



JANAINA TICIANE GENARO

***ESTIMULAÇÃO COM CORRENTE PULSADA DE ALTA VOLTAGEM
NA CICATRIZAÇÃO DE ÁREAS CRUENTAS.
MODELO EXPERIMENTAL COM RATOS WISTAR***

CAMPINAS

2013

i

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

JANAINA TICIANE GENARO

**ESTIMULAÇÃO COM CORRENTE PULSADA DE ALTA VOLTAGEM
NA CICATRIZAÇÃO DE ÁREAS CRUENTAS. MODELO
EXPERIMENTAL COM RATOS WISTAR.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Kharmandayan

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção
do Título de **Mestra em Ciências**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA JANAINA TICIANE GENARO E ORIENTADA PELO
PROF. DR. PAULO KHARMANDAYAN

Assinatura do orientador

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica

Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G285e Genaro, Janaina Ticiane, 1987-
Estimulação com corrente pulsada de alta voltagem na cicatrização de áreas cruentas : modelo experimental com ratos Wistar / Janaina Ticiane Genaro. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Paulo Kharmandayan.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cicatrização. 2. Terapia por estimulação elétrica. I. Kharmandayan, Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Stimulation with high voltage pulsed current in healing acute wounds : experimental model with Wistar rats

Palavras-chave em inglês:

Healing

Electric stimulation therapy

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Paulo Kharmandayan [Orientador]

Antonio Gonçalves de Oliveira Filho

Adriana Pertille

Data de defesa: 23-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JANAINA TICIANE GENARO

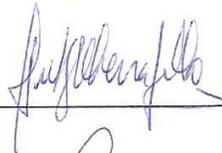
Orientador (a) PROF(A). DR(A). PAULO KHARMANDAYAN

MEMBROS:

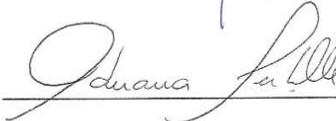
1. PROF(A). DR(A). PAULO KHARMANDAYAN



2. PROF(A). DR(A). ANTONIO GONÇALVES DE OLIVEIRA FILHO



3. PROF(A). DR(A). ADRIANA PERTILLE



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 23 de julho de 2013

Dedico este trabalho a Deus, pois, se hoje sou e estou aqui é graças a ele.

À minha família que sempre está ao meu lado dando apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãe, sempre ao meu lado nos momentos de tristezas e alegrias. Nem em toda minha vida conseguirei retribuir tudo que você faz por mim. Muito obrigada e Te Amo muito.

Ao meu pai, meu irmão, cunhada e meu avô pelo auxílio nos finais de semana. De coração sou muito grata.

Ao Alexandre meu noivo que sempre me apoiou, presente em todas as etapas deste sonho, muito obrigada. Você foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.

A Ana Cristina de Moraes e Willian Adalberto Silva do Núcleo de Cirurgia Experimental, pela participação desde o início, me ensinando passo a passo. Sou eternamente grata a vocês.

Ao Valdemir Benedito Costa e Miguel Luiz Candido pelo auxílio na preparação dos animais.

Ao Prof. Dr. Paulo Kharmandayan, que me deu a oportunidade para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, onde obtive um grande conhecimento científico e profissional.

Ao Dr. Davi R. Calderoni pelo programa de análises.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na conclusão desse trabalho.

Pode um homem tornar-se culto pela cultura dos outros, mas só se torna sábio pelas suas próprias experiências.

Mansour Chalita

RESUMO

A reparação tecidual é de grande interesse para os profissionais da área da saúde. Sua eficiência acelera o processo de reabilitação, o retorno ao trabalho, atividades de lazer e até ao convívio social. Existem evidências de que a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) pode diminuir a dor e facilitar o reparo tecidual.

Este trabalho tem por finalidade avaliar macroscopicamente e microscopicamente o efeito da aplicação da corrente pulsada de alta voltagem (CPAV) na cicatrização de áreas cruentas em ratos.

Foram utilizados 72 ratos da linhagem Wistar. Todos animais foram submetidos à confecção de duas feridas padronizadas e localizadas uma na região dorso-cranial (ferida A) e outra dorso-caudal (ferida B). Estes animais foram distribuídos em 4 grupos G3, G5, G7 e G9, relativos à data de sacrifício nos dias 3, 5, 7 e 9, pós-procedimento. Cada grupo (n = 18) foi novamente distribuído em sub-grupo tratamento caudal (n=6), sub-grupo tratamento cranial (n=6) e sub-grupo controle (n=6).

Os grupos tratados receberam EEAV modo contínuo, frequência de 100 Hz, tempo de 30 minutos e uma intensidade média de 8mA regulada com aumento da amplitude, até observar-se uma contração muscular leve na região estimulada. O tratamento com EEAV foi realizado, com os animais em uma contensão, diariamente após as primeiras 24h da cirurgia, exceto no dia do sacrifício.

Foram observadas as variações macroscópicas em relação área das feridas ao longo das fases pós-procedimentos, a presença ou não de secreção, e as alterações microscópicas morfológicas como proliferação fibroblástica, formação de neovasos, organização das fibras de colágeno, células mononucleares, polimorfonucleares e presença de tecido necrótico.

Para a análise macroscópica utilizou-se o programa Auto Desk Design Review - 2012 e para a microscópica as colorações Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson.

Os testes estatísticos utilizados foram análise de variância e a ANOVA para medidas repetidas, teste de Tukey, regressão de Poisson, nível de significância 5%.

Os resultados mostram que após o tratamento, os ratos do subgrupo região cranial apresentaram uma redução mais significativa da ferida (ferida A) ($p < 0,0001$) e a interação entre o local das feridas também foi significativa com $p = 0,0110$, ou seja, se estimular a ferida A, a ferida B também cicatriza e se estimular a ferida B, a ferida A também vai cicatrizar mais rápido. Microscopicamente para as variáveis proliferação fibroblástica, fibras colágenas, neovasos, células polimorfonucleares e mononucleares não foi observado diferença significativa, apenas para tecido necrótico $p = 0,0384$.

Concluimos que histologicamente não houve melhora e macroscopicamente a EEAV induziu uma contração maior das feridas, principalmente quando o estímulo foi aplicado na área cranial do animal.

Palavra chave: Alta Voltagem, Cicatrização, Eletroestimulação.

ABSTRACT

Tissue repair is a great interest to health professionals. Its efficiency accelerates the process of rehabilitation, return to work, leisure activities and even to social life. There is evidence that stimulation with high voltage (HVPS) can decrease pain and facilitate tissue repair.

This study aims to evaluate macroscopically and microscopically the effect of the application of high voltage pulsed current (HVPC) in the healing of acute wounds in rats.

We used 72 male Wistar rats. All animals underwent two wounds will manufacture standard and located one on the dorsal-cranial (A sore) and one dorsal-caudal (B wound). These animals were divided into 4 groups G3, G5, G7 and G9, on the date of sacrifice on days 3, 5, 7 and 9 post-procedure. Each group (n = 18) were again distributed to sub-flow treatment group (n = 6) sub-cranial treatment group (n = 6) and the sub-control group (n = 6).

The groups received HVES continuous mode frequency of 100 Hz, a time of 30 minutes and an average intensity of 8mA regulated with increased amplitude, to observe a slight muscle contraction in the region stimulated. HVES treatment was performed with the animal in a restraint, daily in the first 24 hours after surgery, but on the day of sacrifice.

Macroscopic changes were observed over the wound area along the stages post-procedure, the presence or absence of secretion, and microscopic morphological changes as fibroblast proliferation, formation of new vessels, the organization of collagen fibers, mononuclear cells, and polymorphonuclear presence necrotic tissue.

For the macroscopic analysis, we used the Auto Desk Design Review - 2012 and the microscopic stains hematoxylin-eosin and Masson Trichrome.

The tests were used for statistical analysis of variance and repeated measures ANOVA, Tukey test, Poisson regression, significance level of 5%.

The results show that after treatment, the rats of the cranial subgroup showed a more significant reduction of the wound (wound) ($p < 0.0001$) and the interaction between the location of the wound was also significant at $p = 0.0110$, or

is, to stimulate the wound a, B also heals the wound and stimulate wound B, the wound will also heal faster. Microscopically for the variables fibroblast proliferation, collagen fibers, new vessels, polymorphonuclear and mononuclear cells was not observed significant difference, only necrotic tissue $p = 0.0384$.

We conclude that there was no improvement histologically and macroscopically HVES induced a greater contraction of wounds, especially when the stimulus was applied to the cranial area of the animal.

Keyword: Electro-stimulation, Healing, High Voltage.

FIGURAS

Figura 1: Corrente pulsada monofásica de alta voltagem	31
Figura 2: Áreas demarcadas com um carimbo	42
Figura 3: Procedimento cirúrgico	42
Figura 4: Aparelho de Alta Voltagem e capacitores	43
Figura 5: Disposição dos eletrodos no subgrupoTcr	44
Figura 6: Disposição dos eletrodos no subgrupoTc	45
Figura 7: Capacitores usados durante o tratamento	45
Figura 8: Animais em tratamento	46
Figura 9: Incisões para obtenção do material para análise	47
Figura 10: Peças obtidas	47
Figura 11: Áreas demarcadas e mensuradas pelo programa	50
Figura 12: Fotomicrografia de ferida. Observar intensa neovascularização em derme superficial. H.E. 200x, tratamento cranial PO5	54
Figura 13: Fotomicrografia de ferida. Observar concentração de polimorfonucleares indicada pela seta. HE. 200x, grupo controle PO5.	56
Figura 14: Fotomicrografia de ferida. Observar proliferação fibroblástica imatura formando feixes irregulares junto a proliferação vascular na derme superficial. H.E.400x, grupo tratamento cranial PO7	57
Figura 15: Fotomicrografia de ferida.Observar colágeno (azul) junto a área lesada vermelha. Masson. 200x, grupo tratamento caudal PO9.	58

ESQUEMAS

Esquema 1: Distribuição dos grupos

39

GRÁFICOS

Gráfico 1: Valor médio da variação da área em percentual para cada grupo, local da lesão e tratamento.	53
Gráfico 2: Intensidade de neovascularização nas lâminas de cada grupo	54
Gráfico 3: Intensidade de polimorfonucleares nas lâminas de cada grupo	55
Gráfico 4: Intensidade de mononucleares nas lâminas de cada grupo.	55
Gráfico 5: Intensidade de proliferação fibroblástica nas lâminas de cada grupo.	56
Gráfico 6: Intensidade de fibras colágenas nas lâminas de cada grupo.	58
Gráfico 7: Intensidade de tecido necrótico nas lâminas de cada grupo.	60

QUADROS

Quadro 1: Polaridades aplicadas segundo cada grupo, polaridade positiva(+) e polaridade negativa (-).	42
Quadro 2: Análise descritiva e comparações da variação percentual da área entre grupos, tratamentos e locais	51
Quadro 3: Valores médios percentuais de redução das áreas segundo os grupos.	52
Quadro 4: Resultados da ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos:	52
Quadro 5: Fixando locais e comparando tratamentos	52
Quadro 6: Análise descritiva da variável Tecido Necrótico entre grupos, tratamentos e locais. Modelo de Poisson	59

ANEXOS

Anexo 1: Análise descritiva e comparação da área entre tratamentos, locais e tempos em cada grupo	78
Anexo 2: Análise descritiva e comparação da proliferação vascular entre grupos, tratamentos e locais	79
Anexo 3: Análise descritiva das células mononucleares entre grupos, tratamentos e locais	80
Anexo 4: Análise descritiva da variável polimorfonucleares entre grupos, tratamentos e locais	81
Anexo 5: Análise descritiva da variável proliferação fibroblástica entre grupos, tratamentos e locais	82
Anexo 6: Análise descritiva da variável fibras colágenas entre grupos, tratamentos e locais	83
Anexo 7: Carta de Aprovação- CEUA	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	- Adenosina trifosfato
a.C	- Antes de Cristo
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEMIB	- Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da ciência em animais de laboratório
cm	- Centímetros
cm ²	- Centímetros quadrados
CEUA	- Comissão de ética no uso de animais
CTAP III	- Ativação tecido conjuntivo peptídeo III
C	- Controle
CA	- Corrente alternada
CC	- Corrente contínua
CD	- Corrente direta
CP	- Corrente Pulsada
CPAV	- Corrente Pulsada de Alta Voltagem
DNA	- Ácido Dioxirribonucléico
EEAV	- Eletroestimulação de alta voltagem
FDA	- Administração de alimentos e medicamentos
Fibras Colag.	- Fibras Colágenas
HE	- Hematoxilina Eosina
Hz	- Hertz
HVPC	- High voltage Pulsed Current
HVPS	- HighVoltage Pulse Stimulation
Hs	- Horas
IBRAMED	- Ibramed Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos
LTDA	
IEC	- Comissão International de Eletro tecnologia

VETPAT	- Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
	Veterinária
μC	- Micro corrente
μs	- Microsegundo
mA	- Milliampere
mg	- miligrama
mm	- Milímetros
Mononucl.	- Mononucleares
ms	- Milissegundo
NBR	- Norma Brasileira
P/M/G	- Pouco/Média/Grande quantidade
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PO	- Pós-operatório
POI	- Pós-operatório imediato
pH	- Potencial de Hidrogênio
PPS	- Pulsos por segundo
Prolif. Fibro.	- Proliferação Fibroblástica
Prolif. Vasc.	- Proliferação Vascular
Polimorf.	- Polimorfonucleares
kg	- quilograma
TGFβ	- Transforming growth factor beta
TC	- Tratamento cauda-crânio
TCr	- Tratamento crânio-caudal
Tec Necro	- Tecido Necrótico
TecNecroC	- Tecido Necrótico Caudal
Tec NecroCr	- Tecido Necrótico Cranial
TT	- Tratamento
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
VarC	- Variável Caudal
VarCr	- Variável Cranial

SUMÁRIO

1 –INTRODUÇÃO.....	21
2 – OBJETIVO.....	22
2.1 - Geral.....	22
2.2 - Específicos.....	22
3 – Feridas.....	23
4 - Cicatrização.....	23
4.1- Fatores que influenciam o processo de cicatrização.....	23
4.2 - Processos de neoformação vascular (angiogênese).....	24
4.3 - Recursos utilizados na cicatrização.....	24
4.4 - Histórico da Eletroterapia	25
4.4.1 - Eletrodos	27
4.4.2 - Polaridade.....	29
4.4.3 - Frequência dos pulsos	29
4.4.4 - Pulsos.....	30
4.4.5 - Amplitude	30
4.5 - Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV)	31
4.5.1- EEAV no reparo tecidual	34
4.5.2 - Contra-indicações da eletroestimulação	37
5 - MÉTODOS.....	38
5.1- Aprovação pelo Comitê de Ética	38
5.2 - Modelo Animal	38
5.3 - Distribuição dos grupos e tratamento.....	38
5.3.1- Sub-grupo Controle (SGC)	41
5.3.2 - Sub-grupo Tratamento (SGT)	41
5.4 - Procedimento cirúrgico	41
5.4.1 - Anestesia.....	41
5.4.2 - Cirurgia	41
5.5 - Equipamentos de eletroestimulação e técnica.....	42
5.6 – Obtenção e Medição de imagens	46
5.7 - Eutanásia e Obtenção da Amostras.....	47
5.8 - Preparação das lâminas para análise histológica	48
5.9 - Critérios para análise histológica das amostras	48
5.10 - Método estatístico.....	49
6 – RESULTADOS	50
6.1 - Análise Macroscópica	50
6.2 - Análise Histológica	54
7 – DISCUSSÃO	61
8 – CONCLUSÃO	68
9 – REFERÊNCIAS	70
10– ANEXOS	79

1 – Introdução

As feridas ou úlceras podem ser conceituadas como rupturas de estruturas anatômicas do corpo, que levam ao comprometimento da função fisiológica dos tecidos envolvidos. Implicam numa solução de continuidade, aguda ou crônica, na superfície dérmica ou mucosa, acompanhada de processo inflamatório (1)(2).

Essas sequelas afetam a imagem corporal e a auto-estima das pessoas, levando-as muitas vezes ao auto-isolamento e ao abandono de seus projetos, tendo grande repercussão em sua vida familiar, social e profissional, frequentemente atingindo camadas menos favorecidas da sociedade (3).

A reparação tecidual é de grande interesse para os profissionais da área da saúde. Sua eficiência acelera o processo de reabilitação, com subsequente retorno mais rápido ao trabalho, atividades de lazer e até o convívio social (4).

Agentes físicos como a eletricidade, os campos magnéticos ou elétricos e o ultrassom terapêutico podem influenciar positivamente o resultado do processo de cicatrização ou regeneração de diferentes tecidos como pele, ossos, músculos, tendões e nervos periféricos (5).

Existem evidências de que a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) possa diminuir a dor, facilitar o reparo tecidual e ainda minimizar a gravidade das lesões por estresse repetitivo, entretanto existe uma escassez de trabalhos sobre feridas agudas (6).

Desta forma, ao diminuir-se o tempo de internação, infecção e de imobilidade no leito, aumenta-se a qualidade de vida do paciente, reduzindo os gastos de internação hospitalar.

2 - Objetivo

2.1 - Geral

Analisar os efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) na cicatrização de áreas cruentas.

2.2 -Especificos

- Analisar os seguintes processos biológicos envolvidos na cicatrização de áreas cruentas: contração da ferida, neovascularização, organização das fibras de colágeno, presença de mononucleares e polimorfonucleares, proliferação fibroblástica, e presença de tecido necrótico, utilizando EEAV quando comparado ao grupo controle.

- Analisar se existe influência da estimulação de uma ferida com EEAV em outra ferida no mesmo animal.

3- Feridas

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque (7).

