínica, o fisioterapeuta também utiliza recursos que aceleram a regeneração de feridas como a EEAV, aventa-se a hipótese de que, associada com tratamento farmacológico com insulina, possa aliar os efeitos regeneradores inerentes ao recurso, bem como a eletroporação que trata-se da utilização de recursos facilitadores da permeação cutânea.

2. Objetivos

Avaliar o efeito dos tratamentos com estimulação elétrica de alta voltagem pólo negativo, pomada de insulina e a associação dos tratamentos em lesão tegumentar de ratos.

3. Desenvolvimento

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, protocolo número 002/10. Foram utilizados 38 ratos Wistar, entre 3 a 4 meses, peso entre 240 e 265 gramas, divididos de forma aleatória, em 6 grupos, com n=7 animais, sendo: Controle (C): animais com lesão e sem nenhum tratamento. EEAV Placebo – (EP): animais com lesão e submetida à simulação de tratamento com EEAV-. EEAV – (E-): animais com lesão tratada com eletro estimulação de alta voltagem

com pólo negativo. Pomada de insulina (PI): animais com lesão tratada com pomada de insulina. Pomada Placebo (PP): animais com lesão tratada com pomada placebo. EEAV pólo – e pomada de insulina (P + EEAV): animais com lesão tratada com EEAV pólo – e com pomada de insulina. Todos os animais foram submetidos ao tratamento durante 7 dias consecutivos, mantidos em gaiolas individuais, com ração e água ad libitum, expostos a ciclo de claro/escuro de 12 horas. Para o procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com mistura de Dopalen (Cloridrato de Ketamina) e Rompum (Cloridrato de Xilazina) na proporção de 2:1, de acordo com a massa corporal (0,09 mL e 0,06 mL para cada 100 g de peso, respectivamente), via intramuscular. Logo após a tricotomia dos pêlos da região dorsal, 1 foi removido 1 cm² de pele, incluindo a hipoderme, com auxílio de um gabarito vazado milimetrado. O tratamento com EEAV, por 7 dias consecutivos, foi feito com pólo negativo, iniciado um dia após a cirurgia, durante 30 minutos por dia no período da tarde, após a indução anestésica (mesma aplicada para o procedimento cirúrgico da lesão), com frequência de 100Hz e intensidade mantida no limiar motor, o que variou de 20 a 100 V, sendo que tentou-se aumentar a intensidade durante o tratamento para evitar a acomodação da corrente elétrica. O equipamento utilizado foi Neurodyn High Volt – ANVISA 10360310008 - IBRAMED®, sendo que o grupo EP foi exposto aos mesmos procedimentos do grupo E-, porem sem a aplicação da corrente elétrica. O tratamento com a pomada de insulina e com a pomada placebo foi iniciado 24 horas após o procedimento da lesão, aplicando 0,7 gramas de pomada por lesão. No grupo P+EEAV a aplicação da pomada foi após a estimulação elétrica e para os grupos SP e PI, foi realizado apenas a aplicação da pomada sobre a ferida. No 8º dia após a lesão cirúrgica, os animais foram submetidos a eutanásia por inalação de gás carbônico e a área da lesão foi retirada e submetida ao processo de preparação histológica para coloração em HE. As medidas lineares (em µm) da re-epitelização foram obtidas a partir do bordo da lesão até a extremidade do epitélio em regeneração em ambos os bordos, em 15 cortes não seriados por animal, utilizando-se uma ocular milimetrada da Zeiss com objetiva de 4x ou 10x. Para as análises de densidade de área de vasos sanguíneos, de cinco cortes não-seriados por animal foram captadas imagens de três áreas em cada corte com dimensões sempre iguais e conhecidas (10.772,96 µm²) totalizando 15 áreas por animal, utilizando-se o Software Image- ProPlus® 6.0 média cybernects, por meio da planimetria por contagem de pontos, segundo Mandarim de Lacerda (1994). Para melhor acompanhamento da área da lesão durante o tratamento, foram registradas imagens com uma câmera digital (SAMSUNG - S730), a 40 cm de distancia da superfície lesionada, sempre com uma régua próximo a lesão. As imagens foram tomadas no primeiro, quarto e oitavo dia após o procedimento cirúrgico. A análise dessas imagens foi feita através de um programa computadorizado, AREA® A análise dos dados da evolução da área da ferida obtida pelas imagens nos diferentes grupos experimentais, considerando os 3 períodos – 1º dia, 4º dia e 8º dia de tratamento, foi utilizado a ANOVA com medidas repetidas. A avaliação intra grupo foi realizada pelo teste de Bon Ferrone e a análise entre grupos foi feita pelo teste de Tamhane. Os dados da epitelização e de vasos sanguíneos foram feitos pela ANOVA seguida do Pos Hoc Tamhane, com nível de 5%.

