

Avaliação do Efeito da Microcorrente na Reparação de Feridas Cutâneas em Ratos

Evaluation of Microcurrent Effect on Repairing Skin Wounds in Rats

Belle Virginia da Silva Coimbra Rodrigues^{a*}; Suellen Borges de Souza^b; Thayanne Caroline Pereira Munhoz^b; Gracieli Nonato Bressanin^a; Alessandra Aparecida Cunha Lopes^b; Coline Cristiellen dos Reis^b; Luana Almeida de Oliveira^b; Andréia Lima Tomé Melo^a; Armando de Mattos Carvalho^a; Lázaro Manoel de Camargo^a

^aUniversidade de Cuiabá, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociência Animal. MT. Brasil.

^bUniversidade de Cuiabá, Curso de Medicina Veterinária. MT. Brasil

*E-mail: bellecoimbra@hotmail.com

Resumo

A bioeletricidade tem se tornando cada vez mais reconhecida no mundo científico devido a sua importante contribuição na cicatrização de feridas. Dentro desta modalidade terapêutica está inserida a terapia com microcorrente, que por ter baixa frequência e pequena intensidade é capaz de promover o restabelecimento do potencial elétrico das células. Por se tratar de uma corrente de elevado potencial, durante o processo de reparação tecidual, esta pode atuar tanto na fase inflamatória quanto na proliferativa. Dessa maneira, este estudo teve por objetivo principal avaliar a resposta cicatricial quanto ao efeito da microcorrente em lesões cutâneas em ratos. Para tanto, foram utilizados 28 ratos Wistar, divididos em dois grupos: grupo tratado (GT) e grupo controle (GC). Os animais de ambos os grupos foram submetidos a procedimento cirúrgico de lesão cutânea região cervical dorsal, seguido de tratamento com microcorrente durante 21 dias no GT, e sem tratamento específico no GC. Também foi realizada a avaliação termográfica a cada três dias de todos os animais. Após este período, foi feita eutanásia com posterior coleta de pele na região da lesão para avaliação histopatológica. Os resultados obtidos mostraram, a partir dos parâmetros analisados, a presença de um recurso capaz de incrementar a formação de novos vasos, embora não apresentasse efeito significativo em relação à proliferação de fibroblastos. Diante disso, sugere-se que a utilização da microcorrente possa ter favorecido a neovascularização nos tecidos dos animais analisados.

Palavras-chave: Rato. Microcorrente. Angiogênese. Reparo Tecidual.

Abstract

Bioelectricity has become increasingly recognized in the scientific world because of its important contribution to wound healing. Within this therapeutic modality the therapy with microcurrent is inserted, which because of low frequency and small intensity is able to promote the reestablishment of the cells electric potential. Because it is a high potential v during the tissue repair process, it can act both in the inflammatory and proliferative phases. Thus, this study had as main objective to evaluate the healing response regarding the microcurrent effect on rats' skin lesions. For this, 28 Wistar rats were divided into two groups: treated group (GT) and control group (CG). The animals of both groups underwent a surgical procedure of skin lesion in the dorsal cervical region, followed by treatment with microcurrent for 21 days in the GT, and without specific treatment in the CG. A thermographic evaluation was also performed every three days of all the animals. After this period, euthanasia was performed with subsequent skin collection in the lesion region for histopathological evaluation. The obtained results showed, from the analyzed parameters, the presence of a resource able to increase the new vessels formation, although it did not present significant effect in relation to the fibroblasts proliferation. Therefore, it is suggested that the use of microcurrent may have favored neovascularization in the tissues of the animals analyzed.

Keywords: Mouse. Microcurrent. Angiogenesis. Tissue Repair.

1 Introdução

A pele é um órgão de importância comprovada, pois sendo um tecido que recobre toda a superfície do corpo, esta atua como barreira mediadora entre o organismo e o ambiente, sendo composta por diferentes células e estruturas que garantem proteção, controle da temperatura corpórea, metabolismo de vitamina D e função sensorial (HARRIS, 2003).

Quando ocorre uma lesão, as células do organismo se organizam na tentativa de promover a reparação local adequada, e diversos fatores podem alterar o processo de reparo tecidual, cuja finalidade é restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido. Para que ocorra esta restauração, o organismo lança mão de um complexo mecanismo que envolve quimiotaxia, divisão celular, neovascularização, síntese de matriz proteica extracelular e remodelação da cicatriz (FERREIRA *et al.*, 2008).

