



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

MARIA DOS PRAZERES CARNEIRO CARDOSO

**PRÉCONDICIONAMENTO COM ÁCIDOS GRÁXOS MONO E
POLIINSATURADOS E ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE BAIXA INTENSIDADE
NO REPARO TECIDUAL DE RATOS**

FORTALEZA

2012

MARIA DOS PRAZERES CARNEIRO CARDOSO

PRÉCONDICIONAMENTO COM ÁCIDOS GRÁXOS MONO E POLIINSATURADOS E
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO TECIDUAL DE
RATOS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos .

Fortaleza-Ceará

2012

MARIA DOS PRAZERES CARNEIRO CARDOSO

**PRÉCONDICIONAMENTO COM ÁCIDOS GRÁXOS MONO E
POLIINSATURADOS E ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE BAIXA INTENSIDADE
NO REPARO TECIDUAL DE RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (Orientador)

Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Antônio Wilson Vasconcelos

Universidade Estadual do Ceará-UECE

Prof. Dra. Daniela Gardano Bucharles Mont'Alverne

Universidade de Fortaleza-UNIFOR

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luiz Alves da Silva (in memorian) e
Valderice Carneiro da Silva, pelo apoio, exemplo e
dedicação.

Ao meu esposo, Jeovah Cardoso de Oliveira,
pelo incentivo e carinho.

E as minhas filhas Gabriela Carneiro Cardoso e Ana
Luiza Carneiro Cardoso, amigas da paciência ,
tolerância e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior que fortalece e anima a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade, competência e gentil orientação.

Ao Professor Titular NIVALDO ANTÔNIO PARIZOTTO, Fisioterapeuta do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, pela disponibilidade e competência.

À Professora Titular GERLYANNE DE CASTRO BRITO, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, pela compreensão e disponibilidade.

À Professora VIRGINIA CLAUDIA CARNEIRO GIRÃO, Adjunta do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade e gentil orientação.

À Professora MARGARIDA MARIA DE LIMA POMPEU, Adjunta do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade e gentil orientação.

Ao Professor ANTÔNIO WILSON VASCONCELOS, Adjunto e Coordenador do Curso de Medicina da Universidade do Estado do Ceará, pela disponibilidade na orientação.

Ao Professor ALEJANDRO PEDRO AYALA, Adjunto do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade em auxiliar na pesquisa.

À Nutricionista ALINE MATOS CUNHA, pelo preparo das misturas de óleos ômega 3, 6 e 9, utilizados no experimento e disponibilidade em prestar esclarecimentos.

À Técnica em Laboratório CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS, do Departamento de Morfologia, pela disponibilidade e agilidade no preparo das soluções utilizadas .

À técnica em enfermagem DANIELE FEIJÃO DE SOUZA, pela sua contribuição, experiência e competência do início ao fim do experimento.

À aluna ANDREA DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE, graduanda do Curso de Enfermagem, pela sua amizade e contribuição desde o início do experimento, até a finalização deles.

Ao aluno BRUNO HALLAN MENESES, graduando do Curso de Medicina, pelo auxílio nas interpretações dos resultados da pesquisa.

À aluna GARDÊNIA DE SOUSA PINHEIRO, doutoranda do Departamento de Física, pela disponibilidade em auxiliar no experimento.

Ao técnico em laboratório JOSÉ ERINALDO GOMES DE SOUZA, da Faculdade Christus, pelo auxílio na confecção dos blocos e das lâminas histopatológicas.

Ao Sr. OSVALDO FEDELL, diretor administrativo da empresa HTM- Eletrônica pela liberação do equipamento para a pesquisa.

Ao Sr. BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA, assistente técnico do Biotério do laboratório de cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela presteza em atender as nossas necessidades.

As Senhoras MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, secretárias do Programa de Pós-graduação Strictu Sensu do departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela dedicação e auxílio constantes.

Ao colega fisioterapeuta ÁLVARO XAVIER FRANCO, colaborador do laboratório de farmacologia da inflamação e do câncer, pelos resultados das lâminas de imunohistoquímica.

A minha colega LEIDELAMAR ALVES DE OLIVEIRA, fisioterapeuta , pelo apoio moral .

“A disciplina é a chama refinadora através
da qual o talento se transforma em capacidade”.

Roy Smith

RESUMO

Pré-condicionamento com ácidos graxos mono e poliinsaturados e estimulação elétrica de baixa intensidade no reparo tecidual de ratos. **MARIA DOS PRAZERES CARNEIRO CARDOSO**, Pós-Graduação *Srictu Sensu* em Cirurgia, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Ciências Médicas Cirúrgicas). Novembro, 2012. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

A reparação tecidual consiste em uma importante característica de prevenção do processo inflamatório; alguns fatores podem reduzir, retardar ou impedir este processo. Existe um interesse constante em relação ao uso de correntes de baixa intensidade aliado da suplementação com nutracêuticos (alta relação $\omega 9:\omega 6$ e baixa relação $\omega 6:\omega 3$). O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do pré-condicionamento com misturas de óleos contendo $\omega 3/\omega 6$ e $\omega 9/\omega 6$ e correntes de baixa intensidade MENS (*Microcurrent Elétric Neuromuscular Stimulation*) sobre a reparação tecidual após incisões em pele de ratos. Foram utilizados 108 ratos Wistar, distribuídos em 3 grupos: G-1 controle (soro fisiológico) $n=36$ subdivididos em dois subgrupos: não estimulado e estimulado; G-2 controle neutro (óleo de milho e soja) $n=36$, subdivididos em dois subgrupos: não estimulado e estimulado e G-3 ALA (óleo de oliva+linhaça+cânola), $n=36$ subdivididos em dois subgrupos: não estimulado e estimulado. As misturas de óleos foram administradas por via orogástrica, e a aplicação da corrente elétrica, ocorreram 1 hora antes da incisão cirúrgica. Os animais foram sacrificados no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia. Amostra de pele de 1cm/1cm foram coletadas entre o segundo e terceiro ponto da sutura. As amostras foram analisadas a partir de lâminas histopatológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE) e forneceram a análise geral dos cortes de tecido com espessura de $5\mu m$. Os dados obtidos pela técnica de (HE) foram classificados de acordo com a intensidade inflamatória e transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de índice para os achados histológicos segundo (VIDINSK, 2006). Os dados estatísticos foram analisados utilizando-se o programa graphpad prisma for Windows, versão 6,0 para avaliação conjunta dos efeitos dos grupos G-1, G-2 e G-3, e dos subgrupos não estimulado e estimulado, e dos dias (7°, 14° e 21°). As variáveis da avaliação histológica foram analisadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney e pós-teste de Dunn. O nível de significância foi de 5% ($p<0,05$). Os resultados obtidos mostram que a eletroestimulação pré-condicionante promoveu elevação do exsudato e redução da reepitelização no 7° dia. O uso dos pré-condicionantes óleo 1 (milho e soja) e 2 (oliva+canôla+linhaça) reduziram a vascularização no 7° e 14° dias respectivamente. Ambos os grupos dos óleos 1 e 2 induziram a redução da fibrose no 14° dia. O précondicionamento com óleo 1 levou a elevação da expressão do NFkB no 7° dia. Conclui-se que a eletroestimulação promoveu elevação de marcadores da fase inflamatória com consequente aceleração desse processo e o uso dos óleos 1 e 2 reduziram a fibrose e a vascularização na fase proliferativa. O précondicionamento com o óleo 1 (milho e soja) promoveu mais inflamação no 7° dia.

Descritores: Ácidos graxos poliinsaturados. Microcorrente. Reparo tecidual da pele.

ABSTRACT

Pré-conditioning with mono and polyunsaturated acids and electrical stimulation of low in rats tissue repair. MARIA DOS PRAZERES CARNEIRO CARDOSO, Postgraduate Sensu Sstrictu Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Ceará (Degree of Master in surgery). November 2012. Advisor: Prof.Dr.Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

The tissue repair consists in an important feature of the inflammatory process prevention, some factors may reduce, delay or prevent this process. There is a continued interest in the use of currents with low intensity combined by supplementation with nutraceuticals (high ratio w9:w6 and low ratio w6:w3). The objective of this work was to evaluate the effects of preconditioning with oil blends containing (w3/w6) and (w9/w6), and currents of low intensity MENS on the tissue repair after incisions in mice skin. One hundred and eight (108) Wistar rats were used, divided into three groups: G-1 control (saline) n = 36 subdivided into two subgroups: unstimulated and stimulated; G-2 neutral control (corn and soybean oil) n= 36, subdivided into two subgroups: unstimulated and stimulated and G-3 ALA (olive oil + flaxseed + canola), n= 36 subdivided into two subgroups unstimulated and stimulated. The oil mixtures were administered by orogastric, and the application of electric current directly into mouse skin occurred 1 hour before surgical incision. The animals were sacrificed on the seventh, fourteenth and twenty-first day. Skin sample of 1cm/1 cm were collected between the second and third suture point. The samples were analyzed from surgical specimens stained with hematoxylin-eosin (HE) and provided a general analysis of tissue sections with a thickness of 5 *um*. The data obtained by the (HE) technique were classified according to the inflammatory intensity and transformed into quantitative variables by assigning index for the histological finding according to (VIDINSK, 2006). Statistical data were analysed using the GraphPad Prism for Windows, version 6.0, for joint assessment of the effects of the groups G-1, G-2 e G-3, and the subgroups unstimulated and stimulated, and days (7, 14, 21). The variables of histological evaluation were analysed by nonparametric Mann-Whitney. The significance level was 5 % (p<0,05). The results show that the preconditioning electrical stimulation caused the elevation of exudate and reduced the reepitheliazation on the 7th day. The use of preconditons oil 1 (corn and soybeans) and oil 2 (olive+ canola + flaxseed) reduced the vascularization on the 7th and 14th days respectively. Both groups, 1 and 2 of oils, induced the reduction of fibrosis on the 14th day. The preconditioning with oil 1 led to elevated expression of NFkB on the 7th day. It is concluded that the electrical stimulation caused the elevation of markers of inflammatory phase with consequent acceleration of this process and the use of oils 1 and 2 reduced the fibrosis and vascularization on proliferative phase. The preconditioning with the oil 1 (corn and soybeans) caused more inflammation on the 7th day.

Descriptors: Polyunsaturated fatty acids. Microcurrent. Skin tissue repair.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA. 1	Estrutura química de moléculas de ácido graxo	27
FIGURA. 2	Estrutura química e nomenclatura dos ácidos graxos com 18 carbonos	28
FIGURA. 3	Competição pelas vias de lipoxigenáse por ácido eicosanpentanóico para síntese de eicosanóides da série impar e da série par	29
FIGURA. 4	Imagem (a)aparelho de microcorrente (b) osciloscópio (c) visualização do sinal elétrico no osciloscópio.	37
FIGURA. 5	Fluxograma mostrando a divisão dos grupos tratados: água, óleo de milho e soja e ALA	38
FIGURA. 6	Composição com respectiva fonte de ω 3, ω 6 e ω 9	38
FIGURA. 7	(a) tricotomia com aparelho elétrico (b) marcação do campo cirúrgico (c) gavagem com óleo e água (d) incisão cirúrgica aberta	40
FIGURA. 8	(a) marcação da amostra, (b) retirada da amostra (c) fragmento (d) medição da amostra	41
FIGURA. 9	Dados representativos do grupo I (sham e estimulado)	43
FIGURA. 10	Dados representativos do grupo II (sham e estimulado)	46
FIGURA. 11	Dados representativos do grupo III (sham e estimulado)	49
FIGURA. 12	Dados representativos dos Óleos para exsudato	50
FIGURA. 13	Dados representativos dos Óleos para reepitalização	52
FIGURA. 14	Dados representativos dos Óleos para fibrose	54
FIGURA. 15	Dados representativos dos Óleos para vascularização	55
FIGURA. 16	Dados representativos da análise imunohistoquímica	57
FIGURA. 17	Foto digitalizada das lâminas histológicas	58
FIGURA. 18	Foto digitalizada da Imunomarcação para NFkB	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	DADOS ESTATÍSTICOS COM VALORES DAS MEDIANAS DO GRUPO 1 TRATADO COM ÁGUA E MENS	41
TABELA 02	DADOS ESTATÍSTICOS COM VALORES DAS MEDIANAS DO GRUPO 2 TRATADO ÓLEO DE MILHO E SOJA E MENS	43
TABELA 03	DADOS ESTATÍSTICOS COM VALORES DAS MEDIANAS DO GRUPO 3 TRATADO COM CANÔLA, LINHAÇA E OLIVA	45
TABELA 04	DADOS ESTATÍSTICOS COM VALORES DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DOS ÓLEOS EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE	49
TABELA 05	DADOS ESTATÍSTICOS COM VALORES DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DOS ÓLEOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE	51
TABELA 06	DADOS ESTATÍSTICOS IMUNOHISTOQUÍMICA	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI	ácido graxos poliinsaturados
AL	ácido linoleico
ALA	ácido alfa-linolênico
AO	ácido oleico
ATP	adenosina trifosfato
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DHA	ácido docosahexaenólico
EPA	ácido eicosapentanóico
HSP	proteínas de choque térmico
HSP27	proteínas de choque 27
HE	hematoxilina eosina
KDa	Quilo Dalton
Kg	kilograma
LT	leucotrienos
MENS	microcurrent electrical neuromuscular stimulation
mV	milivolt
mm	milímetros
mg	miligrama
mA	miliâmpere
NFkB	fator nuclear kappa-B
ON	óxido nítrico
ω 3	ômega 3
ω 6	ômega 6
ω 9	ômega 9
Δ	delta