4. Resultado e Discussão

Observa-se pela Tabela 1, que todos os grupos experimentais apresentaram redução significativa da área da ferida ($p < 0,05$) na análise intra grupos. Já na análise intergrupos, somente houve diferença significativa ($p < 0,04$) no 8º dia entre os grupos E- e EP. Acredita-se que a eletroestimulação acelera o processo de reparação de feridas, por imitar a corrente elétrica que ocorre na pele, quando a mesma é lesada (FOULDS; BARKER, 1983). Os dados aqui apresentados confirmam isto, pois pelos resultados da evolução da área da ferida no 8º dia, observa-se que a única diferença significativa foi no grupo E- e E placebo. A mensuração linear da extensão da epiderme a partir da margem da ferida pode ser observada na Tabela 2. Embora a epitelização tenha aparentemente sido melhor com a associação dos tratamentos (P+EEAV), esta diferença não foi significativa. A aplicação de diferentes polaridades pode interferir na resposta tecidual, uma vez que as várias células presentes na cicatrização podem migrar em função da carga, fato apontado por Kloth e McCulloch (1996), que estudaram os efeitos celulares produzidos pela eletroestimulação com corrente polarizada. Liu et al. (2009) mostraram que a aplicação local de insulina em feridas de ratos estimulou a migração e a diferenciação de queratinócitos, pois diminuiu a área da lesão significativamente após o terceiro dia da lesão, quando comparado ao grupo que não recebeu aplicação de insulina. Neste trabalho, não se observou diferença na epitelização com a aplicação isolada da pomada de insulina. Com a associação dos tratamentos, estimulação elétrica e pomada de insulina os resultados foram melhores, embora sem diferença estatisticamente significante. Muito provavelmente isto se atribui ao desvio padrão muito elevado, o que poderá ser contornado em futuros trabalhos, com aumento do número de animais por grupo experimental. Em relação à densidade de área dos vasos sanguíneos, observa-se pela Tabela 3 que a associação dos tratamentos (P+EEAV) apresentou um valor maior e significativo entre todos os outros grupos. A análise estatística mostrou também que o grupo E- apresenta uma porcentagem de vasos maior, quando comparado com o grupo placebo (EP). A EEAV apresenta alterações vasomotoras com aumento do fluxo sanguíneo que podem estimular o processo de cicatrização (MOHR; AKERS; WESSMAN, 1987). Este trabalho confirma estes dados, pois as lesões dos animais estimulados com polaridade negativa apresentaram densidade de área de vasos significativamente maior do que das encontradas nas lesões de animais tratadas com estimulação placebo. Mostrou também que a associação dos tratamentos apresentou densidade de vasos significativamente maior, comparada com todos os outros grupos experimentais. Estes resultados são importantes, principalmente porque foram obtidos em ratos saudáveis. Infere-se que este recurso poderá ser muito útil quando utilizado em indivíduos com déficit circulatório, como no caso do diabetes mellitus, onde não só as arteríolas são afetadas como também as artérias (REIBER; LIPSKY; GIBBONS, 1998).

5. Considerações Finais

Com base nos resultados apresentados conclui-se que a associação dos recursos pomada de insulina e EEAV aumentou a densidade de área dos vasos sanguíneos no local da lesão. Embora não tenha apresentado diferença significativa, a associação desses recursos apresentou melhores valores quanto a reepitelização, sugerindo que a junção dos efeitos da eletroestimulação de alta voltagem, a umidificação fornecida pela pomada e os efeitos da insulina compõem recursos que associados, são promissores no tratamento de feridas e que justificam a necessidade de se continuar a pesquisar seus efeitos em outros modelos experimentais.