Sua classificação constitui importante forma de sistematização, necessária para o processo de avaliação e registro. Assim, as feridas podem ser classificadas, de acordo com o tempo de reparação tissular, em agudas e crônicas. As feridas agudas são originadas de cirurgias ou traumas e a reparação ocorre em tempo adequado, sem complicações. As feridas crônicas são aquelas que não são reparadas em tempo esperado e apresentam complicações (8).

Outra classificação se refere às estruturas comprometidas, e consiste na descrição anatômica da profundidade da ferida. Este sistema é adotado para estadiar alguns tipos de feridas crônicas, como as úlceras por pressão e as queimaduras. O sistema de classificação por extensão do dano tissular completa o anterior. Engloba a ferida superficial (limitada à epiderme), ferida com perda parcial (limitada à epiderme e porção superior da derme) e a perda total (existe destruição da epiderme, derme, tecido subcutâneo, podendo invadir músculos, tendões e ossos) (8)(9).

4 - Cicatrização

4.1 - Fatores que influenciam o processo de cicatrização

O processo de cicatrização é influenciado por fatores locais ou sistêmicos, que podem acelerá-lo, reduzi-lo, retardá-lo ou impedi-lo (10).

Entre os fatores que podem retardar o processo de cicatrização estão a infecção, a presença de corpos estranhos que mantêm a reação inflamatória em atividade, fatores mecânicos (movimentação precoce das feridas) e irradiações que interferem nas mitoses e podem causar úlceras crônicas (10)(11).

Entre os fatores locais que aceleram o processo temos os curativos e cremes como o hidrogel e a papaína.

Por outro lado, os fatores sistêmicos mais comuns são: desnutrição, falta de vitamina C (inibe a síntese de colágeno), distúrbio metabólico (diabetes), estado circulatório com inadequado suprimento sanguíneo e hormônios, como os glicocorticóides, os quais possuem efeitos anti-inflamatórios, que influenciam diversos componentes da inflamação e da fibroplastia, além de inibirem a síntese de colágeno.

4.2- Processos de neoformação vascular (angiogênese)

Angiogênese é a formação de vasos a partir do brotamento de uma árvore vascular preexistente e que participa em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o crescimento tumoral e de metástases (12)(13).

A importância da angiogênese está baseada no fato de que este processo é a chave numa série de eventos fisiológicos como a cicatrização das feridas, o que faz de todos os mecanismos que participam na angiogênese alvos promissores da terapêutica, neste grupo chamados angiogênese-dependente (14).

4.3 – Recursos utilizados na cicatrização

Em todas as civilizações, há relatos de tratamento de feridas com o uso de curativos, bálsamos e retalhos, descritos em caracteres cuneiformes, em papiros, e por tradição oral (15)(16).

Atualmente está sendo muito utilizado a oxigenioterapia hiperbárica (OHB). Esta é uma modalidade terapêutica que consiste na oferta de oxigênio puro ($FiO_2 = 100\%$) em um ambiente pressurizado a níveis acima da pressão atmosférica, habitualmente entre duas e três atmosferas. A OHB pode ser aplicada em câmaras com capacidade para um paciente (câmara monopaciente ou monoplace) ou para diversos pacientes (câmara multipaciente ou multiplace) (17).

O método de curativo tópico a vácuo é um sistema utilizado na cicatrização de feridas em que se institui uma pressão negativa localizada e controlada, com o objetivo de estimular a granulação e a cicatrização. Promove a vasodilatação arterial e, conseqüentemente, o aumento do fluxo sanguíneo nos tecidos, estimulando a formação de tecido cicatricial de granulação. A remoção dos fluidos diminui o edema, a pressão intersticial e a colonização bacteriana, criando um ambiente úmido benéfico para a migração epitelial e a cicatrização. Além disso, a pressão negativa atrai os bordos da ferida ao centro, diminuindo sua dimensão (18).

Agentes físicos como a eletricidade, os campos magnéticos ou elétricos, laser e o ultrassom podem influenciar positivamente o resultado do processo de cicatrização de diferentes tecidos como a pele, os ossos, os músculos e tendões e os nervos periféricos (5).

4.4 - Histórico da Eletroterapia

Os agentes eletrofototerapêuticos são usados pelos fisioterapeutas para tratar uma grande variedade de condições. Esses agentes incluem ondas eletromagnéticas e sonoras, além de correntes estimuladoras de músculos e nervos. Em parte, essas técnicas são usadas para induzir o aquecimento dos tecidos (19).

Há evidências de que os egípcios antigos usavam peixes elétricos para tratar doenças em 2500 a.C, contudo seu relato só ocorreu em 46 d.C por Scribonius Largus. No século XVIII houve um aumento do uso da eletricidade na medicina devido ao desenvolvimento de geradores elétricos. Porém sua popularidade apresentou um declínio no século XIX e no início do século XX, devido aos resultados clínicos variados e técnicas alternativas (20).

O interesse no uso de eletricidade para aliviar a dor foi despertado novamente por Melzack e Wall em 1965, ao proporem que a transmissão de informações nocivas poderia ser inibida pela atividade de aferentes periféricos de diâmetros largos ou pela atividade de vias descendentes do cérebro relacionadas à inibição da dor. Na década de 80, houve um aumento na popularidade da

estimulação elétrica determinando o desenvolvimento de estudos e técnicas para avaliar seus efeitos e resultados, determinando a expansão para além da modulação do controle da dor (21).

O conhecimento de que a condução elétrica altera eventos fisiológicos e patológicos em sistemas biológicos é tão antigo quanto à descoberta de que os sistemas biológicos são condutores (21).

Durante séculos, os antigos filósofos especularam sobre a natureza do calor e do frio. As opiniões eram divididas quanto ao fato de o calor ser uma substância ou um efeito do movimento das partículas, mas no século XVIII, os físicos e bioquímicos chegaram à conclusão de que a velocidade de movimento das moléculas constituintes do corpo ou objeto dava aos nossos sentidos a impressão de calor ou de frio. Dr. J. P. Joule, de Manchester, no ano de 1840, desenvolveu com precisão uma pesquisa sobre a relação entre o trabalho feito ao se mover um aparelho elaborado para agitar a água e o calor desenvolvido ao realizá-lo. Ele mostrou de maneira muito clara que a quantidade de calor produzido por fricção dependia da quantidade de trabalho feito. Subsequentemente, seu trabalho também contribuiu para a teoria da correlação das forças e em 1847 ele enunciou a lei da conservação de energia (a base da primeira lei da termodinâmica) (19).

Tornou-se aceita a visão que o calor pode ser considerado uma forma de energia que pode ser transformada em outras formas de energia, como elétrica ou mecânica. A teoria supunha que, quando um corpo é aquecido, a elevação na temperatura deve-se ao aumento da energia do movimento das moléculas naquele corpo. A teoria ia além e explicava a transmissão da energia radiante de um corpo para outro, como a do sol para um indivíduo sobre a terra (19).

Foram encontradas evidências a favor da suposição de que a luz é uma onda eletromagnética e exatamente as mesmas evidências foram obtidas com relação à energia radiante. Apesar do fato das ondas de calor radiante (ou seja, radiações infravermelho) terem um comprimento de onda mais longo do que as ondas de luz, suas características físicas são as mesmas. Sugere-se, portanto, que as moléculas de um corpo quente se acham em um estado de rápida vibração

ou são o centro de distúrbios periódicos rápidos, produzindo ondas eletromagnéticas que correm entre o corpo quente e o corpo que as recebe e causando, assim, um movimento similar nas moléculas. O senso de calor pode assim ser estimulado em um organismo por meio de ondas de energia de calor radiante que começam em um objeto quente, do mesmo modo que o sentido da visão é estimulado por ondas de luz que começam em um objeto luminoso(19).

Uma compreensão do movimento das ondas é central para dominar a física de qualquer forma de terapia que utilize energia elétrica ou mecânica (19).

Estudos realizados com uso de energias elétricas ou mecânicas mostram melhora no controle de edema em membros, reações inflamatórias, lesões e feridas de cicatrização lenta, atrofia muscular e déficit de controle motor associados a lesões ortopédicas e neurológicas, problemas circulatórios, disfunções do movimento articular, problemas posturais e incontinências associadas à fraqueza dos músculos pélvicos (21).

Segundo Low e Reed (22), no campo da medicina física e da reabilitação, os estimuladores elétricos devem ser classificados como corrente direta (CD) ou contínua (CC), corrente alternada (CA) e corrente pulsada (CP). O termo *direta* refere-se a um fluxo de elétrons sem interrupção em uma só direção; o termo *alternada* descreve o fluxo ininterrupto de elétrons, porém ocorrendo em duas direções; já o termo *pulsada* indica que o fluxo de elétrons é periodicamente interrompido e pode ser unidirecional (monofásica) ou bidirecional (bifásica).

4.4.1 - Eletrodos

São o meio pelo qual o fluxo de elétrons do circuito de saída do aparelho é convertido em fluxo de corrente iônica nos tecidos. A energia elétrica para terapia necessita ser aplicada aos tecidos com pelo menos dois eletrodos, assim formando um circuito completo. O local onde ocorrem as trocas de elétron para íon e de íon para elétron é chamado de interface eletrodo-tecido (22).

O efeito de oposição ao fluxo da corrente é conhecido como impedância; e a pele por ser composta principalmente por queratina e por possuir

pouco fluido oferece maior oposição ao fluxo da corrente. A aplicação de correntes de alta voltagem pode diminuir essa impedância da pele. Em geral frequências mais altas podem minimizar a impedância da pele (21).

Segundo Low e Reed (22) existem três sistemas básicos de eletrodos: o eletrodo metálico maleável como uma folha de metal ou alumínio ligados à pele com água em gaze ou espuma; o segundo sistema envolve eletrodos que se moldam à superfície do corpo mais facilmente. Estes são feitos de borracha siliconada impregnada de carbono; o terceiro sistema é através de um banho de imersão na água em que a parte do corpo é imersa com um eletrodo.

Os eletrodos apresentam várias formas, tamanhos e arranjos. Esses fatores podem afetar uma variável muito importante da estimulação: a densidade da corrente, que é quantidade de fluxo de corrente por unidade de área. Em geral, quanto maior a densidade de corrente, maior será o efeito. Os determinantes da densidade de corrente são o fluxo total da corrente no circuito de saída do estimulador e o tamanho da área de aplicação (21).

Para se obter resultados positivos na aplicação de tratamento com correntes foram desenvolvidos protocolos de aplicação:

- Monopolar – um eletrodo é colocado para controlar a polaridade no sítio da ferida. O eletrodo ativo é posto sobre a ferida e o dispersivo sobre local sadio. A polaridade do eletrodo ativo será selecionada no estimulador. Quanto maior a distância entre os eletrodos maior é a profundidade do fluxo de corrente para os tecidos (22).

- Técnica bipolar – posicionam-se os dois cabos com seus respectivos eletrodos, em cada lado da área alvo. Os eletrodos com polaridades opostas podem ser colocados na área sem lesão e próximo a região da ferida para que a corrente passe entre eles através do tecido da lesão. No caso de feridas superficiais é recomendada proximidade dos eletrodos. Uma aplicação dessa técnica é posicionar os eletrodos um em cada lado da ferida para que a corrente flua através desta para todos os lados de uma só vez (22).

4.4.2 - Polaridade

Sabe-se que o mais importante dos fatores para efeito de uma corrente aplicada é a densidade de corrente, mas a polaridade também deve ser considerada. Em grande parte das pesquisas, realizadas sobre a eletroestimulação para cicatrizar feridas, inicia-se com pólo negativo sendo o eletrodo ativo e, após um período, realiza-se a inversão das polaridades (21).

Para que se estabeleça uma corrente iônica nos tecidos, é necessário que eletrodos tenham cargas opostas. Os íons positivos são atraídos pelo eletrodo com maior concentração de elétrons que é conhecido como *ânodo* ou *eletrodo negativo*. O eletrodo com escassez relativa de elétrons é conhecido como *cátodo* ou *eletrodo positivo* e atrai os íons negativos e também elétrons livres dos tecidos subjacentes (21)(22).

Protocolos como os de Feedar, et al. (23), Gentzkow e Miller (24), Gentzkow e Pollac (25), Griffin, et al. (26), Houghton, et al. (27), mostram diferentes aplicações da polaridade, buscando encontrar o melhor resultado da aplicação nos tecidos; porém nota-se uma escassez de publicações sobre o assunto, e os resultados obtidos ainda deixam dúvidas quanto aos parâmetros ideais no tratamento com utilização da eletroestimulação de alta voltagem (28).

4.4.3 -Frequência dos pulsos

Frequência dos pulsos é a taxa de repetição dos pulsos. O número de pulsos por segundo pode ser representados por Hertz (Hz) ou pps (pulsos por segundo). A frequência de pulso é uma variável que sofre alterações de estudo para estudo sem muita explicação. Nelson, et al. (21) trazem o protocolo para cicatrização de feridas em que Sussman separou as faixas de frequência de pulsos, de acordo com as fases de cicatrização: Edema (30-50 pps); Inflamação (30 pps); Proliferação (100-128 pps); Epitelização (60-64 pps); Remodelamento (60-64 pps); Retorno Venoso (40-60 pps).

4.4.4 – Pulsos

O termo “pulso” mostra que o fluxo dos elétrons é interrompido por um tempo, podendo ser Unidirecional (monofásico) ou Bidirecional (bifásico). Independente das formas de onda, todos os estimuladores de corrente pulsada apresentam um espaço de tempo entre pulsos sucessivos (Kloth e Cummings (29); Starkey (30)). Em um pulso monofásico há apenas uma fase para cada pulso, o fluxo da corrente é unidirecional, indicando que a polaridade de um eletrodo é positiva e o outro negativo. O pulso bifásico é caracterizado quando duas fases opostas estão contidas em um único pulso. Uma corrente pulsada (CP) é definida como uma corrente elétrica que é conduzida como sinais de curta duração. Os pulsos duram poucos milissegundos (ms) ou microssegundos (μ s), seguidos por intervalos. Os protocolos e estudos publicados fazem uma relação ainda não definida da frequência do pulso, durante as fases de cicatrização (21).

4.4.5 – Amplitude

Um Ampere é uma unidade de medida para uma corrente elétrica. É a quantia de corrente produzida pela força da movimentação dos elétrons de um volt agindo pela resistência de um ohm. Pequenas correntes são medidas em miliampere (mA). A amplitude pode ser relatada em miliamperes ou em voltagem que é a unidade de medida da força da movimentação dos elétrons, ou diferença de potencial, que causará uma corrente de um ampere fluir por uma resistência de um ohm (21).

Alguns protocolos de CPAV (corrente pulsada de alta voltagem) trazem amplitudes de 100 a 200 V, os de corrente direta de baixa voltagem pedem amplitude de 35 mA e na estimulação de microamperagem de baixa voltagem tem uma amplitude menor que 1 mA. A amplitude deve ser ajustada de acordo com o conforto do paciente. Uma sugestão para testar a amplitude é ir estimulando até que se perceba a contração muscular sob o eletrodo. Podem ser utilizados os

medidores de corrente para verificar o fluxo de corrente nos dois eletrodos. Caso não seja possível um relato sensitivo, outras formas podem ser adotadas como teste. Um modo é posicionar o eletrodo dispersivo sobre um ponto motor do músculo para verificar se há um espasmo de contração muscular sob o eletrodo (21).

4.5-Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV)

Um desenvolvimento mais recente no uso da estimulação elétrica para regeneração de feridas utiliza uma corrente direta pulsada aplicada com alta voltagem, conhecida como estimulação galvânica pulsada de alta voltagem (HVPGS - high- voltage pulsed galvanic stimulation) ou corrente pulsada de alta voltagem (HVPC – high voltage pulsed current) (31).

A corrente pulsada de alta voltagem (EEAV) é definida como corrente de baixa frequência, pulsada, monofásica de dois picos gêmeos com uma base de corrente contínua de baixa amplitude (Figura 1). Possui uma duração de pulso de 5 a 100 μs , um pico de corrente elevado (2500mA), baixa intensidade (1,2mA a 1,5mA), baixos valores de carga de fase (12 a 14 μC), grandes intervalos interpulsos e alta voltagem (acima de 100 V), possibilitando uma estimulação relativamente agradável, capaz de atingir as fibras nervosas sensoriais, motoras e também aquelas responsáveis pela condução de impulsos nociceptivos (28).

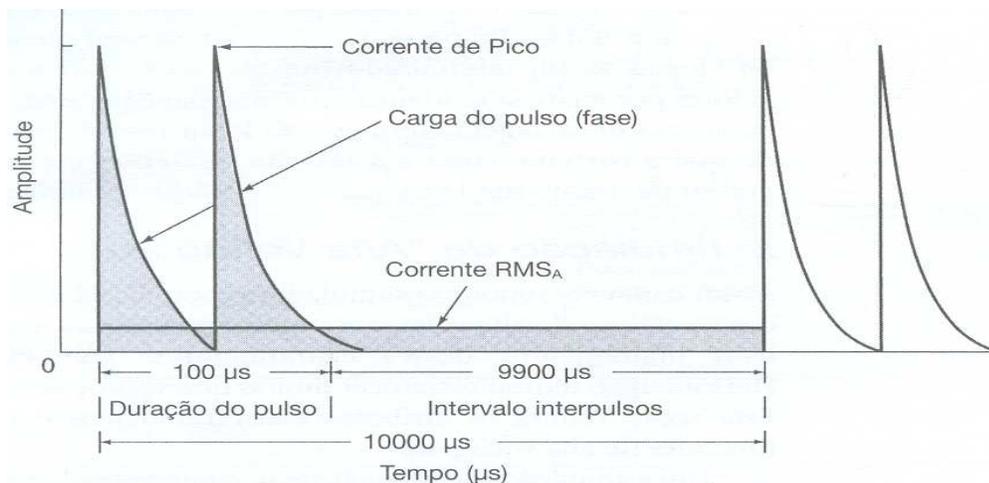


Figura 1: Corrente pulsada monofásica de alta voltagem (21).