α	alfa
β	beta
FGF	fator de crescimento dos fibroblastos
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
TGF	Fator transformador de crescimento
Hz	hertz
μA	microampére
DOU	diário oficial da união
g	grama
SHAM	grupo não estimulado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Processo de cicatrização.....	17
1.2 Estágio Inflamatório.....	17
1.3 Estágio Proliferativo.....	19
1.3.1. NFkB	21
1.3.2 HSP-27.....	21
1.3.3 Nitrotirosina.....	22
1.4 Estágio Reparador.....	23
1.4.1 Definição de pré-condicionamento.....	23
2. Ácidos Graxos.....	24
2.1. Classificação e Nomenclatura.....	25
2.2. Ácidos Graxos e Inflamação.....	27
2.3. Ácidos Graxos e Estresse Oxidativo.....	28
3. Terapia com Microcorrentes.....	29
3.1. Corrente de baixa frequência.....	29
3.2. Ação da Adenosina Trifosfato na terapia de Microcorrentes.....	30
3.3. Estimulação elétrica por microcorrentes na cicatrização.....	32
OBJETIVOS.....	35
4.1. Objetivo Geral.....	35
MATERIAL E MÉTODO.....	36
5.1. Aspectos Éticos.....	36
5.2. Modelo Experimental.....	36
5.3. Equipamento.....	36
5.4. Delineamento do Experimento.....	37
5.4.1. Composição das misturas de óleos.....	38
5.4.2. Procedimento Cirúrgico.....	39
6. Análise Histopatológica.....	40

7. Análise Imunohistoquímica	42
8. Análise Estatística	42
RESULTADOS	43
9.1. Avaliação histológica dos grupos eletroestimulados	43
9.2. Avaliação histológica dos grupos tratados com óleos	50
9.3. Resultados da Imunohistoquímica com marcadores bioquímicos com óleos vegetais	56
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processo de Cicatrização da Pele

As feridas se definem como uma lesão que interrompem a estrutura anatômica ou função fisiológica do tecido, sendo classificadas de agudas ou crônicas (BORGES et al, 2000). Entendendo a fisiologia da reparação tecidual, mostram-se sinais que ativam a proliferação de linhagens celulares específicas como os granulócitos e macrófagos para a margem da ferida.

No processo da cicatrização de feridas, existe a participação de diversos fatores que interferem tanto na qualidade da cicatriz como no tempo do reparo e no aspecto final da pele após a finalização. A cicatrização é, portanto, um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa, a fim de garantir a restauração tissular (CONTRAN; KUM; ROBBINS, 2001).

Ao receber estímulos endógenos ou exógenos, o organismo vivo desenvolve uma resposta protetora que visará à eliminação do fator irritante, a curto ou longo prazo; a resposta inflamatória está intimamente ligada à reparação do dano causado pelo agente agressor e a eliminação do mesmo. (KUMAR et al,1994; BECKER,1997; SILVA,2006). A cicatrização envolve três estágios: inflamatório, proliferativo e remodelador (BALBINO, 2005).

1.2 Estágio Inflamatório

A inflamação aguda apresenta início brusco, intensidade máxima e evolução rápida, durando apenas alguns dias. Ao contrário desta, a inflamação crônica possui longa duração, intensidade moderada e início lento (SILVA, 2006).

Na inflamação aguda, encontram-se alterações no calibre vascular, variações no fluxo sanguíneo, alterações na estrutura da microvascularização, migração de leucócitos e acúmulos destes no local da lesão. A vasodilatação causa rubor no local agredido, enquanto o aumento do fluxo sanguíneo favorece o calor local.

Os leucócitos exibem nesta fase do processo inflamatório uma tendência de adesão ao endotélio vascular. Após quarenta e oito horas, o infiltrado inflamatório é predominantemente composto por monócitos, devido à curta vida dos neutrófilos. Os leucócitos exercem a fagocitose sobre os agentes agressores, promovendo a morte dos microorganismos, este processo origina a liberação de produtos para o meio extracelular, aumentando o efeito inflamatório inicial (KUMAR, 1994; BECKER, 1997; AIRES, 1999 e SILVA, 2006).

Nesta fase, vários mediadores inflamatórios são liberados pelos leucócitos como:

1.2.1.NF-kB

É um fator de transcrição nuclear (NF) que, quando ativado por agentes lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve das moléculas K dos linfócitos B (KB) (SEM, 1986).

O Nf-kb é conservado na evolução e com ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos; apresenta uma ação superior aos fatores de transcrição até então caracterizados. Independente do estímulo, pode haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e aumento de cálcio intracelular para ativação do Nf-kb (ref). Quando não estimulado, o Nf-kb encontra-se no citoplasma, ligado a uma proteína inibitória: o Ikb; esse complexo impede a translocação do NF-kB para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do Ikb são necessárias para que ocorra a translocação (SIEBENLIST, U; 1997).

O Nf-kb é altamente ativado nos processos inflamatórios e em diversas doenças e pode induzir a transcrição de citosinas pós-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, Cox-2 e óxido nítrico induzível (iNOS).

1.2.2. HSP (*Heat Shock Protein*)

A resposta ao choque térmico está entre os mecanismos de proteção adquiridos evolutivamente e é promovida pelas proteínas do choque térmico (HSP), que mantêm as suas estruturas íntegras sob tais condições, auxiliando na manutenção e formação correta de proteínas (INGLOLIA, 1980 e PELHAM, 1982).

Os agentes estressores envolvidos na alteração da expressão das HSPs foram estudados isoladamente e incluem temperaturas elevadas (LOCKE et al, 1990; SKIDMORE et al 1995), estresse e metabolismo (BECKMANN et al, 1992 e FEBBRAID e KOUKOLAS, 2000), hipóxia e isquemia (MESTRIL et al, 1994) e espécies reativas do oxigênio (ZOU et al, 1998).

Apesar da presença das HSPs ter sido interpretada como um sinal para a detecção de estresse fisiológico está estabelecido, que a indução é fundamental para o processo de reparo gerado frente a diferentes tipos de danos (SANTORO, 2000). A classificação das HSPs, está de acordo com seu peso molecular, que pode variar de 8 a 90 kDa (LIU et al, 1999).

A HSP-27, a proteína de choque de baixo peso molecular, interage com os ácidos graxos poliinsaturados. Essas proteínas possuem peso molecular entre 18 e 30kDa e são chamadas de pequenas HSPs (small HSP). Sua expressão constitutiva pode ser encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma e funcionalmente estão envolvidas com a prevenção da desnaturação das proteínas e proteção contra possíveis interações impróprias delas mesmas e na citoproteção frente à lesão e morte celular (TIMOTHY, 2002).

É expressa tanto em tecido muscular humano quanto de ratos, se localiza no citosol em condição normais e é translocada ao núcleo em condições de estresse, mostrando um aumento de expressão na ordem de 10 a 20 em relação à condição de repouso. As principais funções incluem a estabilização de microfilamentos e a transdução de sinal das citosinas (THOMPSON, 2002).

A HSP-27 interage com os filamentos de actina, facilitando a sobrevivência das células em cultura (LANDRY e HUOT, 1999), fazendo uma ligação entre HSP-27 e o

citoesqueleto da célula através do seu envolvimento com os filamentos de actina (OKAMOTO, 1999).

1.2. 3-NITROTIROSINA:

Muitas condições patológicas, incluindo inflamação e isquemia/reperfusão, podem induzir a produção simultânea de radical superóxido(O_2) e NO em diversos tecidos. O peróxido nítrico promove a nitração de resíduos alifáticos e aromáticos. Resíduos de tirosina nas proteínas constituem alvos-chaves da nitração, mediada por peroxinitrito, e a presença de 3-nitrotirosina em proteínas representa um marcador da formação endógena de peroxinitrito.

O processo de nitração envolve mecanismos radiculares, nos quais um elétron derivado do peroxinitrito ataca o anel aromático da tirosina, levando à formação de radical tirosil, que rapidamente se combina com dióxido de nitrogênio (NO_2) para formar 3-nitrotirosina (HUIE, R.E., et al, 1993). Peroxinitrito é um ânion que tem sido encontrado para causar um aumento da nitrotirosina; além disso, vários estudos estão associados ao dano inflamatório sob estresse oxidativo (SZABÓE, 2001). A formação de espécies reativas de oxigênio presume-se que desempenham um papel importante na morte neuronal e na presença de 3-Nery livre, é considerado um marcador bioquímico (OLMOS, A et al, 2007).

Por descarga adrenérgica, sinalizada por estímulos físicos (trauma) e químicos (fragmentos de células lesadas), uma sequência de eventos é disparada e o sangue coagulado diminuiu hemorragia. A coagulação é precipitada pela agregação de plaquetas, e posterior recrutamento de novas plaquetas, e liberação de uma cascata de enzimas, que convertem protombina em trombina, transformando o fibrinogênio em fibrina insolúvel. Este infiltrado forma um meio temporário que serve para cooptar as bordas das feridas e também para atração e movimentação dos fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos, responsáveis pelo processo de reparo (BALBINO; PEREIRA e CURI, 2005; CRUZ, 2008).

Muitas lesões de pele são curadas rápida e eficientemente com uma ou duas semanas. No entanto, o final do produto nem sempre é estético e perfeito funcionalmente. Apêndices epidérmicos que se perdem no local da lesão, não se regeneram, e quando a ferida se recompõe, há sobra de tecido conjuntivo (cicatricial); isso ocorre quando a matriz de

colágeno é pobremente reconstruída, em densos feixes paralelos. O objetivo da cicatrização biológica da ferida é que a parte externa da pele possa ser induzida para se reparar o mais perfeitamente possível. (MARTIN, 1997; CRUZ, 2008).

As alterações vasculares consistem de uma cascata de reações ativadas e controladas por uma infinidade de mediadores químicos. Estas substâncias são responsáveis por todos os aspectos da inflamação. A origem dessas substâncias são os tecidos que sofrem lesão, o processo de regeneração plaquetária e o plasma. Tais mediadores atuam na micro-circulação, provocando o aumento da permeabilidade vascular. Podem ser classificados em: mediadores de ação rápido-transitória e mediadores de ação prolongada (CONTRAM; KUMAR; COLLINS, 2001 e SILVA, 2008).

Os sinais inflamatórios são resultados da ativação de células nervosas, estromas, vasculares e circulatórias, cuja ativação é desencadeada por estímulos físicos químicos a partir das células ou fragmentos de tecidos lesados ou mediadores inflamatórios pré-formados ou neo-formados (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005 e SIMÕES, 2007).

Dentre as inúmeras funções dos macrófagos no processo inflamatório, destaca-se a de liberação de enzimas, que teriam um papel de degradar o tecido conjuntivo, limpando a área lesada, e a liberação de inúmeros mediadores químicos (lipídios, peptídeos, fatores de coagulação e fatores de crescimento). Os mediadores químicos produzidos pelos macrófagos são de fundamental importância para intensificar a migração e a ativação dos fibroblastos (BALBINO; PEREIRA; 2005 e SIMÕES, 2007).

1.3. Estágio Proliferativo

A fase de reparação depende de dois fatores importantes: angiogênese e fibroplasia e caracteriza-se pela migração e proliferação de fibroblastos, células endoteliais e pequenos vasos na área lesada, formando o tecido de granulação, produzem e organizam os principais componentes extracelulares. A migração e ativação do fibroblasto ocorrem por influência de mediadores químicos produzidos principalmente pelos macrófagos e plaquetas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005 e SILVA, 2006).

A reparação começa com uma reação inflamatória de intensidade variável, seguida por proliferação marcante de fibroblastos e células endoteliais. Este último fenômeno representa a formação de um tipo especializado de tecido denominado reação de granulação, que é indicador principal da instalação do processo de cicatrização (KUMAR, 2005 e SIMÕES, 2007).

Os fibroblastos surgem por volta do segundo ou terceiro dia após o trauma. O fibrinogênio do exsudato inflamatório se transforma em fibrina, formando uma rede, onde os fibroblastos ficam aderidos, se multiplicam e começam a secretar os componentes proteicos do tecido cicatricial ocorrendo intensa proliferação vascular.

O número de fibroblastos ativados desencadeia a síntese de mucopolissacarídeos e de fibras de colágeno. A proliferação dos fibroblastos depende da liberação de fatores de crescimento: (a) dos fibroblastos (FGF); (b) das plaquetas (PDGF), produzidas por macrófagos e (c) transformante beta (TGF), produzido por linfócitos e macrófagos. Ocorre também a síntese dos componentes da matriz extracelular.

Os fibroblastos proliferam, deslocam-se e iniciam o depósito de ácido hialurônico e colágeno do tipo III, formando uma matriz extracelular fluida, permitindo a migração de células e formação de ambiente propícia para a sobrevivência é conhecido como tecido de granulação (PEREIRA, 2004).

O miofibroblasto é uma célula que está presente no tecido de granulação e confere capacidade contrátil, reduzindo a área de lesão e facilitando a epitelização (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Na sequência, o depósito de colágeno aumenta progressivamente até que, no 14º dia após a lesão, atinge o seu pico. Em paralelo, ocorre a redução de ácido hialurônico e o predomínio de colágeno tipo I (CONTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2001 e GIRARDI, 2005).

As alterações vasculares consistem de uma cascata de reações ativadas e controladas por uma infinidade de mediadores químicos. Estas substâncias são responsáveis por todos os aspectos da inflamação. A origem dessas substâncias são tecidos que sofrem lesão, o processo de regeneração plaquetária e o plasma. Tais mediadores atuam na microcirculação, provocando o aumento da permeabilidade vascular. Podem ser classificados em: mediadores de ação rápida transitória e mediadores de ação prolongada (CONTRAM; KUMAR; COLLINS, 2001 e SILVA, 2008).