Neste processo ocorre a diminuição da capacidade elétrica

da célula gerada pela inflamação estabelecida após a lesão, ocasionando redução da bioeletricidade celular, o que pode comprometer o tempo de restauração. Portanto, a qualidade da cicatriz formada depende, diretamente, dos eventos bioquímicos e celulares envolvidos neste processo, o que irá resultar em uma resposta tecidual à lesão (MENDONÇA *et al.*, 2006).

Nesse sentido, ao longo dos últimos anos, a bioeletricidade tem sido bastante utilizada como um importante recurso auxiliar no processo de cicatrização de feridas e, neste contexto, surgiu uma modalidade terapêutica que usa a microcorrente. Este tipo de terapia se baseia na geração de correntes elétricas semelhantes às produzidas pelo corpo, ou seja, ela recarrega as células com energia elétrica e, de maneira similar à corrente fisiológica, colabora positivamente para geração de energia celular. Isto promove uma ativação do metabolismo, bem como favorece a síntese de colágeno e elastina, que são proteínas importantes para

estruturção do tecido lesionado durante o processo de reparação (ZHAO *et al.*, 2006). A terapia com microcorrente favorece a regeneração tecidual, gerando energia celular para os tecidos do organismo, capacitando a célula para que ocorra aumento de adenosina trifosfato (ATP), angiogênese e a síntese de proteínas essenciais para o processo de reparo. Uma corrente subsensorial normaliza a atividade no interior da célula após esta ter sofrido algum tipo de lesão. Com a adição externa de microcorrente, ocorre o aumento da produção de ATP pela mitocôndria entre 300% e 500%; com isso, há síntese de proteínas, oxigenação, troca iônica, absorção de nutrientes e eliminação de catabólitos residuais, podendo também neutralizar a polaridade oscilante de células deficientes e estimular a drenagem linfática (AGNE, 2013).

Assim sendo, embora haja estudos na Medicina Humana, que abordem sobre a utilização da microcorrente como uma terapia no tratamento de traumas, ainda há necessidade de conhecer os benefícios gerados através da aplicação da mesma em lesões cutâneas e sua contribuição para regeneração tecidual adequada em animais, o que poderia ser uma alternativa de terapia também no âmbito médico veterinário. Assim sendo, este trabalho objetivou avaliar a resposta cicatricial quanto ao efeito da microcorrente em lesões cutâneas em ratos.

2 Material e Métodos

2.1 Modelo animal

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade de Cuiabá (CEUA/UNIC), registrada com o número 09/2016 em 07 de dezembro de 2016.

Neste estudo experimental foram utilizados 28 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso corpóreo entre 250 – 330 g, que foram adquiridos junto ao biotério do Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá. Os animais foram adaptados com dez dias de antecedência ao experimento em gaiolas individuais, mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23 °C e ciclo claro escuro controlado de 12 horas, tendo acesso à dieta e recebendo água *ad libitum*. Eles foram treinados, diariamente, quanto à contenção física utilizando um utensílio plástico cilíndrico com 21,5 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro.

2.2 Indução da lesão

Realizou-se a aplicação de 0,1 ml de lidocaína intraperitoneal, como bloqueio anestésico, seguida da anestesia xilazina (10 mg/kg) associada na mesma seringa de quetamina (80 mg/kg) via intraperitoneal. Após a verificação do plano anestésico, os ratos foram colocados em decúbito ventral e, depois da tricotomia e antissepsia da região cervical dorsal, foi feita a lesão com um punch 6 mm.

2.3 Tratamento com a técnica de microcorrente

Os ratos foram divididos em dois grupos de 14 animais

cada, sendo um grupo controle e um tratado. No grupo controle, um animal veio a óbito no decorrer do experimento, seguindo somente com 13 animais.

Grupo controle (GC): foi realizada a lesão cutânea na região cervical dorsal e, após o procedimento, os animais foram colocados e mantidos em gaiolas, sendo que o tratamento teve início depois de 24h da realização da lesão. Após a contenção física do animal, foi realizada a limpeza da lesão com solução fisiológica e, em seguida, aplicado gel Carbopol® (veículo para condução da corrente) no local. Os eletrodos foram posicionados em toda extensão da área lesionada e realizada a técnica de aplicação pontual diária por 2 minutos, sem a passagem da corrente. Este procedimento foi executado durante as 3 semanas seguintes.