O mecanismo exato através do qual a estimulação elétrica parece melhorar a regeneração das feridas não foi estabelecido. Contudo, muitos componentes da resposta fisiológica têm sido identificados e são suportados pelas pesquisas, em maior ou menor extensão. Os resultados clínicos suportam o uso da estimulação elétrica em uma variedade de formas como método que contribui para o tratamento de úlceras crônicas de pele. Contudo, seria inapropriado sugerir que a estimulação elétrica sozinha possa produzir alterações significativas na regeneração de feridas crônicas. Além da estimulação elétrica, outros fatores do tratamento das feridas podem contribuir para a regeneração. Dado o número limitado de ensaios controlados, é difícil quantificar a força do efeito da estimulação elétrica (31).

Griffin, et al. (26) , reconhecendo a falta de um modo de ação confirmado da estimulação elétrica em relação à regeneração das feridas, sugeriram que há várias hipóteses atrativas. Essas incluem a atração do tecido conjuntivo e células inflamatórias, modificação dos potenciais elétricos endógenos do tecido, estimulação da biossíntese e replicação celular, efeitos bactericidas, aumento da circulação e geração de um efeito eletrofisiológico celular.

Uma grande variedade de formas de aplicação da estimulação elétrica tem sido aparentemente responsável pelo favorecimento da regeneração de tecidos moles (particularmente da pele). Todavia, muitos desses ensaios não tiveram controles, falharam em relatar parâmetros importantes da estimulação e, freqüentemente, envolveram um número relativamente pequeno de indivíduos (32).

Em uma revisão crítica , Sheffet, Cytryn e Louria (33), sugeriram que uma análise de potência mostra que seria necessária uma amostra de pelo menos 164 pacientes para que pudessem ser feitas comparações e pudesse ser dada atenção às variáveis críticas. Variáveis que causam confusão, como a contaminação pelos eletrodos e a força do efeito placebo, poderiam ser responsáveis por uma parte dos resultados, mas as evidências acumuladas dos efeitos benéficos da estimulação elétrica usando uma variedade de aplicações sugerem que provavelmente há um efeito "real". Quando a atividade elétrica

interna (endógena) do corpo é considerada, os elos elétricos entre os processos fisiológicos e a atividade elétrica têm pouca probabilidade de serem epifenômenos. Se isso for verdade, a estimulação elétrica e eletromagnética aplicadas externamente em suas numerosas formas poderiam razoavelmente ser responsáveis por uma alteração nas respostas de regeneração. Os mecanismos exatos continuam inexplicados, mas os resultados clínicos suportam a doutrina de que a intervenção com energia externa pode ter efeitos significativos. Contudo, ainda restam questões importantes. Por exemplo, a estimulação poderia ser usada como um gatilho para estimular o processo usando janelas de amplitude ou de frequência. Alternativamente, a energia chegando poderia forçar um evento químico ou uma cascata, assim estimulando eventos naturais por meio de um ponto de partida alternativo.

Stefanovska, et al. (34), conduziram um estudo comparativo envolvendo três grupos de pacientes (estimulação com CD, estimulação com CA e grupo controle) contendo 250 pacientes, sendo 170 deles pacientes lesados medulares com "úlceras de pressão". Os grupos de estimulação elétrica receberam a terapia convencional além da estimulação. A estimulação com CD utilizou uma corrente de 600 J por duas horas diárias, enquanto os pacientes do grupo de CA foram tratados com correntes pulsadas de baixa frequência por duas horas diariamente. Os resultados sugeriram que o grupo que recebeu estimulação com CA obteve melhores resultados do que os grupos com CD e controle.

Em estudo Baker, et al. (35) comparou o efeito de uma estimulação pulsada de onda quadrada bifásica assimétrica e bifásica simétrica com um grupo controle. Foram envolvidos no estudo oitenta pacientes com úlceras abertas, cujos resultados demonstraram um aumento significativo na taxa de regeneração, quase 60% no grupo que recebeu estimulação assimétrica. A estimulação com pulso simétrico, em contraste, não mostrou vantagem significativa sobre a condição controle.

4.5.1-EEAV no reparo tecidual

O uso de eletroestimulação para reparo tecidual não é uma abordagem nova. Relatos publicados no século XVII registram o uso da aplicação de lâminas de ouro as lesões cutâneas associadas à varíola (32). Além disso, há evidências de que correntes elétricas, tanto endógenas quanto exógenas, podem ter uma participação eficiente no processo de cicatrização.

Se a regeneração de feridas é mediada pelo menos em parte por sinais elétricos, é de se esperar que a exposição artificial das feridas à estimulação elétrica possa alterar o processo de regeneração (36).

Weiss, Kirsner e Eaglstein (36), relatam que tecidos vivos possuem eletropotenciais de superfície de corrente contínua que regulam, pelo menos em parte, o processo de cicatrização. Após o dano tecidual, uma corrente na lesão é gerada e desencadeia a reparação biológica. Além disso, os estímulos elétricos exógenos foram mostrados para melhorar a cicatrização de ferimentos em dois sujeitos humanos e em modelos animais. Este artigo examinou as propriedades bioelétricas dos sistemas vivos e uma revisão da literatura existente sobre estimulação elétrica e cicatrização de feridas.

Gentzkow e Miller (37) demonstraram a efetividade da estimulação elétrica *in vitro*, animal e em humano.

Feedar, Kloth e Gentzkow (23), tiveram como objetivos deste estudo duplo-cego randomizado, multicêntrico, comparar a cicatrização de úlceras cutâneas crônicas tratadas com estimulação elétrica pulsada com cicatrização de feridas semelhantes tratados com simulação da estimulação elétrica e para avaliar a tolerância do paciente ao protocolo terapêutico. Os resultados indicam que a estimulação elétrica pulsada tem um efeito benéfico sobre a cicatrização e úlceras dérmicas crônicas.

Reich, et al. (38), relatam que muitos distúrbios cutâneos estão associados com a ativação ou aumento do número de mastócitos. A estimulação

elétrica tem sido demonstrado ser eficaz no tratamento de muitas destas doenças. Este estudo foi concebido para examinar o efeito de estimulação elétrica em mastócitos em feridas agudas. A estimulação elétrica não parece induzir a desgranulação. A capacidade de estimulação elétrica para reduzir o número de mastócitos pode ser relacionada com a redução de qualquer proliferação ou migração destas células e pode revelar-se uma técnica terapêutica valiosa.

Fitzgerald e Newsome (39) descrevem o uso da estimulação elétrica de alta tensão corrente pulsada monofásica para o tratamento de uma grande ferida infectada da coluna torácica, após um processo de desbridamento cirúrgico. A ferida foi completamente fechada após 10 semanas de tratamento. O possível papel de alta tensão de corrente pulsada monofásica para acelerar o processo de cicatrização é discutido.

Gentzkow (40) teve como objetivo discutir pesquisas e os avanços na estimulação elétrica de cicatrização de feridas. Os resultados mostraram que diminui o edema, desbrida tecido necrosado, atraem neutrófilos e macrófagos, estimulam receptores para fatores de crescimento, estimula o crescimento de fibroblastos e de tecido de granulação, aumenta fluxo sanguíneo, induz a migração de células epidérmicas, inibe as bactérias, e reduz o número de mastócitos. Assim, tomados em conjunto, os estudos de eficácia e o "mecanismo de ação" fornecem evidências que a estimulação elétrica é segura e eficaz para promover a cicatrização de feridas cutâneas.

Mawson, et al. (41) relata que as úlceras de pressão são notoriamente comuns em pacientes com lesão na medula espinhal, em pacientes com outras deficiências neurológicas, em pacientes desnutridos e severamente debilitados, e no idoso frágil. A revisão da literatura sugere que a estimulação elétrica aumenta o fluxo sanguíneo cutâneo e promove a cicatrização de úlceras de pressão.

Agren, Engel e Mertz (42) referem que a epitelização de feridas de queimadura de segundo grau é conhecida por ser acelerada por tratamento tópico com curativos de hidrogel e reforçada por estimulação elétrica pulsada se comparada com nenhum tratamento (exposição ao ar), os resultados mostraram que a adição de estimulação elétrica pulsada aumentou ($p < 0,001$) os níveis de

colagenase durante o início da reepitelização. Estes resultados sugerem que a colagenase está intimamente ligada à epitelização da ferida.

Castillo, et al. (43) utilizaram antisséptico (iodo) e estimulação elétrica para tratamento de feridas em um ensaio usando ratos submetidos a queimaduras de segundo grau. As imagens obtidas utilizando um programa de análise de área revelou que apenas a pele reparada do grupo eletroestimulado tinha uma aparência semelhante à da pele de controle, e que a aparência geral da pele reparada foi compatível com um processo de cura bem organizado.

Bauerle e Neander (44), numa revisão de 8 estudos envolvendo 215 pacientes clínicos com úlceras cutâneas isquêmicas e 7 de tecidos animais ou estudos de cultura de tecidos, referem que a estimulação elétrica de células de fibroblastos acelera a biossíntese intracelular necessária para formar novo tecido de granulação em cicatrização de feridas.

Fleischli e Laughlin (45) apresentam uma revisão da literatural sobre a estimulação elétrica com foco especial sobre os méritos de seus usos na cicatrização de feridas. Literatura a partir de uma ciência básica, estudos com animais e estudos clínicos são revistos. A literatura parece sugerir que a estimulação elétrica pode afetar a cicatrização da ferida.

Gilcreast, et al. (46) relatam que o fracasso em curar feridas em diabéticos determina amputações das extremidades em 54.000 pessoas anualmente. Portanto, é necessário um tratamento para acelerar a cicatrização em pessoas com diabetes, a fim de reduzir a necessidade de uma amputação. Este estudo testou o efeito da corrente pulsada de alta voltagem sobre o fluxo sanguíneo no pé de seres humanos que estão em risco de úlceras do pé diabético. Embora este tratamento parece aumentar o fluxo de sangue em um subgrupo de pacientes, mais estudos são necessários para identificar prováveis mecanismos para essa resposta.

Houghton e Campbell (47) referem que terapias adjuvantes, tais como ultrassom, laser, luz ultravioleta, aquecimento superficial, os campos eletromagnéticos pulsados e a estimulação elétrica foram todos indicados no tratamento de feridas crônicas. A pesquisa mostra que a estimulação elétrica e

ultrassom são modalidades terapêuticas que têm evidências de pesquisa clínica suficiente para suportar o seu uso no tratamento de feridas crônicas

Bogie, et al. (48) analisam as aplicações da estimulação elétrica terapêutica específicas para a cicatrização de feridas e prevenção de úlcera de pressão. Referem que a aplicação de eletroestimulação para a cicatrização de feridas tem sido utilizada para aumentar a taxa de cura em mais do que 50%.

4.5.2 - Contra indicações da eletroestimulação

Segundo Nelson, et al. (21) as contra indicações recomendadas pela FDA (Administração de Drogas e Alimentos) para eletroestimulação são:

- Pessoas com lesões cancerosas.
- Dores não diagnosticadas (eventual estímulo a atividade física antes da recuperação ou por mascarar doença grave).
- Presença de dispositivo eletrônico implantado.
- Gravidez (primeiro trimestre).
- Pacientes cardíacos.
- Seios carotídeos (eventual exacerbação de reflexos vago-vagais).

5- Métodos

5.1 - Aprovação pelo Comitê de Ética

O estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal de acordo com o Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988) e foi aprovado pela comissão de Ética no uso de animais CEUA/Unicamp, protocolo nº 2168-1 (Anexo 7).

5.2 - Modelo Animal

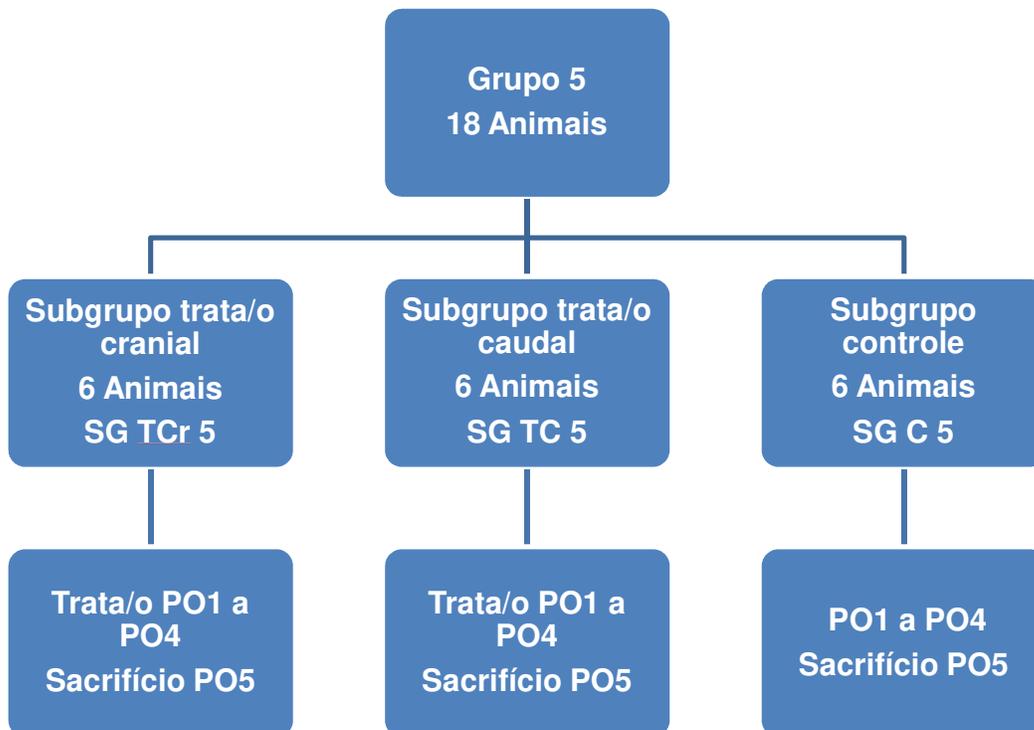
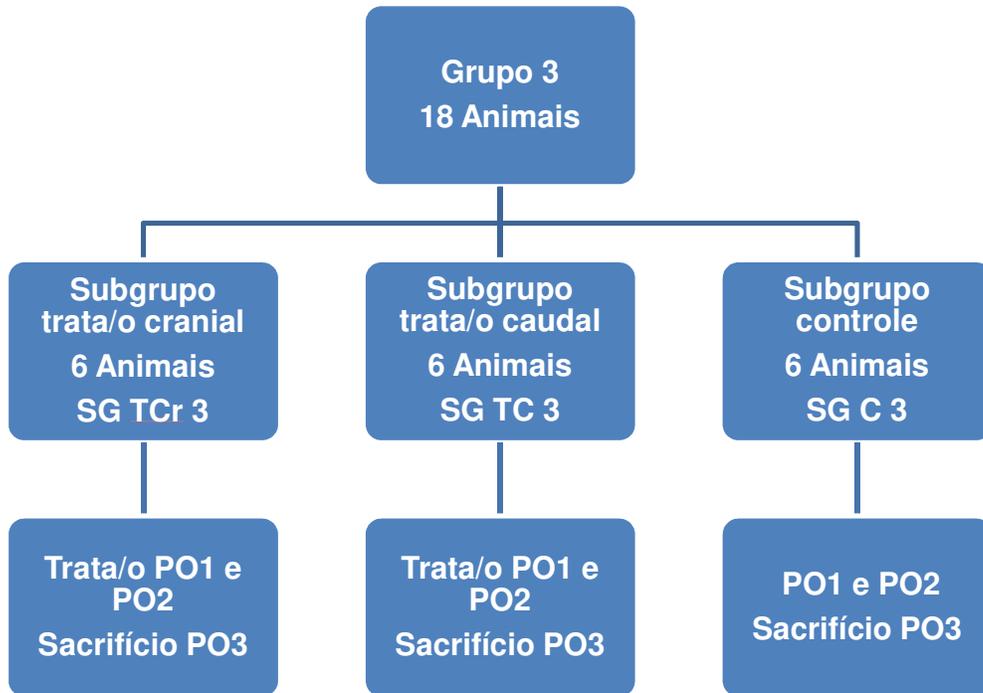
O estudo foi realizado no Núcleo de Cirurgia Experimental da UNICAMP sendo utilizados 72 ratos Wistar, com peso corpóreo variando de 350 a 550 gramas, com idade média de 4 meses, obtidos do Biotério da UNICAMP (CEMIB).