Os sinais inflamatórios são resultados da ativação de células nervosas, estromas, vasculares e circulatórias, cuja ativação é desencadeada por estímulos físicos químicos a partir das células ou fragmentos de tecidos lesados ou mediadores inflamatórios pré-formados ou neo-formados (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005 e SIMÕES, 2007).

Dentre as inúmeras funções dos macrófagos no processo inflamatório, destaca-se a liberação de enzimas, que teriam um papel de degradar o tecido conjuntivo, limpando a área lesada, e a liberação de inúmeros mediadores químicos (lipídios, peptídeos, fatores de coagulação e fatores de crescimento). Os mediadores químicos produzidos pelos macrófagos são de fundamental importância para intensificar a migração e a ativação dos fibroblastos (BALBINO; PEREIRA, 2005 e SIMÕES, 2007).

1.4. Estágio Reparador

A formação do epitélio é outro fenômeno que ocorre na fase de formação tecidual, sendo que ela acontece pelo aumento de tamanho, da divisão e da migração das células da camada basal da epiderme por sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente. Nas feridas com perda total da derme, a epitelização se faz apenas de suas margens, pois, neste caso, não há anexos cutâneos remanescentes (BLANES, 2004).

Um processo de regeneração adequado parece estar relacionado com o equilíbrio entre a estimulação e a inibição do colágeno. O metabolismo do colágeno pode ser afetado por citocinas como a TGF- β , IL-1 e TNF, sendo que a inibição destas substâncias é dada pelas citocinas do tipo IFN (α, β, γ), TNF- α e PGE (KITCHEN, 2003).

Nas feridas, os tipos e quantidades de colágeno são modificados dependendo do estágio do processo de reparo. O colágeno tipo III (embrionário) vai sendo gradualmente absorvido e substituído por colágeno tipo I, que é do tipo fibrilar maduro. O do tipo IV normalmente é produzido como parte da membrana basal quando a pele é lesada e o colágeno do tipo V é depositado em torno da célula como suporte estrutural (ROCHA, 2004).

Os fibroblastos também sintetizam fibronectina, agente químico que desempenha papel facilitador da atração de fibroblastos e células endoteliais e o aumento da ligação de fibroblastos na fibrina. Com o número aumentado de fibroblastos e conseqüente aumento de

fibras de colágeno e de elastina, a matriz extracelular começa a ser substituída por tecido conjuntivo mais forte e elástico, dando-se, assim, a completa reparação tecidual (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

1.4.1. Definição de Pré-condicionamento

Como conceito geral, ocorre quando é intencionalmente exposto a um estímulo, seja este nocivo ou não, a fim de que possa alcançar tolerância ou proteção contra uma situação adversa (GARCIA et al, 2010; Moritz et al, 2008). É obtido por meio de administração de baixas doses de um agonista, diminuindo, assim, um dano subsequente causado pela hiperativação desses receptores.~

Alguns estudos informam sobre o condicionamento que não seja o isquêmico, discorrem sobre os efeitos da natação e o uso da suplementação dietética com ácidos graxos ω -3 em ratos wistar (Moritz et al,2008). Já McGuinness(2006) observou que o uso de ácidos graxos ω -3 reduziu a dimensão do infarto do miocárdio em um modelo de oclusão da artéria coronária esquerda por um período de 30 minutos, seguido de reperfusão por 3 horas em coelhos. Entretanto não encontramos na literatura, trabalhos que utilizem explicitamente, o conceito de pré-condicionamento nutricional.

2. Ácidos Graxos

Os ácidos graxos atuam como parceiros estruturais de todas as células e são de extrema importância para o metabolismo celular, principalmente os que são considerados essenciais. Desde a sua descoberta, novos papéis são identificados até a sua atuação no metabolismo basal e na manutenção da saúde e do bem estar (BNF, 1992; GOMES, 2008).

Nos últimos anos, estudos revelam a importância dos lipídios derivados de peixes na alimentação humana por serem fontes ricas em ácidos graxos poliinsaturados. Pesquisas indicam que os ácidos graxos pertencentes à família AGI – ω 3, particularmente o ácido eicosapentaenoico (EPA), interferem na produção de prostaglandinas antitrombóticas, e o

ácido doicosaexóico (DHA) é o maior constituinte da porção fosfolipídica das células receptoras.

A primeira indicação que as gorduras animais podem ser essenciais para o crescimento saudável foi proposta por Aron em 1918, que propôs que essa classe de ácidos graxos exerce contribuição para o desenvolvimento dos animais e possivelmente dos seres humanos. Os ácidos (EPAs) foram considerados de importância necessária ao ser humano até os anos 60, quando os sinais de deficiência clínica se tornam aparentes nas crianças.

A evidência para o efeito terapêutico dos ácidos graxos (ômega- ω 3) é que sejam eficazes quando adicionados na dieta e na prevenção de ocorrência da doença cardíaca coronária (Ricardo U. Alfonso V., 2000).

Em humanos, os ácidos linoleico (18:2n-6, AL) e alfa-linolenico (18:3n-3, AAL) são necessários para manter as membranas celulares, as funções cerebrais, a transmissão de impulsos nervosos sob condições normais e participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominado de essenciais. (MARTIN, ALMEIDA, RUIZ, 2006).

Os ácidos graxos essenciais podem determinar alterações estruturais e funcionais da membrana fosfolipídica, inclusive de células do sistema imune, modificando sua estabilidade, permeabilidade, atividade de receptores e enzimas, o transporte, funções regulatórias e o metabolismo celular (DOLINSK, 2009).

2.1. Classificação e Nomenclatura:

Os ácidos graxos se classificam de acordo com o número de carbonos, ligações duplas e posição da ligação dupla na cadeia. A descrição para a localização das duplas ligações se dá pela letra delta (Δ), a alfa (α) refere-se ao carbono ligado ao grupo carboxila e a beta (β) ao segundo carbono e ômega (ω) ao último carbono, o aumento da cadeia carbônica e a inserção de novas duplas ligações geram ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. (SABARENSE e KAMIL, 2009).

Os ácidos graxos são geralmente representados por símbolos numéricos, tais como o ácido oleico, C18: 1(9), e o ácido linoleico, C18: 2 (9,12), em que o número

justaposto ao símbolo C indica o número de átomos de carbono e o segundo número indica a quantidade de duplas ligações. Podem ser divididos em saturados e insaturados. A conversão dos ácidos essenciais em derivados poliinsaturados de cadeia longa ocorre por reações enzimáticas envolvendo alongamento e dessaturação de cadeia carbônica.

Existem três famílias de ácidos graxos insaturados (AGPI): ômega 3 α -linolênico (ω -3), ômega 6 linoleico (ω -6) e ômega 9 oleico (ω -9), sendo que o termo ômega refere-se à posição da dupla ligação do ácido graxo a partir do terminal metila, denominado cadeia dos hidrocarbonetos. Nomenclatura e exemplificação dos ácidos graxos de 18 carbonos, AG saturados como ácido esteárico, monoinsaturado como ácido oleico e poliinsaturados, ácido linoleico e α -linolênico, são apresentados na FIG 2 (CALDER, 2008).

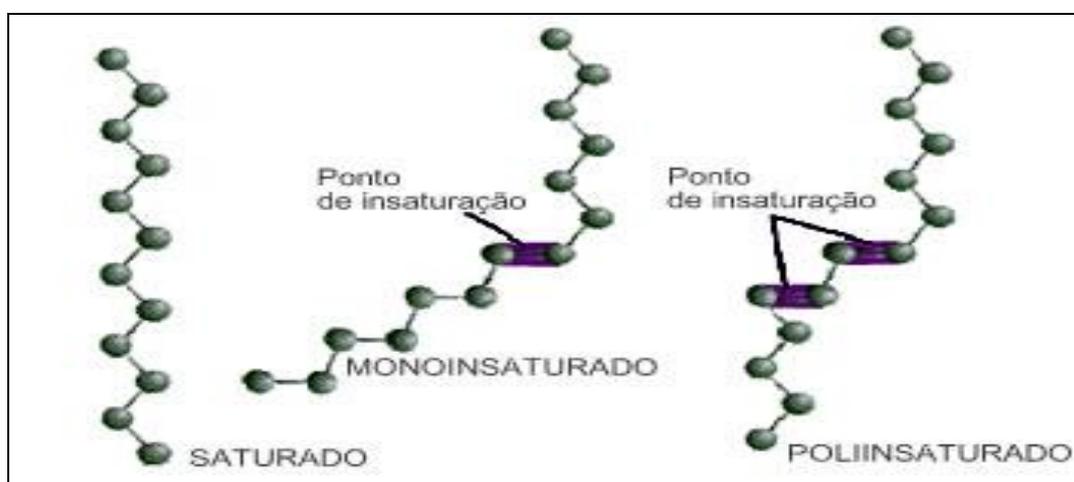


FIG 2: Estrutura química de moléculas de ácido graxo

O ácido graxo α -linolênico (ALA; 18:3 n-3) é precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3), docosapentanóico (DPA; 22:5 n-3) e do docosaexaenoico (DHA; 22:6 n-3) e o ácido linoleico (AL; 18:2 n-6) é precursor do ácido araquidônico (AA; 20:4 n-6). O ALA e AL possuem alguns efeitos opostos sobre vasodilatação, perfil lipídico e são considerados essenciais para a dieta humana, pois não podem ser sintetizados e interconvertidos pelo organismo humano (CALDER, 2001 e 2008, CRUZ, 2007).

O Ácido linoleico é encontrado em quantidades significantes em diversos óleos vegetais, como o de milho e soja, e seus derivados, como margarinas. O ALA está presente em vegetais de folhas verdes escuras e em alguns óleos vegetais, como o de linhaça. Os dois juntos contribuem com 95 a 98% dos AGPI na dieta de países ocidentais (SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008). O ácido araquidônico, derivado do ácido linoleico, é encontrado

nas carnes e vísceras e a ingestão estimada é de 50 a 500mg/dia. Já os derivados do ácido linolênico, o EPA, DHA DPA, estão presentes nos peixes, principalmente os mais gordurosos como tuna, salmão, sardinha e carapau e também nos vegetais de folhas escuras (CALDER, 2008).

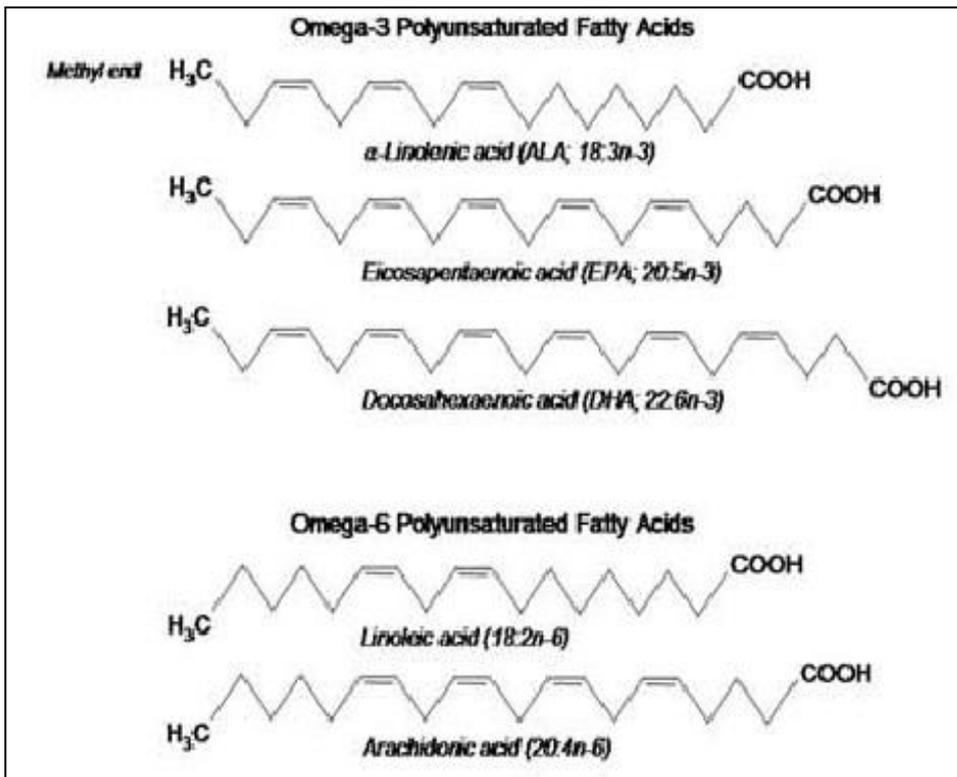


FIG 3: Estrutura química e nomenclatura dos graxos com 18 carbonos

2.2. Ácidos Graxos e Inflamação:

Ácidos graxos essenciais incorporados na membrana celular são capazes de sintetizar mediadores inflamatórios lipossolúveis denominados eicosanoides. Existem duas vias de síntese de eicosanoides: cicloxigenase e lipoxigenase, que produzem prostanoídes, que são os troboxanos (TX) e as prostaglandinas (PG), e leucotrienos (LT) e lipoxinas (CALDER, 2000 e PINHEIRO, 2011). Os eicosanoides modulam a resposta inflamatória de forma diferenciada. Os eicosanoides oriundos do metabolismo de AGPIs tipo ω -6 são potentes mediadores inflamatórios, mas aqueles da série ímpar, oriundos do metabolismo de AGPIs ω -3, resultam em resposta inflamatória atenuada, como mostra a figura. Esses relatos apontam

uma capacidade de ácidos graxos ω -3 em inibir a resposta inflamatória aguda, induzida ou agravada por eicosanoides derivados do metabolismo de ácidos graxos ω -6 (CRUZ, 2007 e PINHEIRO, 2011).