Grupo tratado (GT): os animais foram submetidos à mesma lesão efetuada no grupo controle, e mantidos em gaiolas individuais, nas quais o tratamento também teve início depois de 24h da realização da lesão. Posteriormente à contenção física do animal, foi realizada a limpeza da lesão com solução fisiológica e aplicado gel Carbopol®. Em seguida, foi feita a aplicação diária da técnica pontual com passagem da corrente durante 2 minutos em toda extensão da lesão, por 3 semanas.

Para aplicação da microcorrente foi utilizado o equipamento Pshysiotonus Micro Current, da marca BIOSET®, que tem como característica da corrente o formato de pulso alternado, utilizando os seguintes parâmetros: frequência de 0,5 Hertz e intensidade de 10 microampéres, com o tempo pré-programado em 2 minutos. Os eletrodos tinham ponta esférica de metal e foram posicionados nas bordas da lesão, dando início à execução da técnica pontual em toda extensão. Os animais receberam a terapia todos os dias por um período de 21 dias.

2.4 Avaliação termográfica

As lesões cutâneas de ambos os grupos foram avaliadas a cada 72 horas, sempre após a contenção física dos ratos. Assim, a mensuração da temperatura da superfície da lesão seguiu o distanciamento de 25 cm e foi realizada com auxílio de uma câmera termográfica infravermelha FLIR i3, 3.600 PIXELS.

2.5 Eutanásia dos animais e coleta de fragmento cutâneo

Após os 21 dias de experimento foi feita a eutanásia dos animais, em que se realizou a anestesia com ketamina (80 mg/kg) associada na com xilazina (10 mg/kg), como na indução da lesão, seguida de tiopental (40 mg/kg). Após a administração do tiopental, monitorou-se o batimento cardíaco dos ratos, até a confirmação do óbito. Em seguida, foi realizada a coleta de fragmento cutâneo da área lesionada com o auxílio de uma pinça anatômica e um bisturi, o qual foi colocado sobre um pedaço de papel cartão, imerso no formol 10% e encaminhado para a análise histopatológica.

2.6 Análise histopatológica

No Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá, o fragmento cutâneo coletado foi fixado no formol a 10% e, posteriormente, clivado. Após este procedimento, o material foi retirado do formol e, depois, imergido em banhos de álcool, xilol e parafina. Posteriormente, foi incluído em blocos de parafina e cortado no micrótomo para confecção da lâmina, que foi submetida à coloração hematoxilina eosina (HE) e, então, montada para avaliação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.7 Análise estatística

Foi utilizado delineamento casualizado e as temperaturas

Quadro 1 - Temperatura durante o tratamento, grupo controle (GC) e grupo tratado (GT)

Grupo	TD3*	TD6*	TD9 ^{ns}	TD12 ^{ns}	TD15 ^{ns}	TD18 ^{ns}
(GC)	35,45 ± 0,85	35,30 ± 0,84	36,56 ± 0,47	35,73 ± 0,88	34,49 ± 0,81	32,59 ± 0,74
(GT)	36,06 ± 0,47	36,36 ± 0,82	36,95 ± 0,64	36,06 ± 0,45	34,75 ± 0,43	33,19 ± 0,84

*Significativo ($p < 0,05$) pelo Teste F

^{ns}não significativo ($p > 0,05$) pelo Teste F

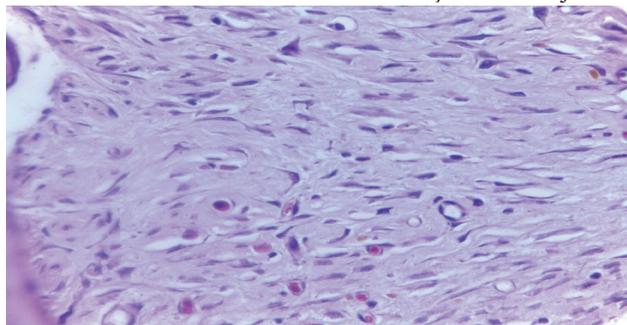
Fonte: Dados da pesquisa.

O aumento de temperatura, que foi observado, pode estar relacionado ao processo inflamatório formado logo após a lesão cutânea, visto que ocorre o aumento da permeabilidade vascular e, também, do fluxo sanguíneo para o local da inflamação. Dessa maneira, devido à dilatação dos vasos, a temperatura (calor) se eleva e também aumenta a exsudação, o que acarreta em edema (BECK; D'AMORE, 1997).