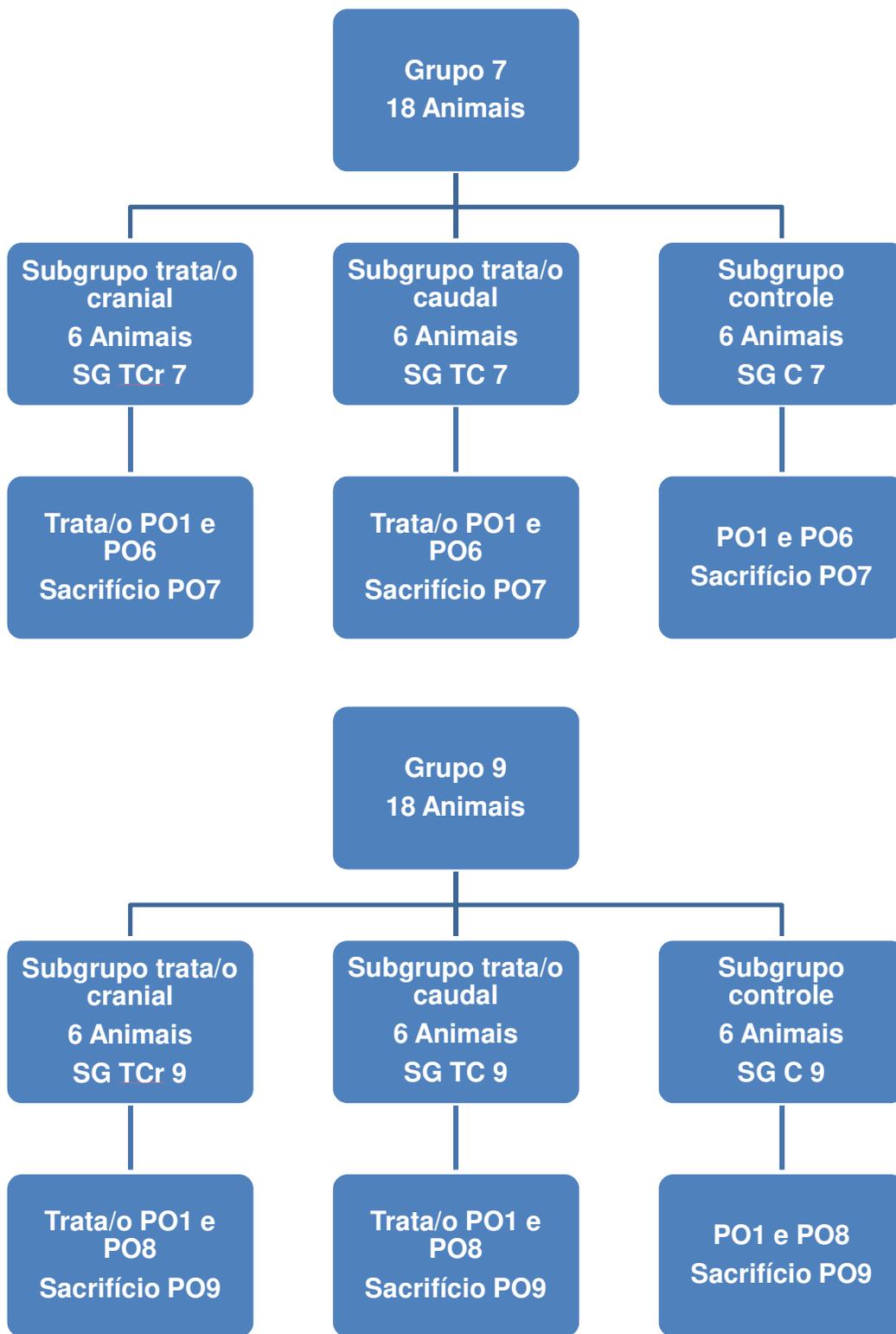
Os animais foram mantidos em gaiolas isoladas, em condições ambientais de temperatura e luminosidade, com livre acesso a alimentação com ração e água.

Os animais permaneceram por um período máximo de 9 dias no Núcleo de Cirurgia Experimental da UNICAMP.

5.3 - Distribuição dos grupos e tratamento

Os 72 animais foram distribuídos em Grupos 3, 5, 7 e 9 dias referentes ao dia de sacrifício para analisar feridas agudas. Cada um destes foi subdividido em subgrupo controle e subgrupos tratamento, compostos por 6 animais cada, distribuídos aleatoriamente (Esquema 1).





Esquema 1: Distribuição dos grupos (SG Tcr = subgrupo tratamento cranial, SG Tc = subgrupo tratamento caudal, SG C = subgrupo controle)

5.3.1- Subgrupo Controle (SGC)

Foram realizadas as feridas A e B, porém não foi realizado tratamento com EEAV

5.3.2 – Subgrupo Tratamento (SGT)

Compostos por dois subgrupos denominados **Tcr** (eletrodo na posição cranial) (Figura 6) e **Tc** (eletrodo na posição caudal) (Figura 7), nos quais foi realizado o tratamento com EEAV. O tratamento com EEAV foi realizado, com os animais em uma contensão (Figura 8), diariamente após as primeiras 24h da cirurgia, exceto no dia do sacrifício.

5.4 - Procedimento cirúrgico

5.4.1 - Anestesia

Foi realizada a pesagem dos animais no dia considerado como 1º dia, e administrado pré-anestésicos com Ketamina (dose 75 mg/Kg) mais Xilazina (dose 10 mg/Kg) via intraperitoneal.

A anestesia foi alcançada com o uso endovenoso de tiopental sódico (25 mg/Kg).

5.4.2 - Cirurgia

Depois de anestesiados os animais foram posicionados em decúbito ventral na mesa cirúrgica.

A seguir foi realizada a epilação da área e antissepsia com solução de clorexidina alcoólica 0,2%. Demarcou-se com um carimbo duas áreas com formato quadrangular com 1,5X1,5 cm (2,25 cm²), na linha média dorsal, a partir de 4cm da porção distal do animal, e 4,5cm entre o centro da primeira e da segunda ferida, a ferida próximo ao crânio foi denominada ferida A e próxima à cauda, ferida B (figura 2).

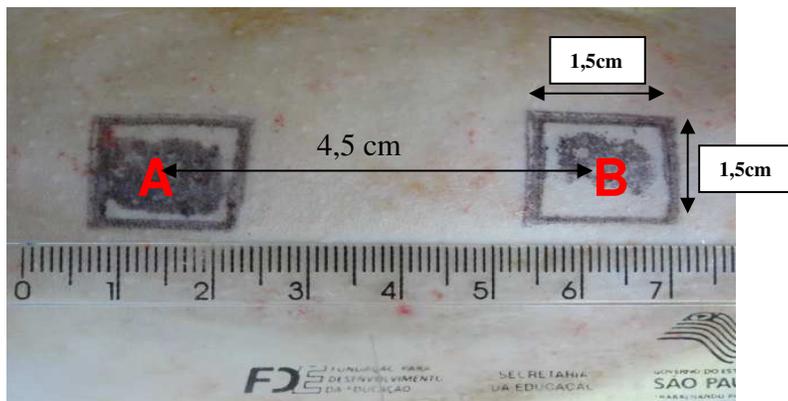


Figura 2: Áreas demarcadas com carimbo.

Com um bisturi foi retirada a pele dessas áreas deixando-as cruentas com exposição da fáscia dorsal (Figura 3).

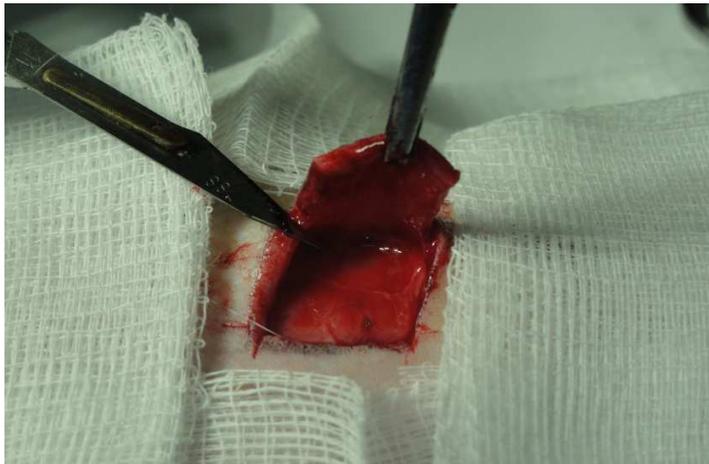


Figura 3: Procedimento cirúrgico.

No pós-operatório os animais foram colocados em gaiolas isoladas com maravalhas. Depois do procedimento cirúrgico e durante todo o tratamento a ferida permaneceu exposta sem nenhum curativo, ou medicamento.

5.5 –Equipamentos de eletroestimulação e técnica

O aparelho utilizado foi NeurodynHigh Volt[®] (EEAV), ANVISA-10360310008 da IBRAMED[®] (Figura 4).



Figura 4: Aparelho de Alta Voltagem e contensores

Foram utilizados eletrodos de silicone-carbono; o meio de contato entre os eletrodos ativos e a área estudada foi gaze estéril, umedecida com soro fisiológico a 9%, e posicionada sobre a solução de continuidade.

Os eletrodos ativos possuíam dimensão de 1cm^2 e o dispersivo 2cm^2 , os eletrodos menores foram colocados um sobre a ferida e o outro imediatamente adjacente, o eletrodo dispersivo posicionado a uma distância de 5 cm da área da ferida (Figura 5 e 6).

Os animais permaneceram durante todo o tratamento de 30 minutos de estimulação dentro de um contensor (Figura 7).

A polaridade utilizada inicialmente para o tratamento foi a estimulação anódica (polo negativo), alternando-se a cada três sessões para a polaridade positiva (Quadro 1).

Dias Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8
G3	-	-						
G5	-	-	-	+				
G7	-	-	-	+	+	+		
G9	-	-	-	+	+	+	-	-

Quadro 1: Polaridades aplicadas segundo cada grupo, polaridade positiva(+) e polaridade negativa (-).

Os parâmetros utilizados no trabalho foram modo contínuo, frequência de 100 Hz, tempo de 30 minutos, 1 x semana e uma intensidade média de 8mA, regulada com aumento da amplitude, até observar-se uma contração muscular leve na região estimulada, a qual foi a seguir reduzida para alcançar somente o limiar sensitivo²¹.

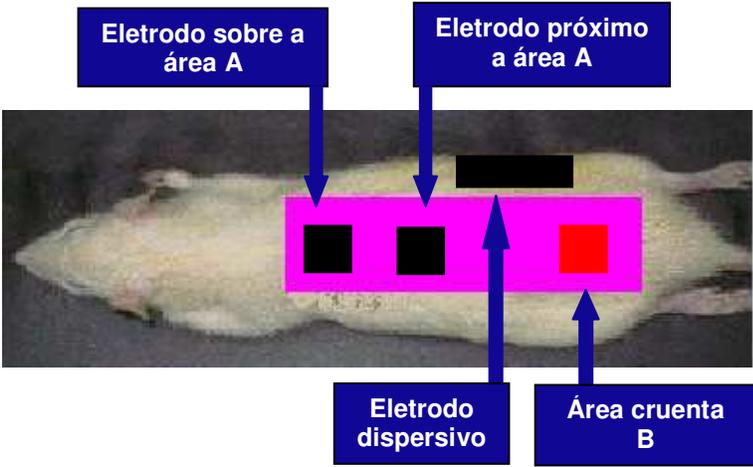


Figura 5: Demonstra a disposição dos eletrodos no subgrupo Tcr

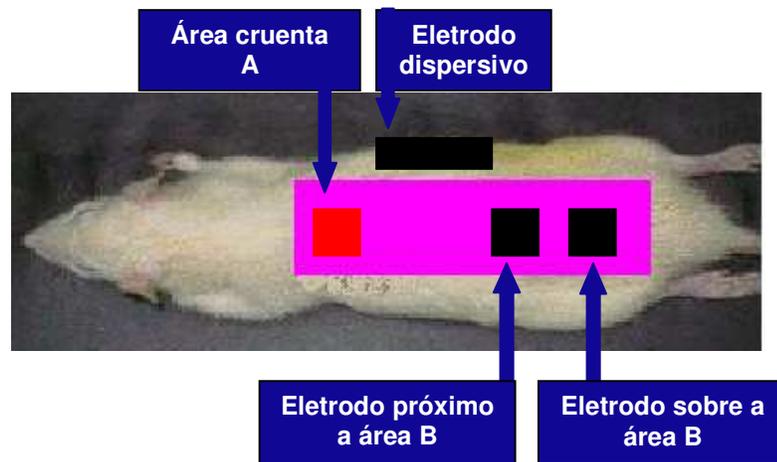


Figura 6: Demonstra a disposição dos eletrodos no subgrupo Tc



Figura 7:Contensores usados no tratamento

O tratamento era realizado com quatro animais ao mesmo tempo, já que o aparelho possui quatro canais (Figura 8).



Figura 8: Animais em tratamento

5.6 – Obtenção e Medição de imagens

Foi realizado o registro fotográfico padronizado das áreas estudadas utilizando uma câmera digital semi profissional H50, 9.1 MP - SONY®. As obtenções de imagem foram feitas no pós-operatório imediato POI e nos dias PO3, PO5, PO7 e PO9. A câmera ficou posicionada em um suporte, sendo de 30 cm a distância entre a câmera e área estudada, posicionou-se uma régua junto à da área estudada, contendo o código, o número do animal, e o dia da fotografia.

As imagens capturadas no POI e no dia do sacrifício foram avaliadas pelo programa computacional Autodesk Design Review 2012, da Autodesk, Inc. com suporte no Brasil, o qual verifica a área da lesão.

5.7 - Eutanásia e Obtenção da Amostras

No 3º, 5º, 7º e 9º dia, os animais foram novamente pré-anestesiados e receberam tiopental sódico endovenoso (dose 40 mg/kg) para seu sacrifício.

Após a eutanásia foi realizada a retirada das duas áreas estudadas, com uma margem de tecido íntegro (Figura 9) e colocadas em pedaços de cartolina (Figura 10). Em seguida as peças foram fixadas com alfinetes, colocadas em uma solução de formalina por 24Hs e após esse período colocadas em álcool 70%. Em seguida foi realizado dois cortes de cada segmento coletado. As etapas para a obtenção das lâminas foram realizadas no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular Veterinária – VETPAT



Figura 9: Incisões para obtenção do material para análise.



Figura 10: Peças obtidas.

5.8 - Preparação das lâminas para análise histológica

As peças foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de álcool.

Posteriormente foram diafanizadas utilizando o xilol nas concentrações (xilol I, II, III), permanecendo 1 hora em cada recipiente.

Para a inclusão as peças foram colocadas em banhos de parafina à 62°C formando-se blocos.

Os cortes para este estudo foram de 07 micras, posicionados sobre a lâmina e levados para a secagem em estufa a 40°C por 15 a 30 minutos.

Antes de receber a coloração as peças passam pelo processo de desparafinização com xilol e de reidratação com uma série gradativa de soluções alcoólicas e ao final recebem água destilada.

Após os procedimentos usuais de histo-tecnologia, duas lâminas de cada porção amostrada foram coradas utilizando a hematoxilina (corante básico de cor roxa), eosina (corante ácido de cor rosa) e o Tricrômico de Masson após corados as lâminas foram desidratadas por álcool (70%, 90%, 95%, absoluto) e xilol (I,II,III).

Após a secagem na estufa as lâminas foram etiquetadas com números aleatórios.

5.9 - Critérios para análise histológica das amostras

Foi utilizado um microscópio óptico Nikon E-100 para analisar a neoformação de vasos sanguíneas, quantidade de fibras de colágeno, proliferação fibroblástica, polimorfonucleares, mononucleares e tecido necrótico.

As lâminas foram analisadas em microscopia de luz, e cada porção amostrada recebeu um escore (0; +; ++; +++) de acordo com a quantidade de elementos nas lesões encontradas no conjunto de cortes/lâminas analisadas, tendo sempre como parâmetro a pele integra.

O escore 0 indica ausência do processo ou celularidade avaliada; escore (+) indica presença de leve infiltrado fibroblástico ou discreta proliferação vascular ou escassa região de necrose; o escore (++) indica moderado infiltrado fibroblástico ou moderada proliferação vascular ou moderada extensão de necrose. O escore (+++) indica intenso infiltrado fibroblástico ou intensa proliferação vascular ou necrose extensa.

Pela coloração de Masson avaliou-se a proporção de fibras colágenas coradas em azul na área de ferida. Estipulou-se o padrão de +, ++ ou +++ para uma quantidade escassa, moderada e grande de colágeno.

Para a captura de imagens das lâminas foi utilizado microscópio digital DynoEye AM423X (Figura 12,13,14 e 15).

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular Veterinária – VETPAT.

5.10 - Método Estatístico

A análise estatística do trabalho foi feita pelo Setor de Estatística da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP por meio de análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas e tabelas de frequências para variáveis categóricas.

Para comparar os parâmetros obtidos pela análise macroscópica, levando em consideração os fatores local (ferida A ou B), grupo (tratamento cranial, caudal e controle) e os dias dos grupos (3, 5, 7 e 9), foram utilizadas a Análise de Variância (ANOVA) e a ANOVA para medidas repetidas. Devido ao tamanho da amostra foi aplicada a transformação por postos (*ranks*) nas variáveis. As comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey.

Para comparação das variáveis da histologia foi utilizada a regressão de Poisson, foram transformadas as cruzes em números, ou seja +=1, ++=2 e +++=3.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

6 - Resultados

6.1 - Análise Macroscópica

As imagens das áreas cruentas foram capturadas no POI (tempo 1) no dia do sacrifício (tempo 2) (Figura 11).

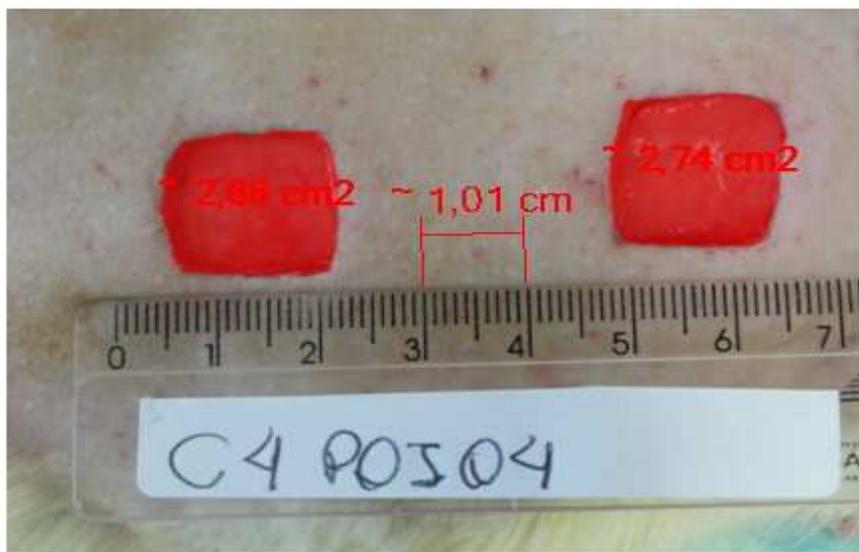


Figura 11: Áreas demarcadas e mensuradas pelo programa.