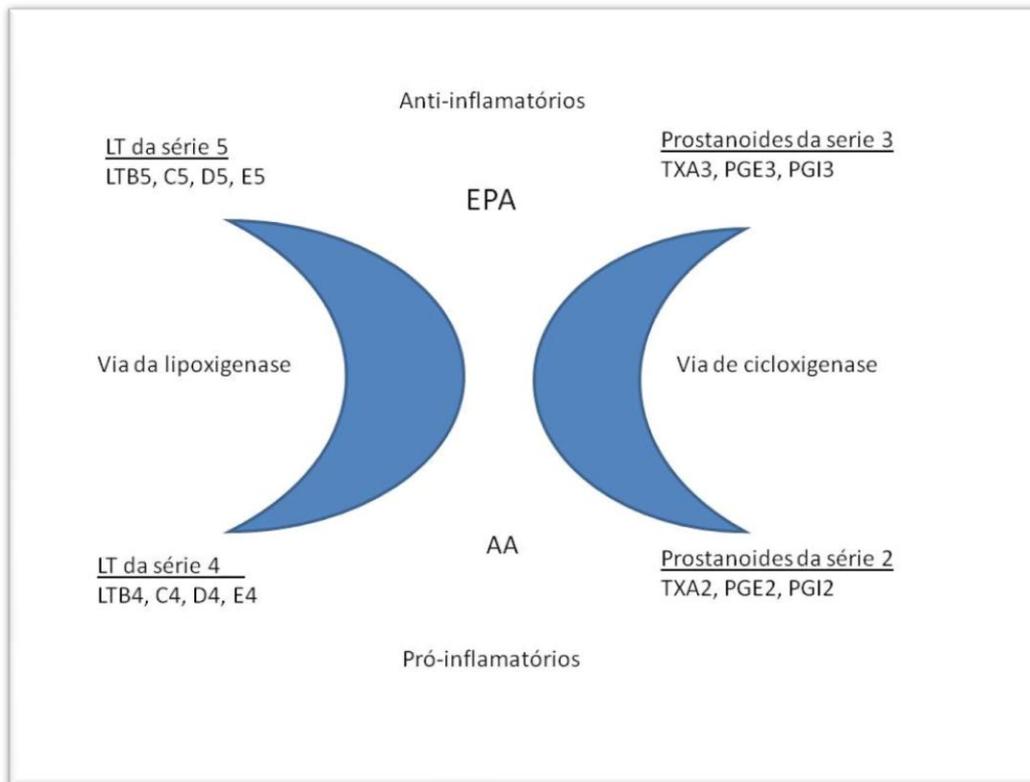


FIG 4 – Competição pelas vias de lipoxigenase e cicloxigenase por ácido eicosapentanóico (ômega-6) para síntese de eicosanoides da serie impar e da série par, respectivamente.

A inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias por ácidos graxos ω -3 parece estar associada, com sua participação, na ativação de receptores nucleares que antagonizam vias de sinalização do fator de transcrição nuclear Kapa B (NF κ B). Este fator nuclear é responsável pela transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória que incluem citocinas, moléculas de adesão e outros mediadores pró-inflamatórios (CALDER, 2003 e PINHEIRO, 2011). Estudos mais recentes evidenciaram que ω -9 AO também exibe ação anti-inflamatória através da inibição de prostaglandina E2 e bloqueio de NF κ B (OH et al, 2009 e PINHEIRO, 2011).

2.3 Ácidos graxos e Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é resultado de defesas antioxidantes ou aumento na produção de espécies ativas, pela exposição a valores excessivos de O₂ ou de agentes intoxicantes (HALLINWEL, 1999; SIES, 1993). Há ocorrência de um estresse oxidativo das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996 e BIANCHI, 1999).

Os mecanismos de proteção utilizados pelo organismo incluem os antioxidantes não enzimáticos, como a glutatona, vitamina E, vitamina C, β-caroteno, N-acetilcisteína, proteínas de ligação do heme, e EPA/DHA. Os sistemas enzimáticos endógenos removedores de resíduos incluem superóxido dismutase (SOD) catalase e glutatona peroxidase, associados ao selênio, zinco, manganês e ferro (HEYLAND; DHALIWAL; DAY, 2006 e PINHEIRO, 2011).

Recentemente, foi descrito que o DNA é precursor de mediador denominado neuroprotectina D1(NPD1), a partir de sua lipoxigenação e ulterior hidrólise a síntese de NPD1 é induzida como resposta ao estresse oxidativo (NIEMOLLER; BAZAN, 2010; PINHEIRO, 2011).

Estudos recentes mostram que a combinação de oxidantes varia, quanto à dose, a via de administração, os níveis a serem idealmente atingidos, o melhor momento e a duração de seu aporte no organismo. Ainda não existe consenso quanto à relação dessas variáveis, mas já se sabe que os antioxidantes administrados não fazem efeito algum depois de já terem ocorrido danos teciduais. Assim o tratamento deve ser instituído antes da recuperação da lesão oxidativa (MARTINDALE; ZHOU, 2009).

3. Precondicionamento com Microcorrentes

3.1. Corrente de baixa frequência:

A estimulação elétrica neuromuscular; (microcurrent electrical neuromuscular stimulators -MENS) é utilizada para obter efeitos diversos, como fortalecimento e reeducação

do músculo, redução do edema, alívio da dor e reparo de feridas. Os estimuladores neuromusculares produzem trens de pulsos elétricos que causam excitação dos nervos periféricos e subsequente do tecido muscular (Haltman et al, 1983).

Esses pulsos entram nos tecidos corporais através de eletrodos de superfície e, desse modo, a saída elétrica permanece constante, mesmo com alterações na resistência da pele ou na impedância causada por alterações na temperatura ou pelo suor, etc.

As microcorrentes produzem uma forma retangular de correntes com pulsos monofásicos que variam periodicamente sua polaridade (0,5 a 4hz). A amplitude ajustada produz variações entre 0 a 600 μ A., sendo esta intensidade muito baixa e com carga insuficiente para excitar as fibras nervosas periféricas.

As funções fisiológicas dos tecidos biológicos são intermediadas por correntes elétricas endógenas e possuem intensidades na faixa de microamperes, com isso, correntes elétricas exógenas teriam maiores efeitos se fossem realizadas com intensidades semelhantes às das correntes endógenas (CRUZ e BOVENT, 2009).

Existe uma voltagem transcutânea na pele humana conhecida como bateria da pele. O extrato córneo tem cargas negativas em relação à derme, com uma diferença de potencial médio de 23mV (FOLDS; BARKER, 1983 e SILVA, 2006).

Quando ocorre um ferimento na pele, produz uma diminuição da bioimpedância, que provoca um curto-circuito na bateria epidérmica, permitindo que a corrente se propague para o exterior da lesão. Acredita-se que esses potenciais sejam gerados na região basal da epiderme, e apresenta atividade metabólica e que uma incisão na pele faça com que íons carregados positivamente se movam. Esse efeito parece ser provocado pela atividade da bomba de sódio/potássio nas células da epiderme (ROBINSON; SNYDER-MACKLER, 2001).

Segundo Wood (1992), " a aplicação de microcorrentes não produz ativação de fibras nervosas sensoriais". A terapia por microcorrentes acelera a síntese proteica de ATP de 300 a 500% (CHENG, 1982; AGNES, J. 2005).

A estimulação de células vivas, por correntes elétricas de baixa intensidade (MENS), afeta diretamente os potenciais de membranas, que estão associados a mudanças no

gradiente de concentração de íons na membrana celular, que ocasionam o aumento da síntese de ATP, seguido da síntese de proteínas (CHENG, 1982 e SANTOS, 2004).

3.2 Ação da Adenosina Trisfosfato na terapia de microcorrentes

A aplicação elétrica ou campo eletromagnético em vários sistemas biológicos resultam na estimulação do crescimento e reparo do tecido. Potencial elétrico também estimula a regeneração de nervos danificados e estruturas musculares, acelerando a cura de feridas cirúrgicas (CHENG, et al,1982).

A energia que é acumulada é armazenada na mitocôndria, denominada “poços de energia”, definida como uma organela intracelular composta de várias membranas, sendo responsável por todas as reações do metabolismo aeróbico. Dentro desta estrutura intracelular, existe uma combinação de várias enzimas que transportam os íons de hidrogênios liberados pela degradação metabólica da glicose e gordura. Esses íons dão origem ao trifosfato de adenosina (ATP), a principal fonte de energia química celular (MITCHELL, 1976).

Durante a microestimulação, os eletrodos reagem com as moléculas de água (cátodo), para produzir íons hidroxilas (OH), enquanto que no lado do ânodo, prótons (H⁺) são formados. Assim, entre a interface do ânodo e cátodo, uma gradiente de prótons e uma gradiente de potencial através do tecido e o meio é criado. Em consequência disso os prótons, sob a influência do campo elétrico e com a diferença de concentração de íons, movem-se do ânodo para o cátodo. Ocorre um aumento do gradiente de prótons, formando cargas positivas na matriz; isso ocorre porque a membrana interna é impermeável aos prótons, estes só podem retornar ao interior da mitocôndria e desfazer o gradiente através de sítios específicos localizados na membrana interna, esses sítios são constituídos pelo complexo através da enzima que catalisa a conversão ADP em ATP. As enzimas oxidativas, através de uma série de reações sequenciais fazem o H se combinarem com o Oxigênio. No desenrolar destas reações, a energia liberada durante a combinação do hidrogênio com o oxigênio é usada para ativar a ATPase e dirigida à reação, de modo a produzir enormes quantidades de ATP a partir de ADP.

Podemos então dizer que o processo de síntese de ATP está ligado diretamente a um processo elétrico fisiológico. Esse processo é acelerado pela terapia com microcorrentes aumentando a formação desse gradiente de prótons, fornecendo à membrana externa íons

positivos e íons negativos para a membrana interna, aumentando a diferença elétrica entre as duas membranas, e assim gerando uma maior força próton, que leva a formação de ATP (MITCHELL, 1972; CHENG et al., 1982; MARZOCO, 1990; MERCOLA, 1995 e SILVA, 2006).

Tecidos lesionados são pobres em ATP, e diversos trabalhos demonstraram que microcorrentes reabastecem o ATP, fazendo com que nutrientes possam novamente fluir para o interior das células lesionadas e os resíduos dos produtos metabólicos possam fluir para o exterior destas células. O ATP também abastece de energia os tecidos, para que estes aumentem a síntese de proteínas e o transporte de íons através das membranas (CHENG et al, 1982 e SILVA, 2006).

3.3. Estimulação elétrica por microcorrentes na cicatrização

O uso da estimulação elétrica no tecido lesado tem como principal objetivo acelerar o processo de reparo cicatricial. Estudos clínicos mostraram que a eletroestimulação induz um aumento da concentração de ATP nos tecidos, aumento da síntese proteica, a migração de células epiteliais e fibroblastos para a região da lesão, a redução do edema e a inibição do crescimento de alguns patógenos (EVANGELISTA *et al*, 2003 e SIMÕES,2007).

A passagem de uma corrente elétrica no tecido não-excitável, tal como a epiderme e a derme, pode produzir efeitos térmicos e químicos, que são responsáveis por vários processos fisiológicos. Os efeitos térmicos (efeitos Joules) são devidos à alta resistência elétrica da pele. Esses efeitos, induzidos pelo uso de correntes contínuas (DC), podem danificar o tecido, dependendo da intensidade da corrente e duração da aplicação.

A migração direcional de íons pela aplicação de um campo elétrico, também chamada galnotaxia, é considerada como um dos mecanismos mais importantes envolvidos no reparo tecidual (SIMÕES, 2007).

Nishimura et al (1996) mostraram, num estudo *in vitro*, que a aplicação de um campo elétrico de 5mV/mm induz a migração dos queratinócitos, o que pode proporcionar uma aceleração do reparo tecidual.

A mobilidade sob campo elétrico do fibroblasto mostram diferenças importantes na regulação da migração do fibroblasto em matrizes do colágeno tridimensional (GRINEL et al, 2006). Enquanto que Godbout e Frenette (2006), em estudos realizados, *in vitro*, em um modelo de células de cultura de fibroblastos, afirmam que não houve migração das células usando diferentes intensidades do campo elétrico: 85, 120,165 e 215mV/mm. Os autores ressaltam que a corrente contínua não promove fechamento de feridas.

A terapia com microcorrentes é considerada catalisadora nos processos iniciais e de sustentação em numerosas reações químicas e elétricas que ocorrem no processo cicatricial (FRANCHINE et al, 2006).

A existência de correntes endógenas que, segundo OKUNO (1986), correspondem ao estímulo elétrico natural do corpo é na faixa de microampéres, e conseqüentemente a aplicação de microcorrentes seria compatível com as funções de hemostasia ou ativação celular (SMITH, 2002). Essas correntes exógenas possibilitam o restabelecimento da bioelétrica na região lesada da pele. A região lesada apresenta uma resistência elétrica mais baixa, em relação à pele intacta, o que facilita a passagem da corrente e os efeitos relacionados (SIMÕES, 2007)

Os primeiros estudos realizados com baixa intensidade, microcorrentes para o reparo tecidual, foram publicados por Assimacopoulos (1998), utilizando correntes contínuas em tratamento de úlceras de pé diabético.