Além disso, já foi relatado que a estimulação elétrica em uma lesão consegue aumentar as atividades celulares, bem como elevar a concentração de ATP, favorecer a angiogênese e a geração de fatores quimiotáticos, os quais induzem a ocorrência de vasodilatação. Com isso, é possível inferir que tanto a angiogênese quanto a quimiotaxia resultam em aumento da temperatura local (ISSEROFF; DAHLE, 2011).

Em relação à análise histopatológica por microscopia das lâminas coradas com hematoxilina eosina (HE) dos animais utilizados neste estudo foram observadas algumas alterações. No grupo controle, após vinte e um dias da lesão sem a aplicação de microcorrente, a análise da lâmina com o tecido revelou discreta neovascularização e proliferação moderada de fibroblasto (Figura 1).

Figura 1 - Lesão do grupo controle após 21 dias, sem aplicação de microcorrente. Derme com proliferação focal moderada de fibroblastos e com discreta neovascularização. HE. Obj. 40x.



Fonte: Os autores.

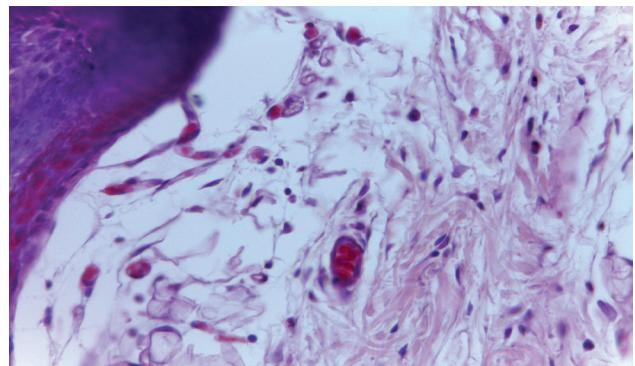
verificadas nas áreas das lesões foram submetidas à análise de variância, na qual as médias dos grupos controle e tratado foram comparadas pelo teste F a 5% probabilidade.

3 Resultados e Discussão

A partir da análise termográfica foi possível observar uma diferença de temperatura na área da lesão cutânea dos ratos no terceiro e sexto dia após a cirurgia, registrando-se maior temperatura média nos animais do grupo tratado (TD3: 36,06 °C e TD6: 36,36 °C) em relação ao grupo controle (TD3: 35,45 °C e TD6: 35,30 °C) ($p < 0,05$). Não houve diferença ($p > 0,05$) de temperatura na área de lesão cutânea nos demais dias de observação entre os grupos controle e tratado (Quadro 1).

Quanto ao grupo tratado, a lesão observada após vinte e um dias de aplicação da microcorrente revelou, durante a análise histopatológica da lâmina, a presença de uma proliferação moderada de fibroblastos e neovascularização moderada em áreas extensas (Figura 2).

Figura 2 - Lesão do grupo tratado após 21 dias, com aplicação de microcorrente. Derme com proliferação moderada de fibroblastos e neovascularização moderada. HE. Obj. 40x.



Fonte: Os autores.

Assim sendo, o grupo tratado apresentou uma melhor resposta aparente para neovascularização que o grupo controle, o que pode estar relacionado com o efeito da microcorrente sobre o tecido endotelial. Isso já foi observado em estudos anteriores, nos quais se verificou que um pequeno campo elétrico também poderia induzir respostas angiogênicas em células endoteliais, causando migração direcional significativa e orientação das mesmas (NISHIMURA; ISSEROFF; NUCCITELLI, 1996; ENNIS *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2012). De maneira similar, Bayat, Azari e Golmohammadi (2010) também observaram um aumento significativo de fibroblastos

e vasos sanguíneos em tecido lesionado.

Sabe-se que o processo de cicatrização da ferida consiste de fases complexas que começam logo após a lesão, sendo que o momento crucial ocorre durante a fase proliferativa. E nesta etapa do processo, a formação de novos vasos se torna de extrema importância para que o tecido receba o aporte sanguíneo adequado, gerando assim, oxigenação e nutrição celular. A formação de novos vasos sanguíneos acontece através da bifurcação e extensão dos capilares existentes, sendo indispensável para que o processo de cicatrização ocorra de forma bem-sucedida (DEMIDOVA-RICE; DURHAM; HERMAN, 2012; JUNG *et al.*, 2013). Isso também foi demonstrado em um estudo com microcorrente conduzido por Yu, Hu e Peng (2014), os quais verificaram a indução de respostas importantes pré-angiogênicas das células endoteliais na fase proliferativa.