O quadro descritivo do tamanho das áreas das feridas feitas nos animais tratados e controle para avaliação macroscópica encontra-se no Anexo 1.

O quadro 2 mostra a variação percentual da área, e o quadro 3 mostra a média percentual de redução dos grupos tratados. Os grupos 3 e 5 dias tiveram variações percentuais de redução semelhantes assim como 7 e 9, todavia os grupos 3 e 5 tiveram percentuais de variação diferentes de 7 e 9 dias $p < 0,00001$ (quadro 4).

A interação entre as áreas A e B dos grupos tratados foi significativa $p = 0,0110$, ou seja, quando foi tratada a ferida A cranial, a ferida B caudal apresentou redução no tamanho e quando foi tratada a ferida B caudal, a ferida A cranial também apresentou redução no tamanho, o que não ocorre no grupo

controle já que tanto a ferida A cranial quando a ferida B caudal tiveram proporções de cicatrização diferentes.

Assim:

- 1- A análise da variável “*local de tratamento (caudal ou cranial)*” mostrou que a região cranial foi a área que apresentou redução mais significativa, com $p < 0,0001$ (quadro 5).

Quadro 2– Análise descritiva e comparações da **variação percentual da área** entre grupos, tratamentos e locais.

GRUPO	TRATAMENTO	Variável	N	Média	dp	mínimo	mediana	máximo
3	Caudal	A	6	-24.43	11.93	-35.53	-30.15	-4.33
		B	6	-10.30	6.66	-21.50	-10.18	-2.46
	Controle	A	6	17.72	22.53	-6.12	18.98	47.89
		B	6	-9.85	15.11	-33.76	-8.74	5.73
	Cranial	A	6	-18.08	21.23	-39.02	-24.20	12.50
		B	6	-3.34	22.04	-21.84	-10.78	33.07
5	Caudal	A	6	-17.02	18.57	-33.77	-20.77	15.46
		B	6	-12.77	12.24	-29.37	-12.44	2.48
	Controle	A	6	5.78	27.95	-19.14	-5.61	49.65
		B	6	-9.93	15.02	-28.96	-3.49	4.52
	Cranial	A	6	-24.56	12.16	-42.05	-24.00	-6.35
		B	6	-21.65	11.62	-35.81	-22.07	-3.13
7	Caudal	A	6	-42.55	19.13	-74.69	-37.76	-20.94
		B	6	-45.88	16.64	-78.34	-41.37	-32.46
	Controle	A	6	-25.64	15.28	-43.43	-24.75	-0.31
		B	6	-25.85	11.45	-43.48	-26.71	-11.99
	Cranial	A	6	-48.17	9.31	-61.84	-46.48	-38.38
		B	6	-34.69	14.16	-51.94	-37.81	-12.11
9	Caudal	A	6	-37.68	11.42	-49.03	-41.16	-22.79
		B	6	-23.93	12.74	-44.01	-21.99	-7.22
	Controle	A	6	-48.01	13.58	-66.36	-47.10	-31.01
		B	6	-38.60	14.70	-59.83	-39.89	-13.97
	Cranial	A	6	-55.41	9.25	-69.42	-56.14	-43.13
		B	6	-43.71	9.46	-51.23	-47.20	-26.04

Quadro 3 – Valores médios percentuais de redução das áreas segundo os grupos tratados.

MÉTODO(%)	GRUPO
-8.047	3
-13.358	5
-37.131	7
-41.222	9

Quadro 4 - Resultados da ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos:

Efeito	Valor-p
Grupo	<0,0001
Tratamento	0,0010
Grupo*tratamento	0.0392
Local	0.0028
Local*Grupo	0,2411
Local*Tratamento	0,0110
Local*Grupo*Tratamento	0,0958

(diferença entre 3 e 7; 3 e 9; 5 e 7; 5 e 9)

Quadro 5 – Fixando locais e comparando tratamentos:

Local	Valor-p	Diferenças
A (Cranial)	<0.0001	Controle e caudal; controle e cranial Valores médios (%) -12.538 Controle -30.421 Caudal -36.556 Cranial
B (Caudal)	0.1722	- Valores médios (%) -21.057 Controle -23.219 Caudal -25.846 Cranial

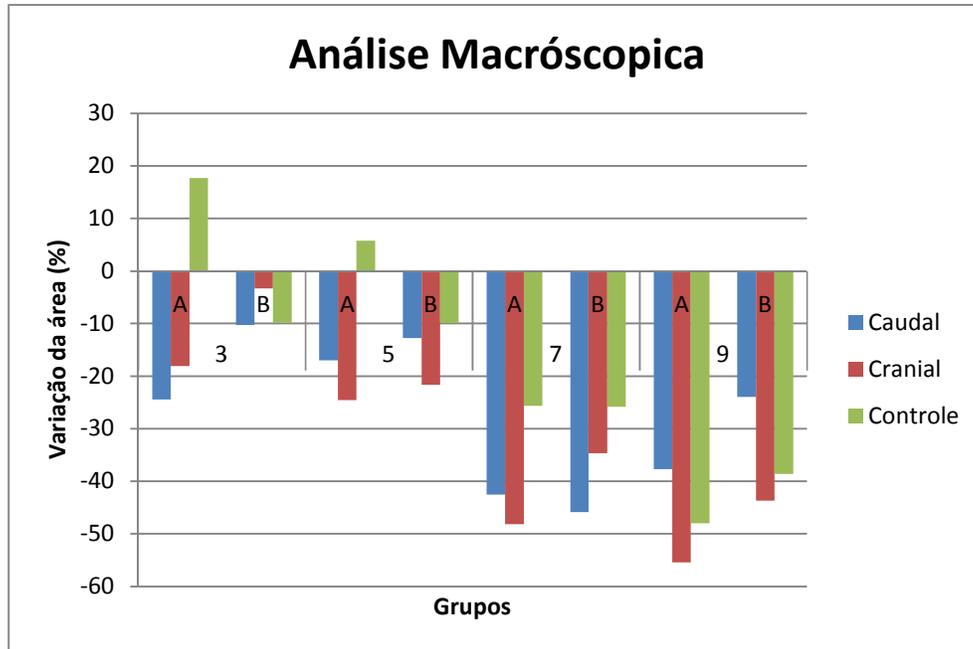


Gráfico 1: Valor médio da variação da área em percentual para cada grupo, local da lesão e tratamento.

No gráfico 1 observa-se que no PO3 o grupo tratamento caudal, área A, foi a que apresentou maior redução da ferida e a que a ferida A do grupo controle foi a que apresentou menor redução.

No PO5 o grupo cranial teve maior redução da ferida A e as feridas A do grupo controle foi a que apresentou menor redução.

No PO7 o grupo tratamento cranial apresentou maior redução da ferida A e as feridas A e B do grupo controle foram as que apresentaram menores reduções.

No PO9 o grupo tratamento cranial mostrou maior redução percentual da ferida A e a ferida B do grupo tratamento caudal foi a que apresentou menor redução.

6.2 – Análise Histológica

Como demonstrado no gráfico 2 a variável neovascularização:

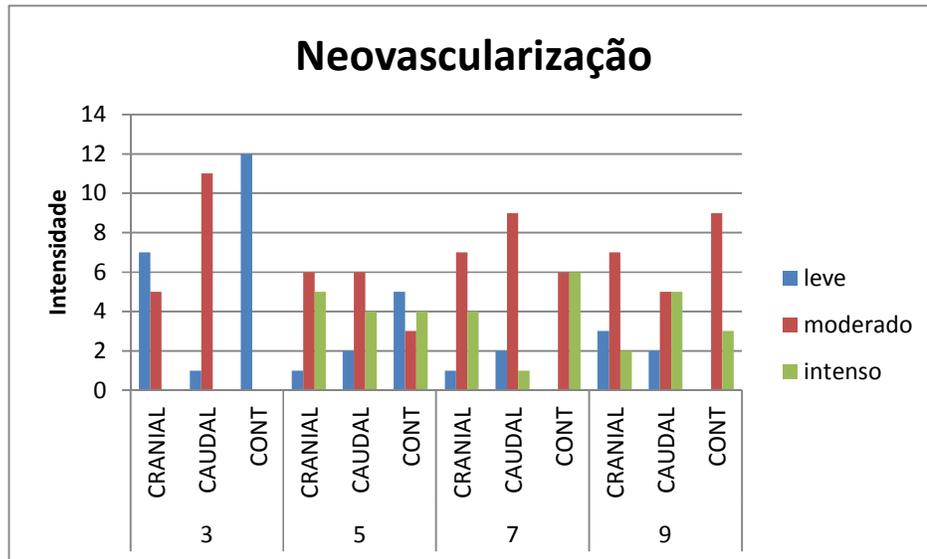


Gráfico 2: Intensidade de neovascularização nas lâminas de cada grupo

No gráfico 2 observa-se que no grupo 3 a neovascularização foi leve para grupo tratamento cranial e controle, porém a partir do grupo de 5 dias todas as lâminas apresentaram moderada e intensa quantidade (Figura 12).

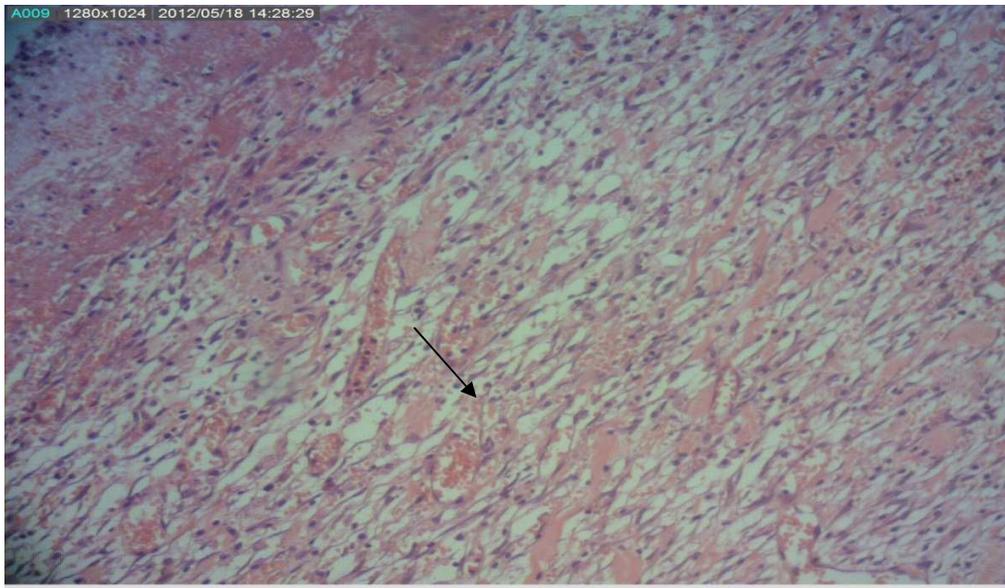


Figura 12: Fotomicrografia de ferida. Observar intensa neovascularização em derme superficial. H.E. 200x, tratamento cranial PO5.

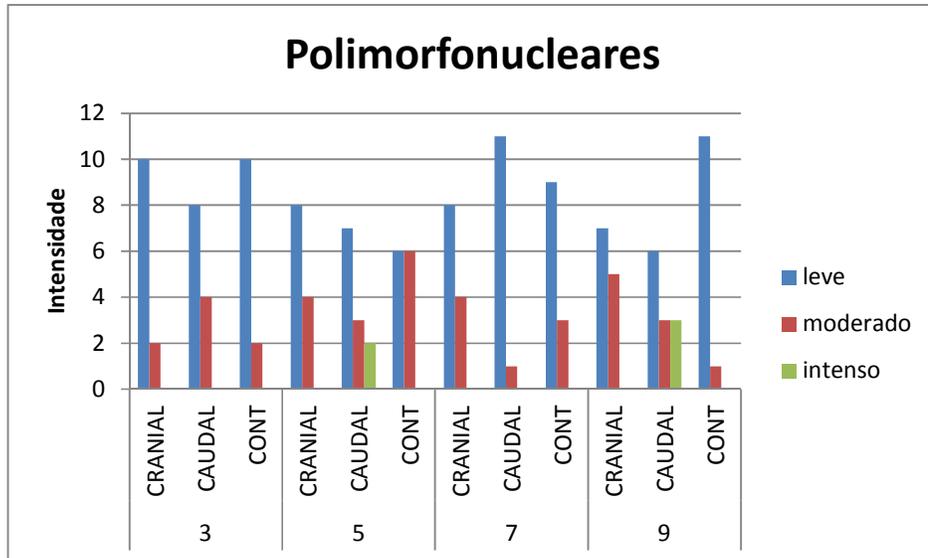


Gráfico 3: Intensidade de células polimorfonucleares nas lâminas de cada grupo.

No gráfico 3, em todos os grupos 3,5,7 e 9 apresentaram leve quantidade de polimorfonucleares.

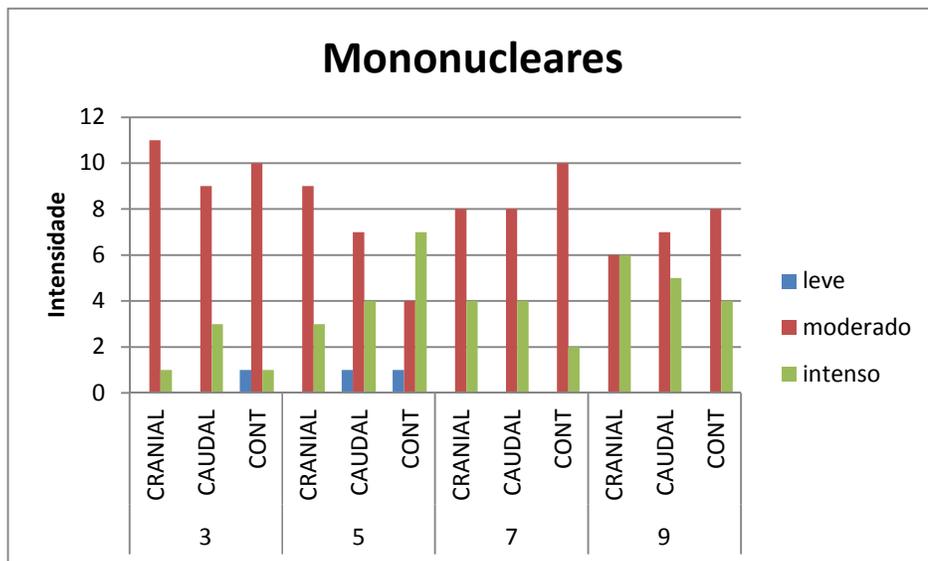


Gráfico 4: Intensidade de células mononucleares nas lâminas de cada grupo.

Observa-se que no gráfico 4 há uma moderada quantidade de mononucleares apresentando uma intensificação a partir do grupo 5 e mais evidente no grupo 9 para os grupos tratamento cranial e caudal (Figura 13).

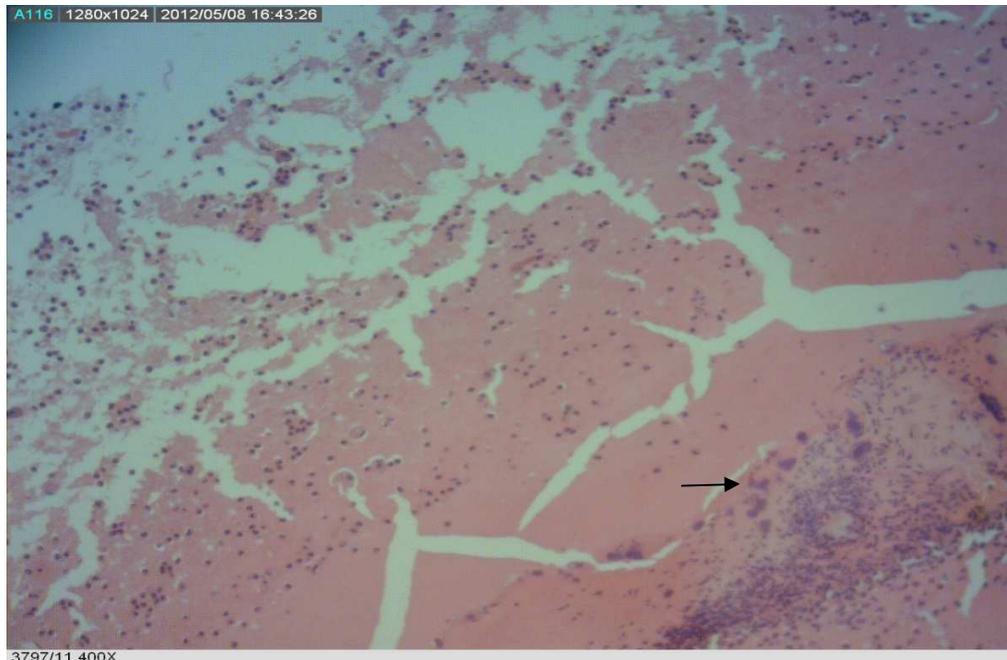


Figura 13: Fotomicrografia de ferida. Observar concentração de polimorfonucleares indicada pela seta. HE. 200x, grupo controle PO5.