Úlceras isquêmicas tratadas com microcorrentes, Gault e Gatens (1976), apresentaram melhora três vezes mais rápida que as não tratadas, sugerindo aumento do aporte sanguíneo.

Alvarez et al.(1983) estudaram os efeitos da corrente elétrica contínua na faixa de 50 a 300 μ A, na cicatrização da pele de porcos jovens. As diferentes camadas da pele foram estudadas separadamente. Os autores observaram uma diferença estatisticamente significativa na produção de colágeno no 5º, 6º e 7º dia de tratamento com a corrente contínua. A taxa de reepitalização apresentou-se mais alta no grupo tratado, sugerindo que a capacidade proliferativa e migratória das células epiteliais e do tecido conjuntivo, envolvido no reparo e regeneração, pode ser influenciada por campo elétrico externo.

Brow e Gogia (1987) estudaram o efeito da microcorrente na cicatrização de feridas em coelho. Aplicaram eletroestimulação com frequência de 80 Hz e intensidade de

2ma, durante duas horas por dia, em grupos diferentes. No grupo controle, foi aplicado o cátodo sobre a ferida, e os animais cicatrizaram após sete dias. Já no grupo experimental foi aplicado o ânodo sobre a ferida, resultando no fechamento da ferida mais acelerada, entre os quatro primeiros dias (BROW; GOGIA, 1987).

Dunn et al. (1988), em pesquisa utilizando porcos da Índia, observaram o efeito da corrente elétrica na matriz de colágeno, com eletrodos implantados no centro das feridas na derme. Aplicaram 50 μA com o cátodo sobre a ferida, obtendo aumento da migração de fibroblastos e o alinhamento de colágeno, enquanto que na região do ânodo colocado sobre a ferida verificou-se maior concentração de células inflamatórias (DUNN et al, 1988).

Weiss (1990), num artigo de revisão sobre a estimulação elétrica na cicatrização, ressaltou que a corrente exógena pode acelerar o processo de reparo tecidual (WEISS, 1990).

Em 1993, estudou-se a potencialização da bleomicina anti-tumoral associada à eletroterapia, onde aplicaram em ratas com fibrosarcoma AS-1 250 microgramas de bleomicina relacionado com 600 μA de correntes contínuas por 60 minutos. O efeito antitumoral do simples tratamento com bleomicina era moderado, mas significativo com eletroterapia. Tratamento combinado com bleomicina seguido de eletroterapia era mais eficaz, sobre a diminuição do tumor, que cada tratamento independente (SESA et al, 1993).

Wood *et al.* (1994) realizaram um estudo em diferentes estágios das úlceras, tratadas com corrente pulsada em baixa intensidade, de 300 μA a 600 μA , e mostraram a ocorrência de um fluxo rápido de cálcio na epiderme, o que provoca o crescimento de fibroblastos e queratinócitos, e conseqüentemente uma diminuição do tempo de fechamento das úlceras.

Segundo Hampton e King (2005) a estimulação bioelétrica não pode contribuir para o reparo de úlceras, sendo os níveis de corrente elétrica insuficientes para alcançar o interior da ferida.

Tendo em vista o crescente interesse no papel dos nutracêuticos em diversas condições patológicas e nos processos inflamatórios e a busca por condicionamentos, tais como a eletroestimulação, faz-se necessário um estudo mais apurado no intuito de estabelecer as devidas correlações entre essas terapias e os desfechos dela advindos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo

Avaliar o efeito preconditionante de ácidos graxos mono e poliinsaturados e da estimulação elétrica com correntes constantes de baixa intensidade no reparo tecidual, em ratos.

5. MÉTODO

5.1. Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética, em pesquisa em animais com protocolo de nº 105/09 na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Foram utilizados animais do biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX). As condições, desde o alojamento, alimentação, até o bem estar geral dos animais, foram controladas segundo a normatização vigente.

5.2. Modelo Experimental

Neste estudo, foram utilizados ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*). Foram selecionados com massa corpórea entre 270 a 350g e foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Observou-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (Guabi Nutrilabor®, Mogiana Alimentos, São Paulo) foram ofertadas *ad libitum* até 12 horas antes do experimento. A higienização das gaiolas e o avaliação dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável e pelo pesquisador, respectivamente. Os ratos foram previamente aclimatados em um período de sete dias antes da realização do experimento. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo pesquisador com auxílio de dois alunos da iniciação científica em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará no período de março de 2011 a janeiro de 2012.

5.3. Equipamento

Para realização desse estudo, foi utilizado o aparelho Stimulus Face de microcorrentes® (HTM-Indústria de Equipamentos Eletro-Eletrônicos LTDA), apresentando cabo de aplicação para correntes polarizadas, com disposição das conexões tipo jacaré dos

cabos de aplicação, conectando a caneta aplicadora com dois eletrodos ativos, com amplificador de saída de corrente contínua e pulsada, dois canais de saídas independentes com frequência $0,95\text{mA} \pm 10\%$ e inversão de polaridade a cada 2,5 segundos.

A frequência e o tempo utilizados foram descrito por SANTOS *et al* (2005), com intensidade máxima de 0,5 hz e duração de 20 minutos. O equipamento foi submetido à inspeção e validação com o osciloscópio no laboratório do departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, fig.4, com protocolo descrito por Praça (2004),(Apêndice B).

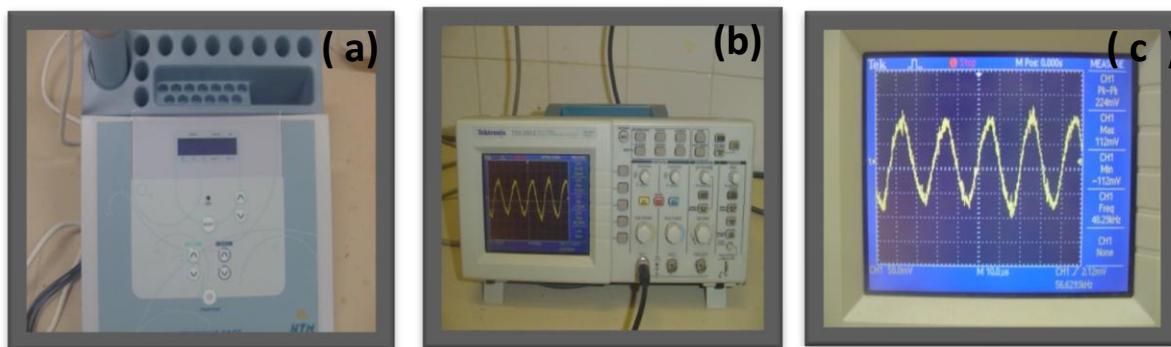


Fig 4: Imagem (a) Aparelho de microcorrente; (b) osciloscópio; (c) da visualização do sinal elétrico no osciloscópio.

5.4. Delineamento Experimental:

Foram utilizados cento e oito animais, distribuídos nos seguintes grupos:

1. Grupo G1 - Controle

Grupo tratado com solução salina a 9% com dose única de 0,01 ml/g, por via orogástrica constituído de 36 animais, subdivididos em 2 subgrupos de 18 animais, submetidos e não submetidos à eletroestimulação.

2. Grupo G2 - Controle neutro (óleo de milho e soja)

Grupo tratado com óleo de milho e soja (ω -6 e ω -9) com dose única de 0,01 ml/g, por via orogástrica constituído de 36 animais, subdivididos em 2 subgrupos de 18 animais, submetidos e não submetidos à eletroestimulação.

3. Grupo G3 - ALA (ácido linolênico)

Grupo tratado com mistura de óleo de oliva, cânola e linhaça (ω -3, ω -6 e ω -9) na dose única de 1,2 ml/g de peso/dia, por via orogástrica constituído de 36 animais, subdivididos em 2 subgrupos de 18 animais, submetidos e não submetidos à eletroestimulação.

A eutanásia de todos os animais foi realizada no 7º, 14º e 21º dia do experimento por hiperdosagem anestésica 500/kg de ketamina + 250/kg de Xilasina de acordo com o COBEA. A figura 5 mostra o fluxograma do delineamento do estudo, e a figura 6 mostra a composição das misturas de óleos com seus respectivos ácidos graxos poliinsaturados.

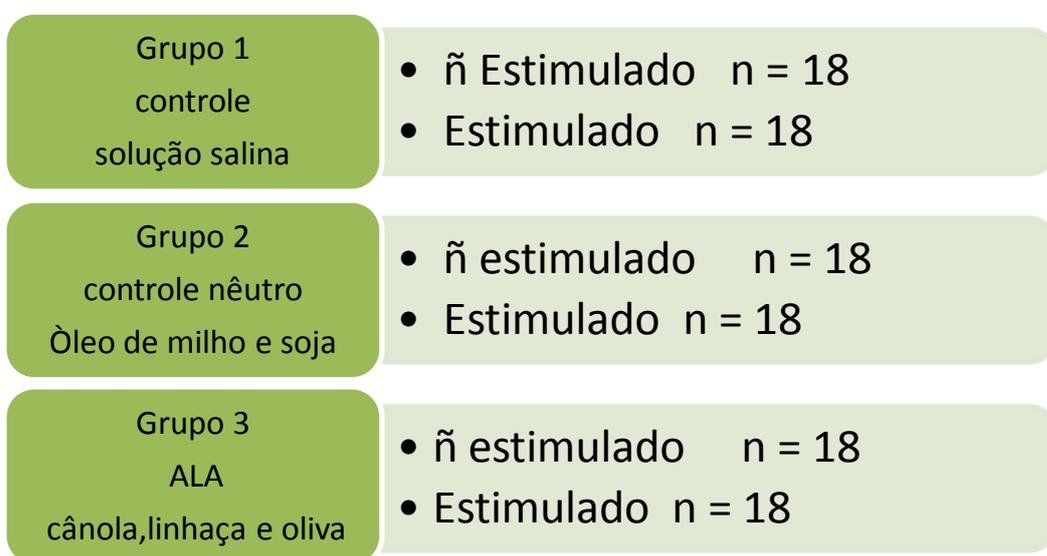


Fig 5: fluxograma mostrando a divisão dos grupos tratados: água, óleo de milho e soja e ala

GRUPOS	COMPOSIÇÃO	FONTE ω 3
G-1 controle (-)	Solução salina a 9%	
G-2 controle neutro	Óleo de milho e Soja	67,6 mg/ ml- ω 6: ω 3 8:1 ALA ω 9: ω 6 0,4:1
G-3 ALA	Oliva + Cânola+Linhaça	116,7 mg/ ml - ω 6: ω 3 1,4: 1 ALA ω 9: ω 6 3,4: 1

FIG 6: Composição com respectiva fonte de ω 3,(PINHEIRO,2011)

5.4.1. Procedimento Cirúrgico

Foi realizada a pesagem dos animais e administração de anestésicos com associação de cloridrato de cetamina (Dopolen®, Agribands Brasil Ltda) a 10% na dose de 90 mg/Kg e de cloridrato de xilasina (Rompun®, Bayer Animal Health) a 2% na dose de 10 mg/Kg por via intraperitoneal.

Após anestésiar o animal e ocorrer diminuição dos reflexos, foi realizada depilação na região dorsal, com aparelho elétrico, seguindo-se de antissepsia com povidine-iodine sendo que o animal foi posicionado em decúbito ventral sobre superfície plana.

A área de demarcação foi de dez cm de comprimento e quatro cm de largura, com caneta hidrográfica, para ambos os subgrupos controle e estimulado descrito por (BORBA, 2009).

A delimitação da incisão foi de seis centímetros, padronizados a uma distância de 1,5cm realizada no sentido crânio-caudal, longitudinalmente descrita por Borba (2009), na linha média a dorsal, com bisturi e com lâmina nº 23 estéril. A incisão inclui pele e panículo carnoso até a fascia muscular superficial. O ponto inicial da incisão teve como limite superior a linha transversa no nível dos ângulos inferiores das escapulas ilustrado na fig. 7.

O fio utilizado na sutura em pontos separados foi de nylon monofilamentar 4-0. Após o 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório, os animais foram anestesiados para retirada da amostra de pele com bisturi e removida da área cicatricial com o auxílio de pinça e tesoura, retirando entre o segundo e terceiro ponto como ilustrado na fig. 8. As amostras foram colocadas em formaldeído tamponado a 10% até o preparo das lâminas.

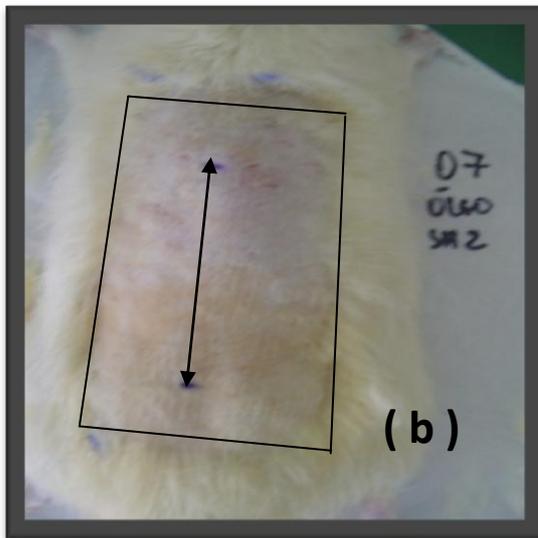
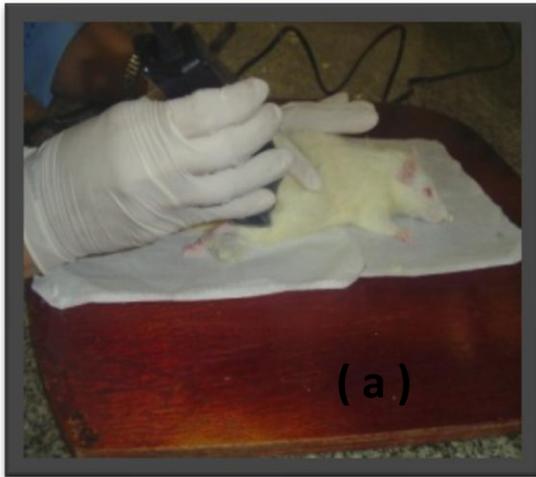


Fig 7:Imagem (a) tricotomia com aparelho elétrico; (b) marcação do campo cirúrgico;(c) gavagem com óleos e solução salina; (d) incisão cirúrgica aberta.