Além disso, já existe relato sobre a eficácia da estimulação elétrica na indução da angiogênese *in vivo*, que pode ser mediada a partir da expressão local do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Nesse sentido, os campos elétricos também realizam a migração, reorientação e alongamento de células endoteliais de vasos da microcirculação. Assim, as células endoteliais da microcirculação apresentam comportamentos diferentes quando comparadas com tecidos macrovasculares, sugerindo que cada tipo celular possui uma disposição distinta de receptores e tolerância a campos elétricos diferentes, contribuindo para a ativação ou não do fator de crescimento endotelial vascular (BAI *et al.*, 2004).

Embora haja indícios da comprovação de que campos elétricos possam influenciar a migração de fibroblastos (JENNINGS; CHEN; FELDMAN, 2008), neste estudo se verificou que o grupo tratado e o grupo controle não apresentaram diferença ($p > 0,05$) significativa quanto à proliferação destas células, não sendo possível afirmar se houve ou não influência da terapia utilizada. Este resultado pode estar relacionado às características do animal submetido ao experimento, pois a literatura demonstra que comparando a derme dos roedores com a dos humanos, há uma diferença de espessura e há presença de pêlos, o que pode afetar a condução da corrente elétrica, gerando um impedimento para o seu transporte e comprometendo a ação terapêutica na região submetida ao tratamento (ISSEROFF; DAHLE, 2011).

4 Conclusão

Em suma, a partir dos achados observados no presente estudo, é possível inferir que a aplicação de microcorrente demonstrou, através dos parâmetros analisados, uma provável capacidade de incrementar a formação de novos vasos. Diante disso, sugere-se a utilização de outros parâmetros elétricos como frequência, intensidade e tempo de aplicação da microcorrente para uma melhor análise do seu efeito em tecidos lesionados em animais.

Referências

- AGNE, J. E. *Eletrotermofototerapia*. Santa Maria: Pallotti, 2013.
- BAI, H. *et al.* DC electric fields induce distinct preangiogenic responses in microvascular and macrovascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.24, n.7, p.1234-1239, 2004.
- BAYAT, M.; AZARI, A.; GOLMOHAMMADI, M. G. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. *Photomed Laser Surg.*, v.28, n.4, p. 465-70, 2010.
- BECK JUNIOR, L.; D'AMORE, P.A. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.*, v.11, n.5, p.365-73, 1997.
- DEMIDOVA-RICE, T.N.; DURHAM, J.T.; HERMAN, I.M. Wound healing angiogenesis: innovations and challenges in acute and chronic wound healing. *Adv Wound Care*, v.1, p.17-22, 2012.
- ENNIS, W.J. *et al.* Current status of the use of modalities in wound care: electrical stimulation and ultrasound therapy. *Plast Reconstr Surg.*, v.127, p.93S.
- FERREIRA, A.S. *et al.* Mensuração de área de cicatrização por planimetria após aplicação do ultrassom de baixa intensidade em pele de rato. *Rev. Bras. Fisioter.*, v.12, p.351-358, 2008.
- HARRIS, M. I. *Pele: estrutura, propriedade e envelhecimento*. São Paulo: Senac, 2003.
- ISSEROFF, R.R.; DAHLE, S.E. Electrical stimulation therapy and wound healing: where are we now? *Adv Wound Care*, v.1, n.6, p.238-243, 2012.
- JENNINGS, J.; CHEN, D.; FELDMAN, D. Transcriptional response of dermal fibroblasts in direct current electric fields. *Bioelectromagnetics*, v.29, p.394-405, 2008.
- JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- JUNG, M. *et al.* Mast cells produce novel shorter forms of perlecan that contain functional endorepellin: a role in angiogenesis and wound healing. *J. Bio Chem.*, v.288, p.3289-3304, 2013.
- MENDONÇA, A.C. *et al.* Efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Acta Ortop. Bras.*, v.14, n.3, p.152-7, 2006.
- NISHIMURA, K.Y.; ISSEROFF, R.R.; NUCCITELLI, R. Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds. *J. Cell Sci.*, v.109, Pt.1, p.199, 1996.
- YU, C.; HU, Z.Q.; PENG, R.Y. Effects and mechanisms of a microcurrent dressing on skin wound healing: a review. *Mil Med Research*, v.1, p.24, 2014.
- ZHAO, M. *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-c and PTEN. *Nature*, v.442, p.457, 2006.
- ZHAO, Z. *et al.* Directing migration of endothelial progenitor cells with applied DC electric fields. *Stem Cell Res.*, v.8, p.38-48, 2012.