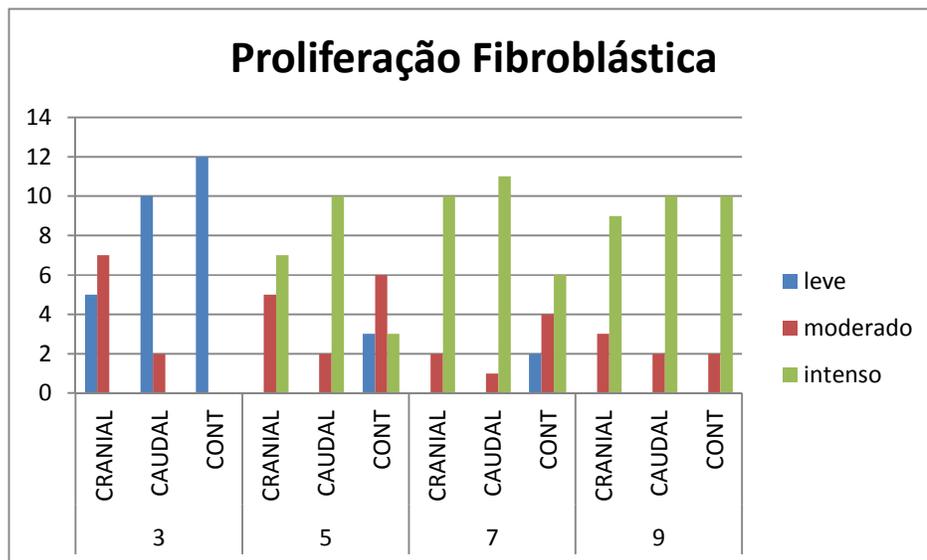


Gráfico 5: Intensidade de proliferação fibroblástica nas lâminas de cada grupo.

No gráfico 5 a proliferação fibroblástica apresentou moderada quantidade no grupo 3 para o grupo tratamento cranial, leve para grupo tratamento caudal e ausente para controle; no grupo 5 apresentou intensa quantidade e para os grupos 7 e 9 (Figura 14).

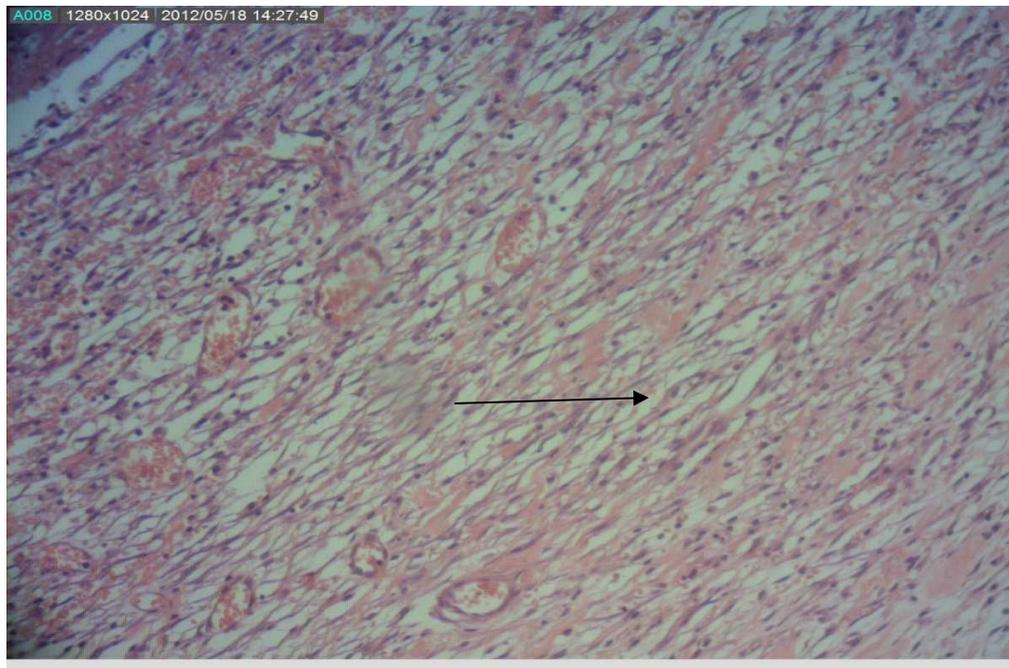


Figura 14: Fotomicrografia de ferida. Observar proliferação fibroblástica imatura formando feixes irregulares junto a proliferação vascular na derme superficial. H.E. 400x, grupo tratamento cranial PO7.

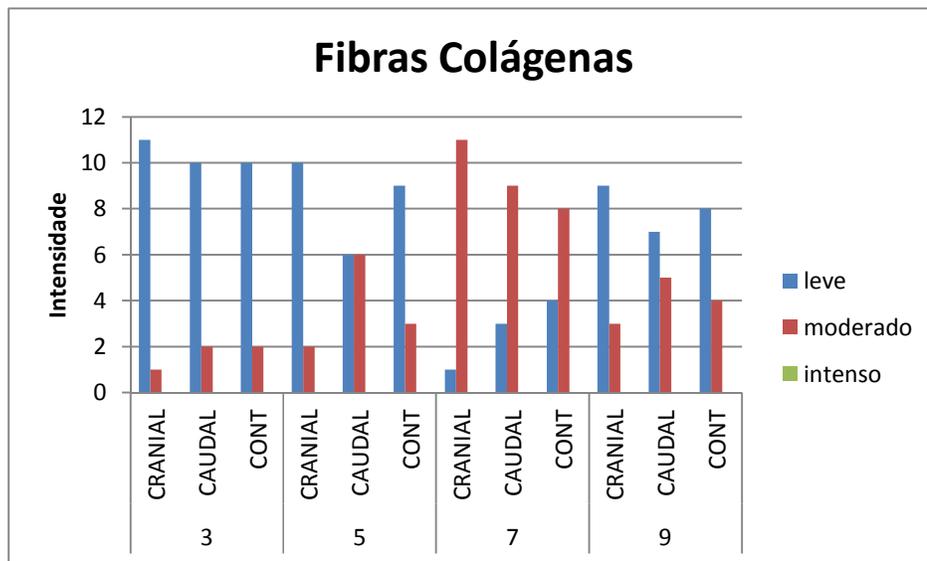


Gráfico 6: Intensidade de fibras colágenas nas lâminas de cada grupo.

No gráfico 6, os grupos 3 e 5 apresentaram leve quantidade de fibras colágenas a partir do grupo 7 principalmente para o grupo tratamento cranial e leve quantidade a partir do grupo 9 (Figura 15).

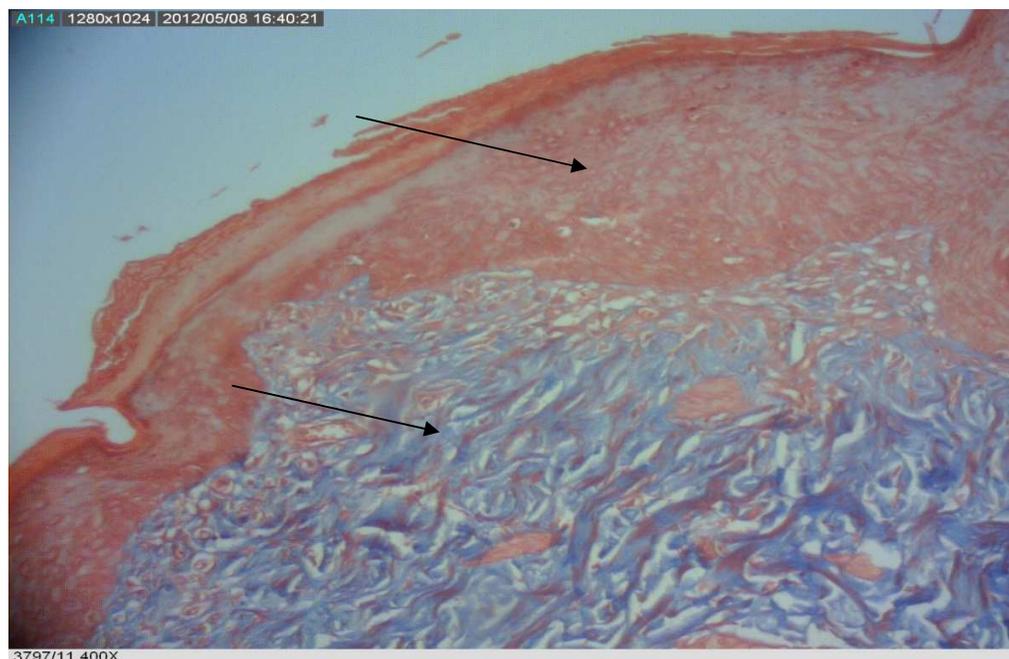


Figura 15: Fotomicrografia de ferida . Observar colágeno (azul) junto a área lesada vermelha. Masson. 200x, grupo tratamento caudal PO9.

Para as variáveis da análise histológica foram utilizados o modelo de Poisson. Assim as variáveis de neovascularização (Anexo 2), mononucleares (Anexo 3), polimorfonucleares (Anexo 4), proliferação fibroblástica (Anexo 5) e fibras colágenas (Anexo 6) não foram significativos tanto para os grupos tratados quanto controle.

A variável tecido necrótico foi significativa com $p = 0,0384$ sendo a área caudal com maior presença de tecido necrótico e independente do grupo tratado ou controle como mostra o quadro 6.

Quadro 6 – Análise descritiva da variável Tecido Necrótico entre grupos, tratamentos e locais. Modelo de Poisson

Efeito	Valor-p
Grupo	0,1225
Tratamento	0,1856
Grupo*Tratamento	0,4232
Local	0,0384 (C>Cr)
Grupo*Local	0,2142
Tratamento*Local	0,1610
Grupo*Tratamento*Local	0,4232

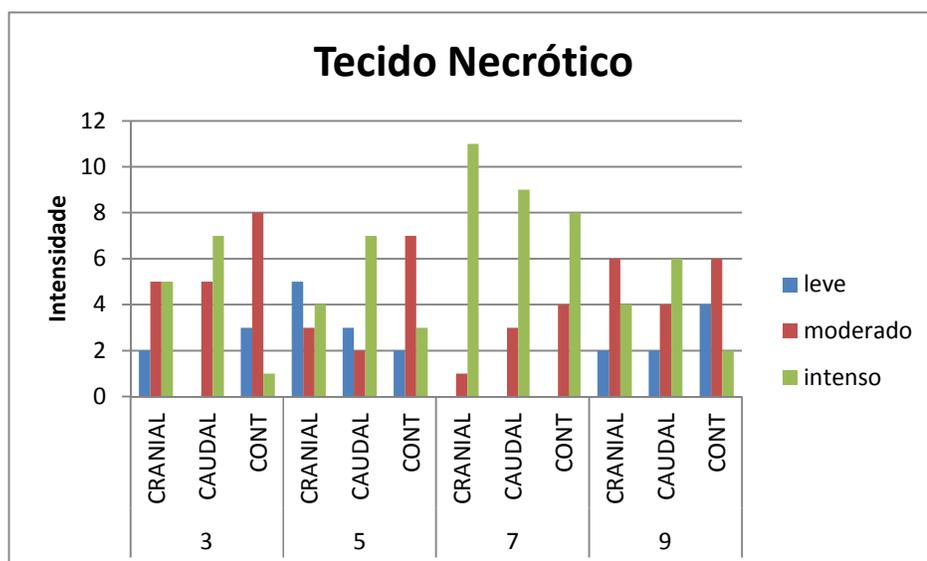


Gráfico 7: Intensidade de tecido necrótico nas lâminas de cada grupo.

O gráfico 7 mostra que no PO3 o grupo com tratamento caudal apresentou uma maior quantidade de tecido necrótico na área caudal, e o grupo com menor quantidade de necrose foi o grupo controle na área cranial.

No PO5 o grupo tratamento caudal mostrou mais tecido necrótico na área caudal e o grupo cranial teve a menor quantidade de necrose na área cranial.

No PO7 os grupos tratamento caudal, cranial e controle apresentaram praticamente a mesma quantidade de tecido necrótico tanto na área cranial quanto caudal e a que menos teve necrose foi o grupo caudal na área cranial.

No PO9 o grupo tratamento cranial apresentou maior necrose na área caudal e o que exibiu menor necrose foi o grupo tratamento caudal na área cranial do animal.

7 – Discussão

- A eleição do aparelho:

O aparelho utilizado para este trabalho foi o Neurodyn High Volt, por ser projetado seguindo as normas técnicas existentes de construção de aparelhos médicos (NBR IEC 60601-1, NBR IEC 60601-1-2 e NBR IEC 60601-2-10).

Trata-se de um estimulador transcutâneo neuromuscular que utiliza tecnologia de microcomputadores, ou seja, é micro-controlado. O Neurodyn High Volt é uma completa unidade de eletroterapia de simples operação, com dois tipos diferentes de correntes, e com 4 canais de saída com ajustes independentes de frequência e amplitude do sinal, possibilitando múltiplas opções de tratamento, tornando-se essencial para a prática clínica.

É importante que o aparelho utilizado para tratamento seja aferido e aponte a graduação real da voltagem no painel, além de oferecer mais de um canal para tratamentos de áreas maiores ou simultâneas (21).

Os trabalhos realizados por Watson (31) e Dunn, et al. (49), justificam a eleição da estimulação elétrica de alta voltagem no auxílio da reparação tecidual, exercendo grande apoio juntamente com as demais técnicas para esse tipo de tratamento.

Weiss, et al. (36) referem que a estimulação elétrica é uma terapia que diminui o edema, o tecido necrosado, atraem neutrófilos e macrófagos, estimulam receptores para fatores de crescimento, estimula o crescimento de fibroblastos e de tecido de granulação, aumenta o fluxo sanguíneo, induz a migração de células epidérmicas, impede danos pós-isquêmico, inibe as bactérias, reduz o número de mastócitos, fatores benéficos a cicatrização de feridas. Numerosos estudos de eficácia humanos e animais confirmam que a estimulação elétrica com carga adequada, densidade e energia total faz com que melhore dramaticamente cicatrização de feridas cutâneas.

- Falta de trabalhos sobre a EEAV:

Davini (28) relata pouca divulgação sobre a EEAV, por esse fato foi necessário comparar este trabalho com outros recursos utilizados na cicatrização.

- Modelo animal:

Para o modelo animal foram escolhidos ratos machos evitando-se as alterações hormonais que poderiam alterar os resultados.

Foram utilizados 72 animais a fim de ser obtida significância estatística para cada um dos grupos estudados, o peso variou entre 350 e 550 gr, porém não foi estudada a relação peso-cicatrização, devido à quantidade de variáveis estudadas nesse trabalho.

- Padronização das áreas das feridas:

Os mamíferos de pele solta (roedores, coelhos e porquinhos da índia) possuem músculo carnoso, o panículo subcutâneo, em contraste com humanos e outros mamíferos com peles aderidas. O panículo deve contribuir significativamente na cicatrização da ferida (50).

Padronizou-se realizar as feridas no dorso dos animais de acordo com as observações de Kashyap, et al. (50), que consideraram o dorso como o melhor sítio para a incisão, por evitar irritação por contato e autocanibalismo. O controle da ferida ora cranial, ora caudal em cada grupo foi realizado a fim de se avaliar a resposta cicatricial em diferentes segmentos da região dorsal.

O tipo de ferida, deixando áreas cruentas com bisturi seguiu o trabalho de Mendes Junior, et al. (51).

- Exposição das feridas:

Kashyap, et al (50) realizaram um trabalho com iodo povidine em camundongos e citaram como problema em potencial a interferência da lambida do animal na cicatrização da ferida, visto que a saliva de camundongo contém vários fatores de crescimento. No entanto, este comportamento foi observado em todos os grupos e em igual extensão. No presente trabalho foi observado a lambadura das feridas entre todos os animais, porém só na ferida caudal - B, possivelmente pela área ser mais acessível. Porém este fator não interferiu na cicatrização das feridas, visto que a ferida caudal – B, tanto entre os grupos tratamento e controle foram as que menos cicatrizaram. Fato que justificaria esse atraso na cicatrização é que a ferida B, era a região que mais os animais atritavam na grade onde eles eram contidos, e conseqüentemente perdia-se a crosta de

cicatrização dessa região como nos trabalhos de Eurides, et al (52) na qual, relatou que a presença da crosta na ferida favorece o processo de cicatrização.

- Mensuração das imagens:

Segundo Cross, et al. (53), nestas espécies é essencial manter o animal numa posição padrão durante a mensuração, porém nenhum trabalho expôs claramente a posição ideal para realizar as mensurações. A exposição repetida do animal a procedimentos anestésicos pode ser deletéria à sua saúde, consome tempo e pode causar danos a ferida durante a indução da anestesia. Em seu trabalho com ratos e porquinhos-da-índia nenhuma anestesia adicional foi usada para a contenção e mensuração da área da ferida, contrastando com outros estudos onde a exposição repetida do animal à anestesia poderia aumentar seu estresse, e o risco de injúria ao delicado tecido de granulação da ferida, especialmente durante a fase de indução. Estes fatores são difíceis de controlar e são importantes por contribuírem para um atraso na contração da ferida. No presente trabalho foram tomados tais cuidados e, certamente, o temperamento dócil dos animais facilitou a manipulação diária sem anestesia, evitando-se lesão adicional às feridas e a mensuração das imagem foram realizadas nos procedimentos cirúrgicos iniciais e finais.

O programa computacional para análise de área utilizado neste trabalho também foi utilizado por Griffin, et al. (26) e Pires (54), que relatam a obtenção de resultados fidedignos.