6. Análise Histopatológica

A confecção dos blocos de parafina com a inclusão das amostras de fragmentos de pele 1cm/1cm, para as lâminas histológicas. A análise dos cortes histológicos foi realizada pelo mesmo patologista sem conhecimento prévio da identificação dos grupos. Os dados obtidos pela técnica de HE foram classificados de acordo com a intensidade em que foram encontrados e transformados em variáveis quantitativas e sendo atribuído um índice para o achado histológico exsudato (intensidade normal=0,leve=1,moderado=2 e intenso=3) tipo (polimorfonucleares, mononucleares e misto), reepitelização (ausência = 0, parcial = 1, total = 2) fibrose (ausência = 0, discreta = 1, moderada = 2, intenso = 3) vascularização (ausência = 0, discreta = 1, moderada = 2, intenso = 3) (VIDINSK,2006). Os cortes corados por hematoxilina-eosina, analisou resposta inflamatória celular e foram lidos campo, na área da lesão.

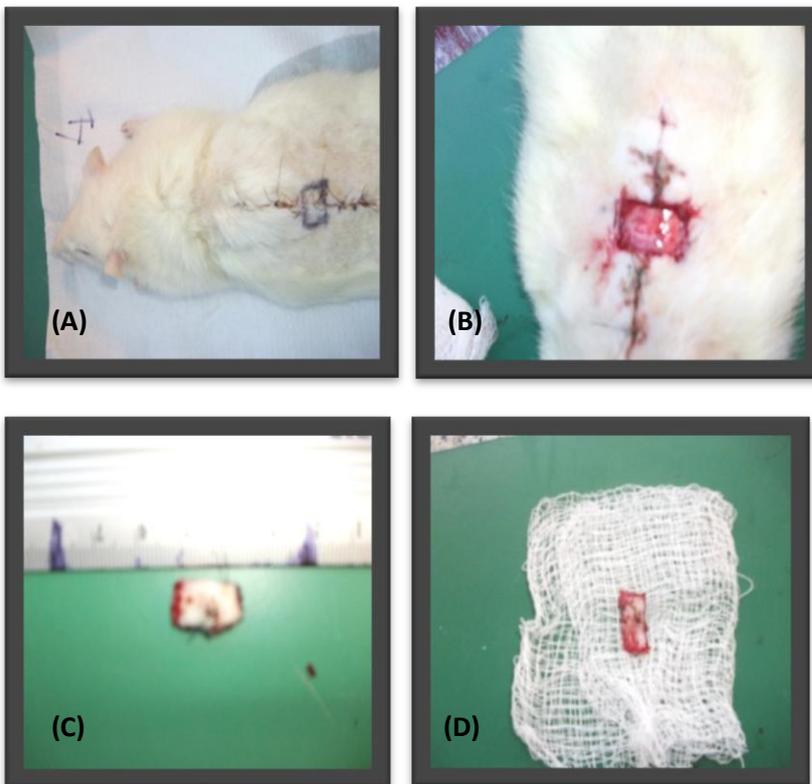


FIG 8:Imagem (a) marcação da amostra; (b)retirada da amostra (c) medição da amostra (d)fragmento.

7. Análise Imunohistoquímica:

As reações imunohistoquímicas foram realizadas no laboratório do Núcleo de Estudos em Microscopia e procedimento de Imagens do departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, os cortes foram obtidos das espécies no 7º dia, emblocados em parafina e estendidos em lâminas de vidro previamente tratados (anexo C). Para as reações imunohistoquímicas, foi utilizado o método de estreptavidina-biotina-peroxidase com os seguintes anticorpos primários dos seguintes marcadores NfκB (P50 Santa Cruz-SC mouse mononuclear; HSP27 (Ms mAb to 4-hydroxy); NT (Nitrotyrosine – monoclonal 39B6) as secções foram desparafinadas e reidratadas através de alcoóis xileno e graduada, após recuperação do antígeno, a peroxidase endógena foi bloqueada (15min) com peróxido de hidrogênio a 3% e lavou-se em phosphatebuffered em solução salina (PBS). A análise quantitativa das amostras de células epiteliais, nas áreas de incisão, sofreram marcação de coloração marrom. As áreas de lesão foram delimitadas por campo, utilizando 05 campo de superfície por área de lesão (área de lesão = 0,024mm², no total de 0,12mm²) descrito por Bernacchio *et al*, 2007.

A contagem das células foi realizada com microscópio Optico-marca Olympus modelo DX41 e contador modelo Blood Cell Counter Export Quality-marca Digitimer por um único observador cego. Foram consideradas células com marcação positiva, ou seja, coradas; elas serviram para ocorrer uma comparação estatística com os resultados histopatológicos.

8. Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Graphped* versão 6.0 para o sistema operacional *Windows*. Os dados nos apresentaram distribuição normal, a avaliação histológica foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney e pós- teste de Dunn para as variáveis quantitativas. O nível de significância utilizado para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5% (p<0,05).

9. RESULTADOS

9.1 Avaliação Histológica dos grupos estimulados com base nos escores microscópicos para exsudato, reepitelização, fibrose e vascularização

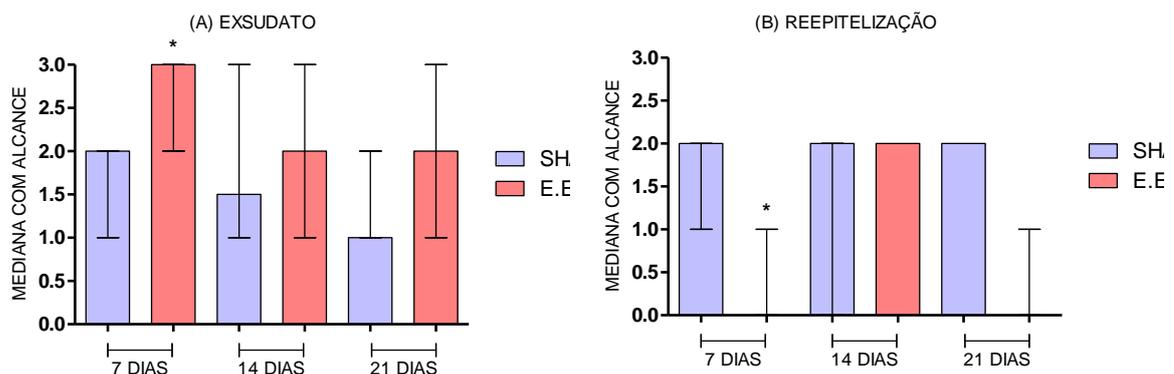
9.1.1. Grupo 1 – grupo tratado com solução salina e eletroestimulação (Tabela 1 e fig1).

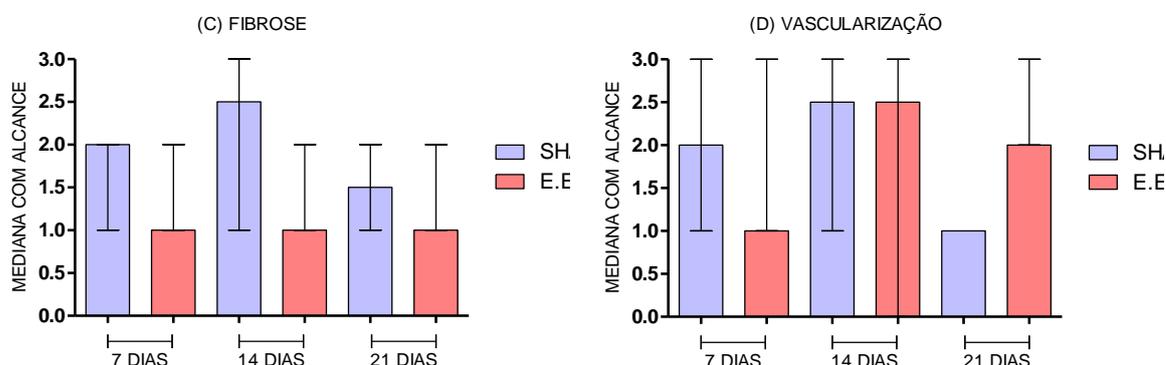
Tabela 01. Efeito da eletroestimulação sobre as lesões da pele de ratos no Grupo 1.

	EXSUDATO		REEPITELIZAÇÃO	
	SHAM	EE	SHAM	EE
7 dias	2 (1-2)	3 (2-3)*	2 (1-2)	0 (0-1) **
14 dias	1,5 (1-3)	2 (1-3)	2 (0-2)	2 (2-2)
21 dias	1 (1-2)	2 (1-3)	2 (2-2)	0 (0-1)
		* p=0,0361		** p=0,0072
	FIBROSE		VASCULARIZAÇÃO	
	SHAM	EE	SHAM	EE
7 dias	2 (1-2)	1 (1-2)	2 (1-3)	1 (1-3)
14 dias	2,5 (1-3)	1 (1-2)	2,5 (1-3)	2,5 (0-3)
21 dias	1,5 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-1)	2 (2-3)

Grupo tratado com solução salina e eletroestimulação. Os dados representam os valores das medianas (mínimo-máximo) dos escores microscópicos, tendo sido analisados utilizando o teste de Mann Whitney. P<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo sham equivalente.

Figura 9. Grupo 1 – Efeito da eletroestimulação sobre as lesões da pele de ratos, (A) exsudato, (B) reepitelização, (C) fibrose, (D) vascularização.





As barras representam os valores das medianas (e alcance) dos escores microscópicos. Grupo sham: água 0,01mL/g. Grupo teste: água 0,01mL/g e eletroestimulação. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo sham equivalente.

Em relação ao exsudato, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 3,0 com alcance de 2,0 a 3,0; sendo a diferença entre os grupos estatisticamente significativa ($p=0,0361$). No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significativas. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significativas.

Em relação à reepitelização, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 0,0 com alcance de 0,0 a 1,0; sendo a diferença entre os grupos estatisticamente significativa ($p=0,0072$). No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 0,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 2,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significativas. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 2,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 0,0 com alcance de 0,0 a 1,0; os grupos não apresentaram diferenças significativas.

Em relação à fibrose, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,5 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes.

Em relação à vascularização, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,5 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,5 com alcance de 0,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 1,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 2,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes.

9.1.2. Grupo 2 – grupo tratado com óleo de milho e soja e eletroestimulação (Tabela 02 e fig. 2)

Tabela 02. Efeito da eletroestimulação sobre as lesões da pele de ratos no Grupo 2.

	EXSUDATO		REEPITELIZAÇÃO	
	SHAM	EE	SHAM	EE
7 dias	1,5 (1-2)	2 (1-3)	2 (1-2)	2 (0-2)
14 dias	1 (1-2)	2 (1-2)	1 (0-2)	2 (2-2)
21 dias	1 (1-1)	2 (1-3)	1 (0-2)	1 (0-2)
	FIBROSE		VASCULARIZAÇÃO	
	SHAM	EE	SHAM	EE
7 dias	1 (1-2)	2 (1-3)	0,5 (0-2)	2 (0-3)
14 dias	1 (1-1)	2 (1-3)	1 (0-2)	1,5 (1-2)
21 dias	1 (1-2)	2 (1-2)	1 (0-2)	1 (1-2)

Grupo sham e eletroestimulado tratado com óleo de milho e soja . Os dados representam os valores das medianas (mínimo-máximo) dos escores microscópicos, tendo sido analisados utilizando o teste de Mann Whitney. Os grupos eletroestimulados não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos controles.