Referências Bibliográficas

DAVINI, R. et al. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. Rev. Bras. Fisioter, v.9, n.3, p.249-256, 2005a. 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.355-6, 1993. FOULDS, I.S.; BARKER, A.T. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. J Dermatol, v.109, n.5, p.515-522, 1983. GRIFFIN, J.W., et al. 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, 1999. HOUGHTON, P.E. et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. Physical Therapy, v.83, n.1, p.17-28, 2003. KLOTH, L.C.; Mc CULLOCH, J.M. Promotion of wound healing with electrical stimulation. Activ Wound Care, v.9, n.5, p.42-45, 1996. LIU, Y. et al. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. BMC cell Biolog, v.10, p.1-15, 2009. MOHR, T.M.; AKERS, T.K; WESSMAN, H.C. Effect of high voltage stimulation on blood flow in the rat hind limb. Phys Ther, v.67, n.6, p.979. PETERS, E.J.; LAVERY, L.A.; ARMSTRONG, D.G.;FLEICHILI, J.G. Electric stimulation as an adjunct to heal diabetic foot ulcers: a randomized clinical trial. Arch Phys Med Rehabil, v.82, n.6, p.721-725, 2001. PIERRE, E.J. et al. Effects of insulin on wound healing. Trauma, v.44, p.342-345, 1998. REIBER, G.E.; LIPSKY, B.A.; GIBBONS, G.W. The burden of diabetic foot ulcers. Am J Surg, v.176, n.2, p.58-108, 1998. 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.474-80, 2005.

Anexos

Tabela 1. Porcentagem de redução da área da ferida em cm² nos diferentes dias, dos grupos: controle – C, EEAV placebo, EEAV pólo negativo, Pomada de insulina, Pomada placebo, Pomada de insulina+EEAV.

Grupos	1º dia	4º dia	8º dia	% de redução
C	1,16 ± 0,15	0,83 ± 0,12	0,46 ± 0,16	60,3%
EP	1,34 ± 0,18	0,90 ± 0,17	0,58 ± 0,17	56,7%
E-	1,28 ± 0,17	0,71 ± 0,09	0,27 ± 0,10	78,9%*
PI	1,11 ± 0,08	0,91 ± 0,17	0,41 ± 0,12	63%
PP	1,31 ± 0,17	1,19 ± 0,30	0,48 ± 0,08	63,3%
P+EEAV	1,11 ± 0,08	0,79 ± 0,05	0,33 ± 0,08	70,3%

* difere da EP e PP

Tabela 3 – Densidade de área de vasos sanguíneos nos diferentes grupos experimentais: C – controle, EP – Tratada com EEAV placebo, E- - Tratada com EEAV pólo -, PI – Tratada com pomada de insulina. PP - Tratada com pomada placebo, e P+EEAV – Tratada com pomada de insulina + EEAV. .

Grupos	Vasos Sanguíneos
C	5,56 ± 1,88
EP	4,38 ± 0,78
E-	6,02 ± 0,82#
PI	6,13 ± 1,69
PP	4,72 ± 2,84
P+EEAV	15,02 ± 5,47*

(*) Difere do C, EP e do PP

(#) Difere do EP

Tabela 2 – Média ± Desvio Padrão (em µm) da extensão da epiderme sobre a superfície da ferida dos grupos: C – controle, EP – Tratada com EEAV placebo, E- - Tratada com EEAV pólo -, PI – Tratada com pomada de insulina. PP - Tratada com pomada placebo, e P+EEAV – Tratada com pomada de insulina + EEAV.

Grupos	Reepitelização
C	1615,93 ± 1345,62
EP	1504,04 ± 1436,76
E-	1437,70 ± 506,81
PI	1443,75 ± 228,82
PP	1845,30 ± 692,77
P+EEAV	1936,76 ± 437,80