- Animal acordado:

O tratamento no PO1 teve início com os animais completamente acordados, tendo em vista a interferência do anestésico no limiar sensitivo.

- Padronização dos dias 3,5,7,9:

Os grupos foram separados em subgrupos de 3, 5, 7 e 9 dias como padronização para observar a cicatrização de uma ferida aguda do rato e se a corrente EEAIV influenciou alguma dessas fases.

O trabalho de Girardi (55) também utilizou a mesma padronização de dias de tratamento, entretanto no trabalho de Martins, et al. (56) utilizou 3, 7, 14 e 21 dias e Araújo, et al. (57) 3, 7 e 14 dias de tratamento.

- Início com polaridade negativa:

As feridas tratadas inicialmente como eletrodo ativo (com a polaridade negativa) posicionado sobre a ferida apresentaram maior redução das áreas comparativamente ao grupo que não recebeu a EEAV, semelhante ao observado por Houghton, et al. (27) e Unger, Eddy, Raimastry (58) que relatam que a estimulação anódica pode exercer efeito bactericida, sugerindo que esta polaridade seja iniciada e mantida até que a lesão apresente uma aparência serosanguínea, devendo-se posteriormente inverter a polaridade. É unânime a opinião de que o tratamento de úlceras cutâneas crônicas deve ser iniciado com o eletrodo ativo posicionado sobre a úlcera com a polaridade negativa.

- A cada 3 dias a alternância de polaridade:

As aplicações foram realizadas seguindo protocolo descrito por Feedar, et al. (23) que sugeriu tratamento a cada três ou sete dias, alternando-se a polaridade.

Segundo Lampe (59), diferentes polaridades podem interferir na resposta tecidual, diferentes células podem migrar segundo a carga, o anodo atrai neutrófilos e macrófagos; o cátodo atrai neutrófilos, fibroblastos e leucócitos.

- Frequência de Pulsos:

A utilização de frequência dos pulsos de 100Hz segue os trabalhos de Pires⁵⁴ e Houghton, et al. (27) que obtiveram resultados efetivos no tratamento das feridas.

- Tempo 30 minutos:

O tempo de tratamento foi baseado nos trabalhos de Feedar, Kloth e Gentzkow (23) e Davini (28). Todavia, Griffin, et al. (26) e Pires (54) utilizaram 60 minutos de tratamento e Houghton, et al. (27) utilizou 45 minutos. Desta forma, apesar desses estudos utilizarem tempos diferentes de tratamentos, todos se mostraram efetivos no tratamento de feridas.

- Frequência de tratamento:

Não existe um consenso sobre a frequência de tratamento ideal, Sussmam (60) utilizou de cinco a sete dias, assim como foi utilizado neste trabalho; por sua vez, Davini (28) sugere o tratamento três vezes por semana.

- Padronização do sacrifício:

Padronizou-se o sacrifício dos animais no 1º dia após o tratamento, para completar 24 horas do último tratamento, por meio de overdose de tiopental por via endovenosa.

- Com relação à análise histológica:

Para as variáveis neovascularização, polimorfonucleares, mononucleares, proliferação fibroblástica, colágeno, os resultados não foram significativos, apenas para tecido necrótico que teve variável significativa ($p=0,0384$), o que vai contra o trabalho de Daeschlein (61) que relata que a polaridade negativa diminui necrose e edema.

A maioria dos trabalhos que obtiveram resultados favoráveis com eletroestimulação de alta voltagem como os de Silva (62) e Davini, et al. (63), foram estudos com feridas crônicas, todavia este trabalho estudou a cicatrização em feridas agudas. Um ponto levantado por Simões (64) é que feridas agudas têm excelente capacidade de regeneração, feridas crônicas têm eventos fisiológicos tais como disfunção celular e desequilíbrio bioquímico, de eventuais alterações em algum dos componentes do processo de cicatrização (por exemplo, proteases e citocinas) que ocasionarão prejuízo maior nas feridas crônicas em relação às agudas (65). Desta forma, os resultados obtidos não foram significativos como os referidos para lesões crônicas tendo em vista terem sido avaliadas neste trabalho lesões agudas.

Silva (62) 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. (63) examinaram os efeitos da EEAV em quatro pacientes portadores de úlceras crônicas, utilizando parâmetros semelhantes e atribuíram os resultados positivos observados às alterações eletroquímicas e ao aumento da microcirculação da região. 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 (66).

- Análise macroscópica:

Na análise macroscópica a medida da área inicial da ferida em relação à área do molde original aumentou porque as bordas sofrem retração centrífuga devido a tensão elástica da pele circunjacente, perda de aderência à fáscia profunda, e mobilidade da pele do rato segundo Cross, et al. (53); Teo e Naylor (67). Porém essa variação não interferiu com a avaliação da área da ferida no presente trabalho, visto que o cálculo da contração depende da diferença entre as áreas inicial e a área medida no dia em que se quer avaliar a contração.

- Análise do tamanho da área no grupo de 3 e 5 dias:

Os resultados obtidos neste trabalho foram estatisticamente semelhantes entre os dias 3 e 5 assim, como foi obtido no trabalho de Girardi⁵⁵ na qual os dias 3 e 5 tiveram uma redução de 40% entretanto foi uma redução maior no que encontrado neste trabalho.

- Análise do tamanho da área no grupo de 7 e 9 dias:

Feitosa (68), em seu relato, apresentou uma redução de 41,22% da área da ferida em 7 dias, enquanto obteve-se 37,13% e Vieira, et al. (69) em seu estudo obteve 65% redução das feridas em 9 dias de tratamento utilizando flavonoides, redução maior da que a encontrada no presente trabalho, que foi 41%.

- Eletrodos em diferentes áreas:

Não foram encontrados trabalhos que tivessem feito essa relação eletrodo – área.

Apenas foram encontrados trabalhos sobre a posição do eletrodo, na qual, a soma das áreas dos eletrodos ativos não deve exceder a área total do eletrodo dispersivo. Brown (70) descobriu que os efeitos da eletroestimulação estendem-se e afetam 2 a 3 cm além da borda dos eletrodos. Assim os eletrodos ativos e dispersivos não devem entrar em contato, mantendo distância de 4 a 5 cm entre eles.

- Cicatrização dependendo da posição dos eletrodos:

As feridas dos grupos tratados cicatrizaram mais rápido do que as feridas do grupo controle assim como foi observado nos trabalhos de Feitosa (68).

O grupo com tratamento cranial apresentou redução significativa tanto para ferida A quanto para ferida adjacente B.

Entretanto mais estudos se fazem necessários a fim de se avaliar as possíveis causas para tais resultados.

8 - Conclusão

- A EEAV determinou uma maior contração das feridas, principalmente a ferida da região A cranial.

- Não houve diferença significativa para as variáveis: neovascularização, organização de fibras colágenas, proliferação fibroblástica, mononucleares e polimorfonucleares entre os grupos tratamento e controle, apenas tecido necrótico que foi mais presente no grupo tratamento do que controle.

- Há interferência da estimulação de uma ferida em outra ferida, já que tanto para o grupo cranial quanto para o grupo com estimulação caudal houve diferença significativa na redução das áreas A e B.

9- Referências

1- Figueiredo M. Úlceras varicosas. In: Pitta GBB, Castro AA, Burihan E, editores. Angiologia e cirurgia vascular: Guia ilustrado. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA. 2003; 29:1-10.

2- Barbosa VC, Campos MP, Sanches CA, Micheletti DS, Claro MT, Castro CES. Avaliação da efetividade da estimulação elétrica com Corrente de Alta Voltagem (EVA) associada aos cuidados de enfermagem na cicatrização de úlceras crônicas: uma revisão da literatura e dos procedimentos. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Fisioterapia, [trabalho de conclusão de curso de graduação]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2003.

3- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de condutas para tratamento de úlceras em hanseníase e diabetes / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed., rev. e ampl. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

4- Say KG, Gonçalves RC, Renno ACM, Parizatto NA. O tratamento fisioterapêutico de úlceras venosas crônicas através da laserterapia com dois comprimentos de onda. *Fisioterapia Brasil*. 2003; 4(1):39-48.

5- Amâncio ACG, et al. Estimulação ultra-sônica da integração de enxertos de pele total. Estudo experimental em coelhos. *Acta Ortop. Bras*. 2006;14(5):276-279.

6- Stralka SW, Jackson JA, Lewis AR. Treatment of hand and wrist pain: a randomized clinical trial of high voltage pulsed, direct current built into a wrist splint. *AAOHN Journal*. 1998; 46(5): 233-6.

- 7- Cesaretti IUR. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. *Pelle Sana*. 1998; 2: 10-2.
- 8- Santos VLCG. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte YAO, Diogo MJD. Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu; 2000; 265-306.
- 9- Bryant RA. Acute and chronic wounds: nursing management. 2ª ed. St Louis: Mosby; 1992;105-63.
- 10- Ross MH, Reith E, Rowrell L. *Histologia Texto e Atlas*. 2ª Edição. São Paulo, SP. Panamericana, 1993.
- 11- Brasileiro-Filho G, Pereira FEL, Pittela JEH, Bambirra EA, Barbosa AJA. *Patologia geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998;73-7.
- 12- Beck JL, D' amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J*. 1997; 11:365-73.
- 13- Rissau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*.1997; 386:671-4.
- 14- Neeman M, Abramovich R, Schiffenbauer YS, Tempel C. Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumors to the ovarian follicle. *Int. J. Exp. Pathol*.1997;78:57-70.
- 15- Arantes VN, Okawa RY, Petroianu A. Influência da icterícia obstrutiva na cicatrização de pele e de anastomose jejunal em ratos. *Rev Col Bras Cir*. 1999;26:269-73.
- 16- Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements. *Plast. Reconstr. Surg*. 2001;108:1713-26.

- 17- Rodrigues Junior M, Marra AR. Quando indicar a oxigenoterapia hiperbárica? Rev. Assoc. Med. Bras. São Paulo. 2004; 50(3).
- 18- Oliveira MSL, Komatsu CA, Ching AW, Faiwichow L. Tratamento de feridas complexas com uso de pressão negativa local método a vácuo. Rev. Brasileira de Cir.Plást. 2010;25(supl.),3:66.
- 19- Haar G. Princípios eletrofísicos e térmicos In: Kitchen S. Eletroterapia: prática baseada em evidências. 11. Ed. São Paulo/SP: Manole. 2003;20:313-29.
- 20- Stillings DA. Survey of the history of electrical nerve stimulation for pain to 1900. Medical instrumentation. 1975;9:255-9.
- 21- Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. Eletroterapia clínica. 3.ed. Barueri/SP: Manole. 2003.
- 22- Low J, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. 3ed. Barueri/SP: Manole. 2001:472.
- 23- Feedar JA, Kloth LC, Gentzkow GD. Chronic dermal ulcer healing enhanced with monophasic pulsed electrical stimulation. Physicals. Therapy. 1991;71:639-49.
- 24- Gentzkow GD, Miller KH. Electrical stimulation for dermal wound healing. ClinPodiatMedSurg. 1991; 4:827-41.
- 25- Gentzkow GD, Pollac SV. Improved healing of pressure ulcers using dermapulse, a new electrical stimulation device. Wounds. 1991;3:158-60.
- 26- Griffin J, Tooms RE, Mendius RA, Clifft JK, Vander ZR, Elzek F. Efficacy of high voltage pulsed current for healing of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. Phys. Ther. 1991;71(6):433-44.

- 27- Houghton PE, Kincaid CB, Lovell M, Campbell KE, Keast DH, Gail-Woobury M, et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. *Phys. Ther.* 2003; 83:17- 28.
- 28- Davini R. et al. Estimulação elétrica de alta voltagem uma opção de tratamento. *Revista brasileira de fisioterapia.* Maio 2005; 9(3):249-58.
- 29- Kloth LC, Cummings LP. *Electrotherapeutic Terminology in Physical Therapy.* Section on Clinical Electrophysiology and the American Physical Therapy Association. Alexandria: VA, 1990.
- 30- Starkey C. *Recursos Terapêuticos em Fisioterapia.* São Paulo: Manole, 2001:176-90.
- 31- Watson T. Estimulação elétrica para regeneração de feridas: uma revisão do conhecimento atual. In: Kitchen S. *Eletroterapia: prática baseada em evidências.* 11. Ed. São Paulo/SP: Manole. 2003,20: 313-29.
- 32- Kitchen S. *Eletroterapia: prática baseada em evidências.* 11. Ed. São Paulo/SP: Manole. 2003; 20: 313.
- 33-Sheffet AA, Cytryn S, LouriaDB. Applying electric and electromagnetic energy as adjuvant treatment for pressure ulcers: a critical review. *Ostomy Wound Management.* 2000, 46(2):28-33, 36-40, 42-44.
- 34- Stefanovska A, Vodovnik L, Benko H, Turk, R. Treatment of chronic wounds by means of electric and electromagnetic fields: Part 2: Value of FES parameters for pressure sore treatment. *Medical and Biological Engineering and Computing.* 1993, 31:213-220.

- 35- Baker, LL, Chambers, R, DeMuth, SK, Villar, F. Effects of electrical stimulation on wound healing in patients with diabetic ulcers. *Diabetes Care*.1997, 20(3): 405-412.
- 36- Weiss DS, Kirsner R, Eaglstein WH. Electrical stimulation and wound healing. *Archives of dermatology*.1990, 126:222-5.
- 37- Gentzkow GD e Miller KH. Electrical stimulation for dermal wound healing. *Clin. Podiatr. Med. Chem. Surg.* 1991, 8: 827-841.
- 38- Reich JD, Cazzaniga AL, Mertz PM, Kerdel FA, e Eaglstein WH. O efeito da estimulação elétrica sobre o número de mastócitos na cicatrização de feridas. *J. Am. Acad. Dermatol.*,1991, 25:40-6.
- 39- Fitzgerald GK e Newsome D. Tratamento de uma grande ferida coluna torácica infectado usando alta tensão corrente pulsada monofásica. *Phys. Ther.* 1993. 73; 355-60.
- 40- Gentzkow GD. A estimulação elétrica para curar as feridas dérmicas. *J. Dermatol. Surg. \ Oncol.* 1993;19:753-8.
- 41- Mawson AR, Siddiqui FH e Biundo JJ, Jr. A resistência do hospedeiro Melhorar a úlceras de pressão: uma nova abordagem para a prevenção. *Prev. Med. Chem.* 1993; 22:433-50.
- 42- Agren MS, Engel MA, PM e Mertz. Colagenase durante a cicatrização de queimadura: a influência de um curativo de hidrogel e estimulação elétrica pulsada. *Plast. Reconstr. Surg.* 1994;94: 518-24.
- 43- Castillo E, Sumano H, Fortoul TI, Zepeda A. A influência da estimulação elétrica pulsada no processo de cicatrização da pele de ratos queimada. *Arch. Med. Chem. Res.* 1995;26:185-9.

- 44- Bauerle e J. Neander KD. Utilização de estimulação elétrica pulsada na terapia de úlceras de decúbito. *Krankenpfl.* 1996;34: 270-5.
- 45- Fleischli JG e Laughlin TJ. A estimulação elétrica na cicatrização de feridas. *J. Pé Surg tornozelo.* 1997;36:457-61.
- 46- Gilcreast DM, Stotts NA, Froelicher ES, Baker LL, e Moss KM. Efeito da estimulação elétrica sobre a perfusão pé pele em pessoas com ou em risco de úlceras do pé diabético. *Ferida. Reparação Regeneração.* 1998;6:434-41.
- 47-Houghton PE e Campbell KE. A escolha de uma terapia adjuvante para o tratamento de feridas crônicas. *Ostomia. Ferida. Gerenciar.* 1999;45:43-52.
- 48- Bogie KM, Reger SI, Levine SP, e Sahgal V. A estimulação elétrica para prevenção de úlcera de pressão e cicatrização de feridas. *Assist. Tecnologia.* 2000;12:50-66.
- 49- Dunn M G, Doillon CJ, Berg RA, Olson RM, Silver FH. Wound healing using a collagen matrix: Effect of DC electrical stimulation. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1988;22:191-206.
- 50- Kashyap A, Buzhold D, Wiseman J, et al. Effect of povidone iodine dermatologic ointment on Wound healing. *The American Surgeon.* 1995;61(6): 486-91.
- 51- Mendes Junior ECS, Viterbo F, Rosa CS. Análise histológica e morfométrica da área cruenta tratada com membrana de silicone: estudo em ratos. *Rev. Assoc. Med. Bras.*[online]. 2007, vol.53, n.5, pp. 395-400. ISSN 0104-4230.
- 52- Eurides D, Mazzanti A, Gonçalves GF. et al. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de

camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). *Veterinária Notícias*. 1998;4(1):77-82.

53- Cross SE, Naylor IL, Coleman RA, et al. An experimental model to investigate the dynamics of Wound contraction. *British journal of Plastic Surgery*. 1995;48(4):189-97.

54- Pires EJ. Fisioterapia na cicatrização e recuperação funcional nos portadores de úlceras de hipertensão venosa crônica: uso da estimulação elétrica com corrente de alta voltagem [dissertação]. São Paulo - SP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005.

55- Girardi RCG. Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de ratos. Dissertação de Mestrado em Bioengenharia. Universidade de São Paulo: São Carlos, 2005.

56- Martins NLP, Malafaia O, Ribas-Filha JM, Heibel M, Baldez RN Vasconcelos PRL, Moreira H, Mazza M, Nassif PAN. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignyaphalerata (babaçu)*. *Estudo controlado em ratos*. *Acta Cir Bras*. [periódico na internet] 2006; 21(Supl 3):66-75.

57- Araújo CFR, Souza F^o ZA, Greca FH, et al. Efeitos do Agarol[®] e do Trigliceril[®] sobre a cicatrização de pele: estudo experimental em ratos. *Acta Cir.Bras*. 1998;13(4):232-7.