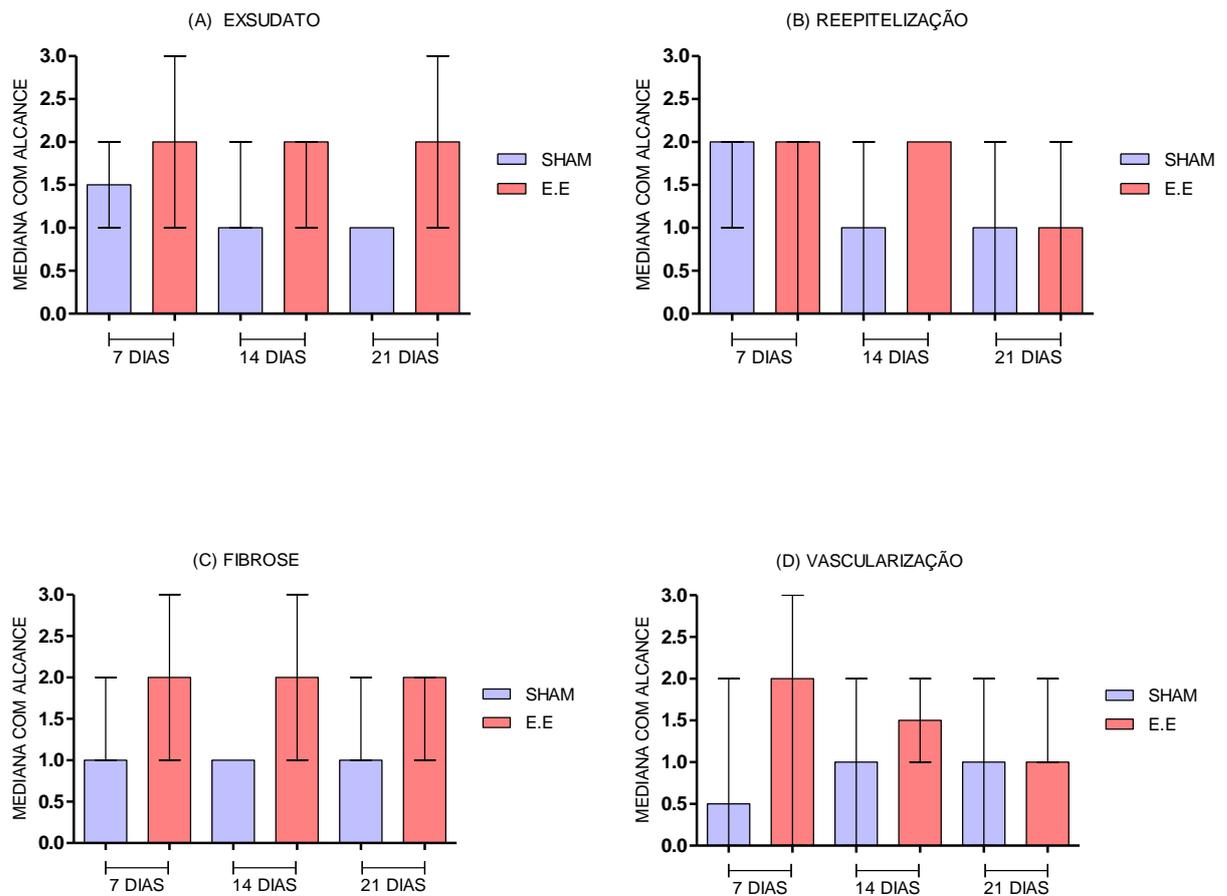
Em relação ao exsudato, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 1,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0.

Em relação à reepitelização, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 0,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 2,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0.

Em relação à fibrose, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 1,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0.

Em relação à vascularização, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 0,5 com alcance de 0,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 0,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes descritos na fig. 13.

Figura 10. Grupo 2 – Efeito da eletroestimulação sobre as lesões da pele de ratos, (A) exsudato, (B) reepitelização, (C) fibrose, (D) vascularização.



As barras representam os valores das medianas (e alcance) dos escores microscópicos. Grupo sham: óleo de milho e óleo de soja 0,01mL/g. Grupo teste: óleo de milho e óleo de soja 0,01mL/g com eletroestimulação. *p < 0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo sham equivalente.

9.1.3 Grupo 3 – grupo tratado com óleo de oliva, cânola e linhaça e eletroestimulação

(Tabela 3)

Tabela 03. Efeito da eletroestimulação sobre as lesões da pele de ratos no Grupo 3.

	EXSUDATO		REEPITELIZAÇÃO	
	SHAM	EE	SHAM	EE
7 dias	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (0-2)	2 (0-2)
14 dias	1 (1-2)	1 (1-2)	2 (1-2)	2 (2-2)
21 dias	1,5 (1-3)	2 (1-3)	1,5 (0-2)	1,5 (0-2)
	FIBROSE		VASCULARIZAÇÃO	
	SHAM	EE	SHAM	EE
7 dias	2 (1-2)	1 (0-2)	2 (1-3)	0 (0-3)
14 dias	1 (1-1)	1 (1-3)	0 (0-2)	1 (0-2)
21 dias	1 (1-3)	1,5 (1-3)	0 (0-3)	1,5 (0-3)

Grupo sham e eletroestimulado tratado com óleo de oliva, cânola e linhaça. Os dados representam os valores das medianas (mínimo-máximo) dos escores microscópicos, tendo sido analisados utilizando o teste de Mann Whitney. Os grupos eletroestimulados não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos controles.

Em relação ao exsudato, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0;

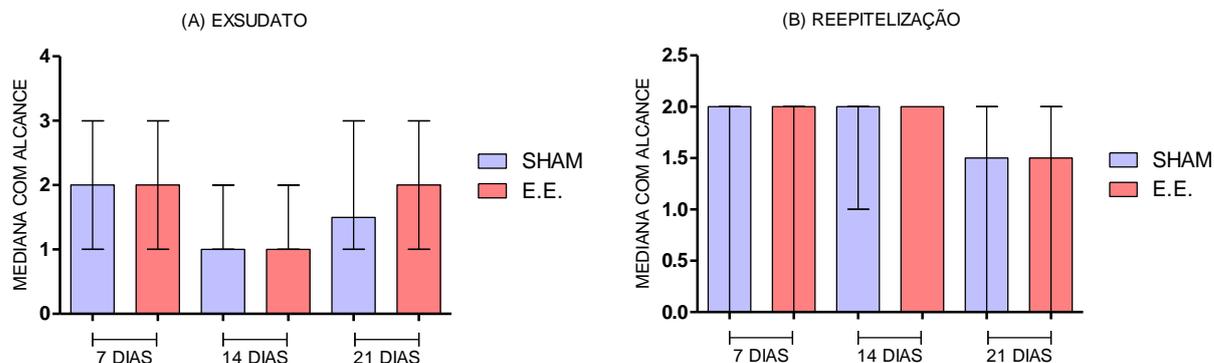
Em relação à reepitelização, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 0,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 0,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0;

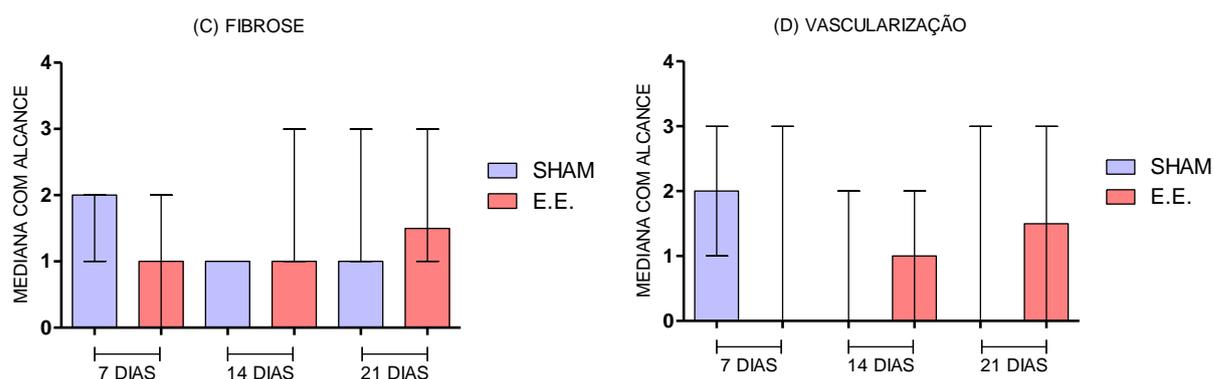
enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 2,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 0,0 a 2,0, enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 0,0 a 2,0;

Em relação à fibrose, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 1,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 3,0;

Em relação à vascularização, no tempo de 7 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 0,0 com alcance de 0,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 14 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 0,0 com alcance de 0,0 a 2,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes. No tempo de 21 dias, o grupo sham obteve mediana igual a 0,0 com alcance de 0,0 a 3,0; enquanto o grupo eletroestimulado obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 0,0 a 3,0; os grupos não apresentaram diferenças significantes.

Figura 11. Grupo 3 – Efeito da eletroestimulação sobre as lesões da pele de ratos, (A) exsudato, (B) reepitelização, (C) fibrose, (D) vascularização





As barras representam os valores das medianas (e alcance) dos escores microscópicos. Grupo sham: MIX (óleos de linhaça, cânola e oliva) 0,01mL/g. Grupo teste: MIX (óleos de linhaça, cânola e oliva) 0,01mL/g com eletroestimulação. *p < 0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo sham equivalente.

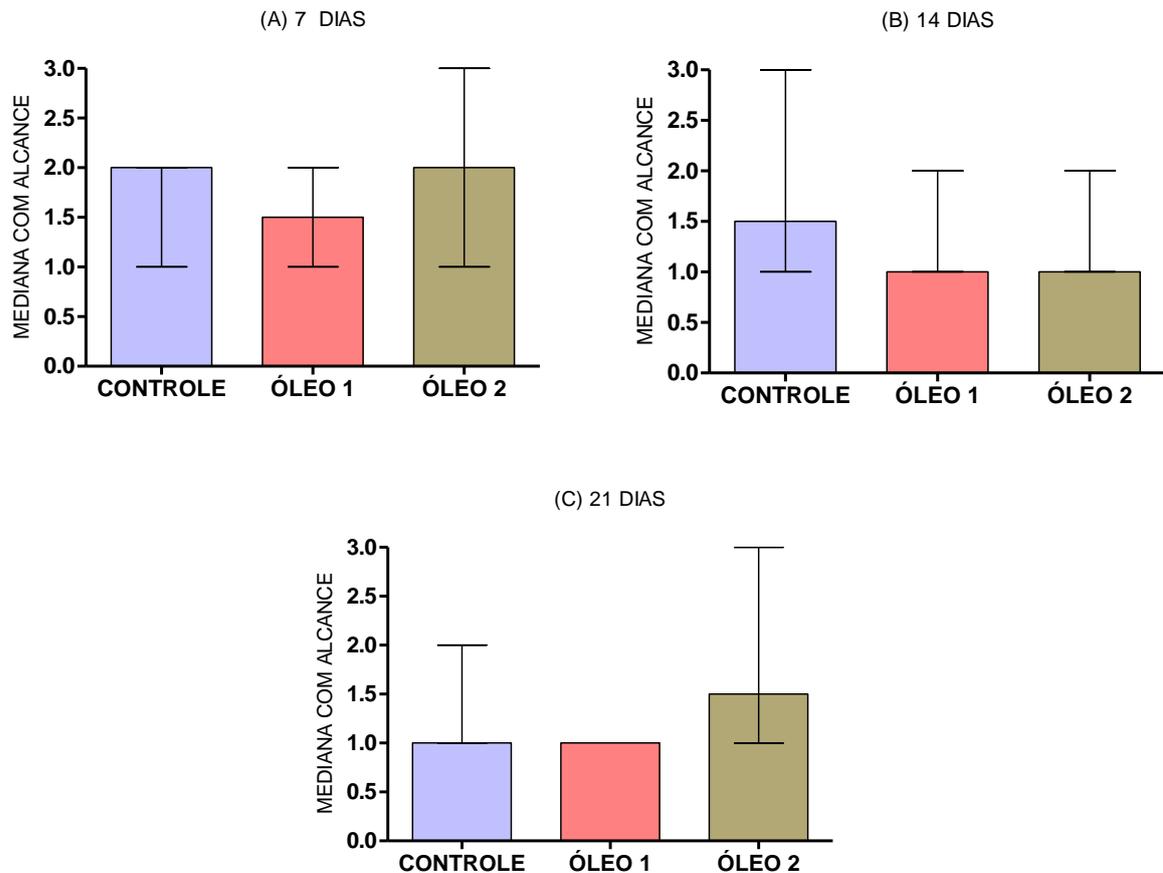
9.2. Avaliação histológica dos grupos tratados apenas com os óleos vegetais com base nos escores microscópicos para exsudato, fibrose, reepitelização e vascularização.

Tabela 04. Efeito dos óleos vegetais sobre exsudato e sobre reepitelização de lesões da pele de ratos.

	EXSUDATO			REEPITELIZAÇÃO		
	CONTROLE	ÓLEO 1	ÓLEO 2	CONTROLE	ÓLEO 1	ÓLEO 2
7 dias	2 (1-2)	1,5 (1-2)	2 (1-3)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (0-2)
14 dias	1,5 (1-3)	1 (1-2)	1 (1-2)	2 (0-2)	1 (0-2)	2 (1-2)
21 dias	1 (1-2)	1 (1-1)	1,5 (1-3)	2 (2-2)	1 (0-2)	1,5 (0-2)

Tabela 04. Os dados representam os valores das medianas (mínimo-máximo) dos escores microscópicos, tendo sido analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos tratados com os óleos em relação aos grupos controles, tanto quanto ao exsudato, quanto à reepitelização.

Figura 12. Efeito dos óleos vegetais sobre o exsudato de lesões da pele de ratos após 7 dias (A). 14 dias (B) e 21 dias (C).



As barras representam os valores das medianas (e alcance) dos escores microscópicos. Grupo controle: água 0,01mL/g. Grupo óleo 1: óleos de milho e soja 0,01mL/g. Grupo óleo 2: misturas (óleos de linhaça, cânola e oliva) 0,01mL/g. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle.