58- Unger P, Eddy J, Raimastry SA. Controlled study of the effect of high voltage pulsed current (HVPC) on Wound healing. *Phys Ther*. 1991;71:5-119

59- Lampe KE. Electrotherapy in tissue repair. *Journal of Hand Therapy*. 1998;11(2):131-139.

60- Sussman C. e BYL N. Electrical stimulation for wound healing. In: Sussman C, Bates-Jensen, BM. Editor. Wound care collaborative practice manual for physical therapists and nurses. Gaithersburg: Aspen Publishers; 1998;427-6.

61- Daeschlein G, Assadlan O, Kloth LC, Meinel C, Ney F, Kramer A. Antibacterial activity of positive and negative polarity low-voltage pulsed current (LVPC) on six typical Gram-positive and Gram-negative bacterial pathogens of chronic wounds. Wound Repair Regeneration.2007; 15: 399-403.

62- Silva EFH. 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.

63- Davini R et al. Tratamento de úlceras cutâneas crônicas por meio da estimulação elétrica de alta voltagem. Revista de Ciências Médicas.2005; 14(3):249-58.

64- Simões MJ, Uzunian A, Mora AO, Sasso WS. Aspectos ultra-estruturais do processo de reparação da pele de ratos albinos. Revista Paulista de Medicina.1985; 103(3):123-6.

65- Enoch S, Harding K. Wound bed preparation: The Science behind the removal of barriers to healing. Wound. 2003; 7(15):213-29.

66- Frade MAC, Cursi IB, Andrade FF, Soares SC, Ribeiro WS, Santos SV, Foss NT. Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora – MG (Brasil) e região. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2005; 80(1):41-6.

67- Teo TC, Naylor IL. Modifications to the rate of wound contraction by

Allopurinol. *British Journal of Plastic Surgery*.1995;48(4):198-202.

68- Feitosa, VC. Efeito da Estimulação Elétrica de alta Voltagem em diferentes parâmetros na lesão tegumentar. 8º Congresso de Pós-Graduação. Universidade Metodista Piracicaba, 2010.

69- Vieira AP, Santos NR, Borge JHS, Vicenzi MPA, Schmitz WO. Ação dos flavonoides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. *Ciências Biológicas e da Saúde*. 2008; 29(1):65-74.

70- Brown MB. Electrical stimulation for wound management. In: Gogia, PP. (ed). *Clinical Wound Management*.Thorofare, NJ, Slack.1995: 176-83.

10 - Anexos

Anexo 1: Análise descritiva e comparação da área entre tratamentos, locais e tempos em cada grupo.

GRUPO	TRATAMENTO	Variável	N	Média	dp	mínimo	mediana	máximo
3	Caudal	AREACRANIAL1	6	2.78	0.23	2.54	2.74	3.05
		AREACRANIAL2	6	2.08	0.24	1.79	2.04	2.43
		AREACAUDAL1	6	3.12	0.42	2.80	2.93	3.87
		AREACAUDAL2	6	2.80	0.38	2.30	2.72	3.44
	Controle	AREACRANIAL1	6	3.72	0.52	3.27	3.57	4.75
		AREACRANIAL2	6	4.35	0.79	3.07	4.61	5.25
		AREACAUDAL1	6	4.43	0.58	3.81	4.27	5.47
		AREACAUDAL2	6	3.96	0.61	3.08	3.99	4.70
	Cranial	AREACRANIAL1	6	2.87	0.21	2.57	2.96	3.05
		AREACRANIAL2	6	2.32	0.51	1.86	2.10	2.97
		AREACAUDAL1	6	3.07	0.37	2.51	3.18	3.48
		AREACAUDAL2	6	2.91	0.38	2.62	2.71	3.45
5	Caudal	AREACRANIAL1	6	3.59	0.48	3.03	3.66	4.16
		AREACRANIAL2	6	2.93	0.46	2.34	2.99	3.51
		AREACAUDAL1	6	3.69	0.57	3.00	3.63	4.53
		AREACAUDAL2	6	3.18	0.38	2.67	3.14	3.69
	Controle	AREACRANIAL1	6	3.38	0.39	2.82	3.42	3.97
		AREACRANIAL2	6	3.51	0.70	2.94	3.14	4.57
		AREACAUDAL1	6	4.05	0.45	3.48	4.15	4.57
		AREACAUDAL2	6	3.62	0.58	2.90	3.60	4.51
	Cranial	AREACRANIAL1	6	3.64	0.48	3.14	3.62	4.40
		AREACRANIAL2	6	2.70	0.16	2.55	2.66	2.95
		AREACAUDAL1	6	3.94	0.42	3.42	3.80	4.61
		AREACAUDAL2	6	3.10	0.62	2.35	3.25	3.71
7	Caudal	AREACRANIAL1	6	3.73	1.34	2.77	3.30	6.40
		AREACRANIAL2	6	1.96	0.35	1.45	2.08	2.37
		AREACAUDAL1	6	4.43	2.42	2.84	3.68	9.28
		AREACAUDAL2	6	2.08	0.29	1.83	1.96	2.58
	Controle	AREACRANIAL1	6	3.30	0.37	2.94	3.28	3.96
		AREACRANIAL2	6	2.43	0.44	2.05	2.27	3.25
		AREACAUDAL1	6	3.48	0.24	3.21	3.39	3.86
		AREACAUDAL2	6	2.57	0.34	2.08	2.55	3.01
	Cranial	AREACRANIAL1	6	3.10	0.19	2.84	3.09	3.34
		AREACRANIAL2	6	1.61	0.33	1.16	1.66	2.00
		AREACAUDAL1	6	3.23	0.24	2.83	3.25	3.55
		AREACAUDAL2	6	2.13	0.59	1.36	2.06	3.12
9	Caudal	AREACRANIAL1	6	3.50	0.26	3.14	3.56	3.87
		AREACRANIAL2	6	2.18	0.38	1.73	2.18	2.71
		AREACAUDAL1	6	3.21	0.45	2.63	3.17	3.84
		AREACAUDAL2	6	2.42	0.41	2.01	2.35	3.20
	Controle	AREACRANIAL1	6	3.43	0.46	2.76	3.40	4.18
		AREACRANIAL2	6	1.77	0.44	1.10	1.73	2.47
		AREACAUDAL1	6	3.57	0.32	3.03	3.61	4.01
		AREACAUDAL2	6	2.21	0.67	1.41	2.13	3.45
	Cranial	AREACRANIAL1	6	3.48	0.44	2.76	3.55	4.05
		AREACRANIAL2	6	1.55	0.37	1.00	1.55	2.11
		AREACAUDAL1	6	3.73	0.16	3.54	3.71	4.00
		AREACAUDAL2	6	2.10	0.33	1.79	1.99	2.67

Anexo 2 – Análise descritiva e comparação da neovascularização entre grupos, tratamentos e locais.

GRUPO	TRATAMENTO	Variável	N	Média	dp	mínimo	mediana	máximo
3	Caudal	ProlifVascCr	6	1.83	0.41	1.00	2.00	2.00
		ProlifVascC	6	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00
	Controle	ProlifVascCr	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
		ProlifVascC	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
	Cranial	ProlifVascCr	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
		ProlifVascC	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
5	Caudal	ProlifVascCr	6	2.50	0.55	2.00	2.50	3.00
		ProlifVascC	6	1.83	0.75	1.00	2.00	3.00
	Controle	ProlifVascCr	6	1.83	0.75	1.00	2.00	3.00
		ProlifVascC	6	2.00	1.10	1.00	2.00	3.00
	Cranial	ProlifVascCr	6	2.33	0.52	2.00	2.00	3.00
		ProlifVascC	6	2.33	0.82	1.00	2.50	3.00
7	Caudal	ProlifVascCr	6	2.00	0.63	1.00	2.00	3.00
		ProlifVascC	6	1.67	0.52	1.00	2.00	2.00
	Controle	ProlifVascCr	6	2.83	0.41	2.00	3.00	3.00
		ProlifVascC	6	2.50	0.55	2.00	2.50	3.00
	Cranial	ProlifVascCr	6	2.33	0.82	1.00	2.50	3.00
		ProlifVascC	6	2.17	0.41	2.00	2.00	3.00
9	Caudal	ProlifVascCr	6	2.17	0.75	1.00	2.00	3.00
		ProlifVascC	6	2.17	0.75	1.00	2.00	3.00
	Controle	ProlifVascCr	6	2.17	0.41	2.00	2.00	3.00
		ProlifVascC	6	2.33	0.52	2.00	2.00	3.00
	Cranial	ProlifVascCr	6	2.17	0.75	1.00	2.00	3.00
		ProlifVascC	6	1.67	0.52	1.00	2.00	2.00
Resultados da EEG modelo de Poisson:								
Efeito			valor-p					
GRUPO			0.1234					
TRATAMENTO			0.3074					
GRUPO*TRATAMENTO			0.4232					
local			0.3283					
GRUPO*local			0.3885					
TRATAMENTO*local			0.5121					
GRUPO*TRATAMEN*local			0.4232					

Anexo 3 – Análise descritiva das células mononucleares entre grupos, tratamentos e locais.

GRUPO	TRATAMENTO	Variável	N	Média	dp	mínimo	mediana	máximo
3	Caudal	MononuclCr	6	2.17	0.41	2.00	2.00	3.00
		MononuclC	6	2.33	0.52	2.00	2.00	3.00
	Controle	MononuclCr	6	2.00	0.63	1.00	2.00	3.00
		MononuclC	6	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00
	Cranial	MononuclCr	6	2.17	0.41	2.00	2.00	3.00
		MononuclC	6	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00
5	Caudal	MononuclCr	6	2.00	0.63	1.00	2.00	3.00
		MononuclC	6	2.50	0.55	2.00	2.50	3.00
	Controle	MononuclCr	6	2.50	0.84	1.00	3.00	3.00
		MononuclC	6	2.50	0.55	2.00	2.50	3.00
	Cranial	MononuclCr	6	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00
		MononuclC	6	2.50	0.55	2.00	2.50	3.00
7	Caudal	MononuclCr	6	2.17	0.41	2.00	2.00	3.00
		MononuclC	6	2.50	0.55	2.00	2.50	3.00
	Controle	MononuclCr	6	2.17	0.41	2.00	2.00	3.00
		MononuclC	6	2.33	0.52	2.00	2.00	3.00
	Cranial	MononuclCr	6	2.17	0.41	2.00	2.00	3.00
		MononuclC	6	2.50	0.55	2.00	2.50	3.00
9	Caudal	MononuclCr	6	2.33	0.52	2.00	2.00	3.00
		MononuclC	6	2.50	0.55	2.00	2.50	3.00
	Controle	MononuclCr	6	2.33	0.52	2.00	2.00	3.00
		MononuclC	6	2.33	0.52	2.00	2.00	3.00
	Cranial	MononuclCr	6	2.67	0.52	2.00	3.00	3.00
		MononuclC	6	2.33	0.52	2.00	2.00	3.00

Resultados da EEG modelo de Poisson:

Efeito	valor-p
GRUPO	0.1635
TRATAMENTO	0.8634
GRUPO*TRATAMENTO	0.4232
local	0.0969
GRUPO*local	0.2309
TRATAMENTO*local	0.3467
GRUPO*TRATAMEN*local	0.4232

Anexo 4 – Análise descritiva da variável polimorfonucleares entre grupos, tratamentos e locais.

GRUPO	TRATAMENTO	Variável	N	Média	dp	mínimo	mediana	máximo
3	Caudal	PolimorfoCr	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
		PolimorfoC	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
	Controle	PolimorfoCr	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
		PolimorfoC	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
	Cranial	PolimorfoCr	6	1.17	0.41	1.00	1.00	2.00
		PolimorfoC	6	1.17	0.41	1.00	1.00	2.00
5	Caudal	PolimorfoCr	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
		PolimorfoC	6	1.50	0.84	1.00	1.00	3.00
	Controle	PolimorfoCr	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
		PolimorfoC	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
	Cranial	PolimorfoCr	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
		PolimorfoC	6	1.17	0.41	1.00	1.00	2.00
7	Caudal	PolimorfoCr	6	1.17	0.41	1.00	1.00	2.00
		PolimorfoC	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
	Controle	PolimorfoCr	6	1.17	0.41	1.00	1.00	2.00
		PolimorfoC	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
	Cranial	PolimorfoCr	6	1.67	0.52	1.00	2.00	2.00
		PolimorfoC	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
9	Caudal	PolimorfoCr	6	1.50	0.84	1.00	1.00	3.00
		PolimorfoC	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
	Controle	PolimorfoCr	6	1.17	0.41	1.00	1.00	2.00
		PolimorfoC	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
	Cranial	PolimorfoCr	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
		PolimorfoC	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00

Resultados da EEG modelo de Poisson:	
Efeito	valor-p
GRUPO	0.2178
TRATAMENTO	0.6912
GRUPO*TRATAMENTO	0.4232
local	0.2876
GRUPO*local	0.3087
TRATAMENTO*local	0.2071
GRUPO*TRATAMEN*local	0.4232

Anexo 5 – Análise descritiva da variável proliferação fibroblástica entre grupos, tratamentos e locais.

GRUPO	TRATAMENTO	Variável	N	Média	dp	mínimo	mediana	máximo
3	Caudal	ProliFibroCr	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
		ProliFibroC	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
	Controle	ProliFibroCr	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
		ProliFibroC	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
	Cranial	ProliFibroCr	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
		ProliFibroC	6	1.67	0.52	1.00	2.00	2.00
5	Caudal	ProliFibroCr	6	2.83	0.41	2.00	3.00	3.00
		ProliFibroC	6	2.83	0.41	2.00	3.00	3.00
	Controle	ProliFibroCr	6	2.33	0.82	1.00	2.50	3.00
		ProliFibroC	6	1.67	0.52	1.00	2.00	2.00
	Cranial	ProliFibroCr	6	2.83	0.41	2.00	3.00	3.00
		ProliFibroC	6	2.50	0.55	2.00	2.50	3.00
7	Caudal	ProliFibroCr	6	2.83	0.41	2.00	3.00	3.00
		ProliFibroC	6	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00
	Controle	ProliFibroCr	6	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00
		ProliFibroC	6	2.33	0.52	2.00	2.00	3.00
	Cranial	ProliFibroCr	6	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00
		ProliFibroC	6	2.67	0.52	2.00	3.00	3.00
9	Caudal	ProliFibroCr	6	2.67	0.52	2.00	3.00	3.00
		ProliFibroC	6	2.83	0.41	2.00	3.00	3.00
	Controle	ProliFibroCr	6	3.00	0.00	3.00	3.00	3.00
		ProliFibroC	6	2.67	0.52	2.00	3.00	3.00
	Cranial	ProliFibroCr	6	2.67	0.52	2.00	3.00	3.00
		ProliFibroC	6	2.83	0.41	2.00	3.00	3.00

Efeito	valor-p
GRUPO	0.1128
TRATAMENTO	0.0699
GRUPO*TRATAMENTO	0.4232
local	0.0713
GRUPO*local	0.3722
TRATAMENTO*local	0.2313
GRUPO*TRATAMEN*local	0.4232

Anexo 6 – Análise descritiva da variável fibras colágenas entre grupos, tratamentos e locais.

GRUPO	TRATAMENTO	Variável	N	Média	dp	mínimo	mediana	máximo
3	Caudal	FibColageCr	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
		FibColageC	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
	Controle	FibColageCr	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
		FibColageC	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
	Cranial	FibColageCr	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
		FibColageC	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
5	Caudal	FibColageCr	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
		FibColageC	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
	Controle	FibColageCr	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
		FibColageC	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
	Cranial	FibColageCr	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
		FibColageC	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
7	Caudal	FibColageCr	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
		FibColageC	6	1.83	0.41	1.00	2.00	2.00
	Controle	FibColageCr	6	1.67	0.52	1.00	2.00	2.00
		FibColageC	6	1.83	0.41	1.00	2.00	2.00
	Cranial	FibColageCr	6	1.83	0.41	1.00	2.00	2.00
		FibColageC	6	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00
9	Caudal	FibColageCr	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
		FibColageC	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
	Controle	FibColageCr	6	1.50	0.55	1.00	1.50	2.00
		FibColageC	6	1.17	0.41	1.00	1.00	2.00
	Cranial	FibColageCr	6	1.33	0.52	1.00	1.00	2.00
		FibColageC	6	1.17	0.41	1.00	1.00	2.00
Resultados da EEG modelo de Poisson:								
Efeito			valor-p					
GRUPO			0.1164					
TRATAMENTO			0.5775					
GRUPO*TRATAMENTO			0.4232					
local			0.0750					
GRUPO*local			0.4585					
TRATAMENTO*local			0.2509					
GRUPO*TRATAMEN*local			0.4232					



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

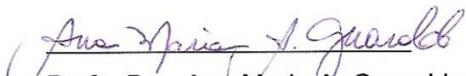
CERTIFICADO

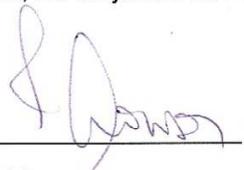
Certificamos que o Protocolo nº **2168-1**, sobre "**Estimulação com corrente pulsada de alta voltagem (HVPS) na cicatrização de áreas cruentas. Modelo experimental com ratos Wistar**", sob a responsabilidade de **Dr. Paulo Kharmandayan / Janaina Ticiane Genaro**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **28 de junho de 2010**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2168-1**, entitled "**Stimulation with pressed current of high voltage (HVPS) in the cicatrization of cruent areas. Experimental model in Wistar rats**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **June 28, 2010**.

Campinas, 28 de junho de 2010.


Profa. Dra. Ana-Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