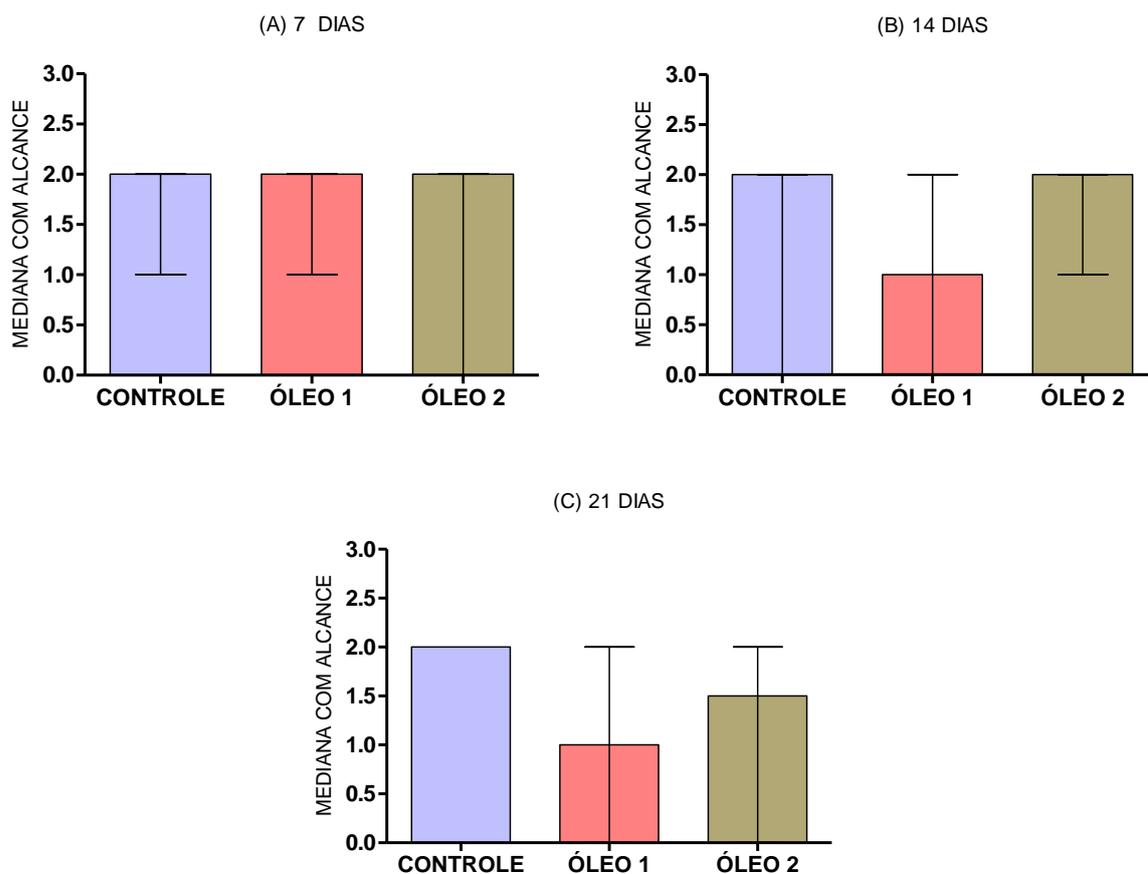
Em relação ao exsudato, no tempo de **7 dias**, o grupo controle obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 3,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0.

No tempo de 14 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0.

No tempo de 21 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a

1,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 3,0. Nenhum dos grupos tratados com óleos apresentou diferenças significativas em relação ao controle descritos na fig15.

Figura 13. Efeito dos óleos vegetais sobre a reepitelização de lesões da pele de ratos após 7 dias (A). 14 dias (B) e 21 dias (C).



As barras representam os valores das medianas (e alcance) dos escores microscópicos. Grupo controle: água 0,01mL/g. Grupo óleo 1: óleos de milho e soja 0,01mL/g. Grupo óleo 2: misturas (óleos de linhaça, cânola e oliva) 0,01mL/g. *p < 0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle.

Em relação à reepitelização (Tabela 04), no tempo de 7 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 0,0 a 2,0. Nenhum dos grupos tratados com óleos apresentou diferenças significativas em relação ao controle.

No tempo de 14 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 0,0 a 2,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0.

Nenhum dos grupos tratados com óleos apresentou diferenças significativas em relação ao controle.

No tempo de 21 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 2,0 a 2,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 0,0 a 2,0. Nenhum dos grupos tratados com óleos apresentou diferenças significativas em relação ao controle.

Tabela 05. Efeito dos óleos vegetais sobre fibrose e sobre vascularização de lesões da pele de ratos.

	FIBROSE			VASCULARIZAÇÃO		
	CONTROLE	ÓLEO 1	ÓLEO 2	CONTROLE	ÓLEO 1	ÓLEO 2
7 dias	2 (1-2)	1 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-3)	0,5 (0-2) **	2 (1-3)
14 dias	2,5 (1-3)	1 (1-1) *	1 (1-1) *	2,5 (1-3)	1 (0-2)	0 (0-2) ***
21 dias	1,5 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-3)	1 (1-1)	1 (0-2)	0 (0-3)
		*p=0,0117			**p=0,0346	***p=0,0162

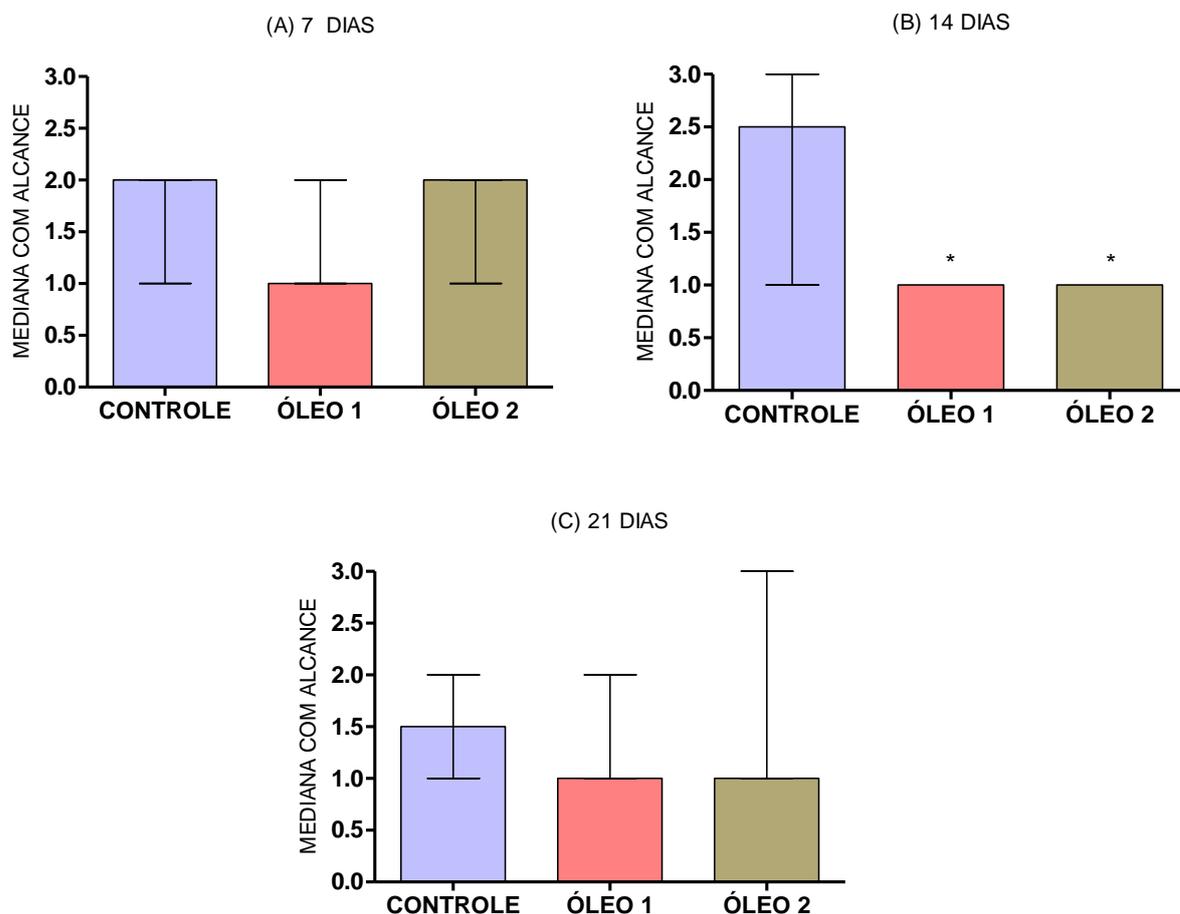
Tabela 05. Os dados representam os valores das medianas (mínimo-máximo) dos escores microscópicos, tendo sido analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. $P < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle.

Em relação à fibrose, no tempo de 7 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 2,0.

No tempo de 14 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 2,5 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 1,0 (estatisticamente significante em relação ao controle, $p=0,0117$); e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 1,0 (estatisticamente significante em relação ao controle, $p = 0,0117$).

No tempo de 21 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 1,5 com alcance de 1,0 a 2,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 2,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 3,0. Nenhum dos grupos tratados com óleos apresentou diferenças significantes em relação ao controle.

Figura 14. Efeito dos óleos vegetais sobre a fibrose de lesões da pele de ratos após 7 dias (A). 14 dias (B) e 21 dias (C).



As barras representam os valores das medianas (e alcance) dos escores microscópicos. Grupo controle: água 0,01mL/g. Grupo óleo 1: óleos de milho e soja 0,01mL/g. Grupo óleo 2: misturas (óleos de linhaça, cânola e oliva) 0,01mL/g. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle.

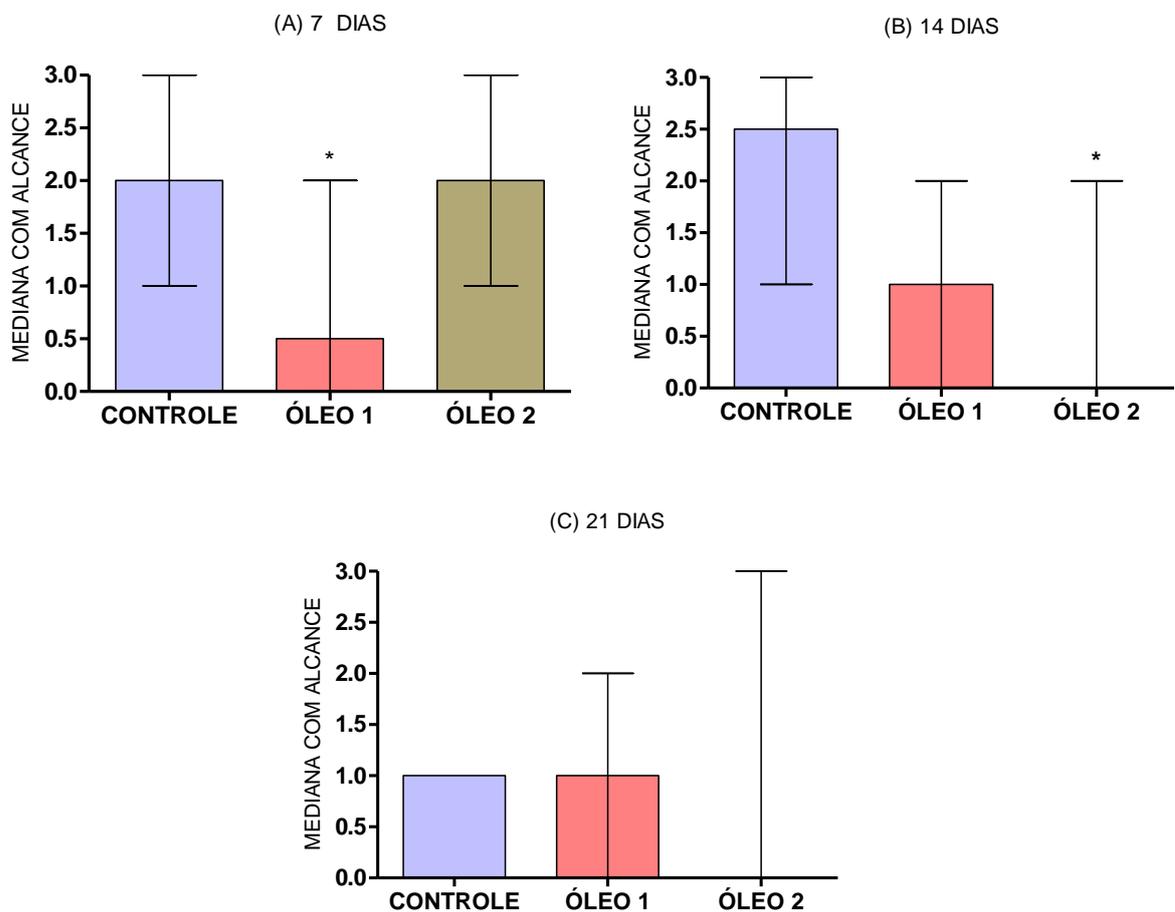
Em relação à vascularização (Figura 07 e Tabela 05), no tempo de 7 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 0,5 com alcance de 0,0 a 2,0 (estatisticamente significativa em relação ao controle, $p = 0,0346$); e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 2,0 com alcance de 1,0 a 3,0.

No tempo de 14 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 2,5 com alcance de 1,0 a 3,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de

0,0 a 2,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 0,0 com alcance de 0,0 a 2,0 (estatisticamente significativa em relação ao controle, $p = 0,0162$).

No tempo de 21 dias, o grupo controle obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 1,0 a 1,0; enquanto o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana igual a 1,0 com alcance de 0,0 a 2,0; e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana igual a 0,0 com alcance de 0,0 a 3,0. Nenhum dos grupos tratados com óleos apresentou diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 15. Efeito dos óleos vegetais sobre a vascularização de lesões da pele de ratos após 7 dias (A). 14 dias (B) e 21 dias (C).



As barras representam os valores das medianas (e alcance) dos escores microscópicos. Grupo controle: água 0,01mL/g. Grupo óleo 1: óleos de milho e soja 0,01mL/g. Grupo óleo 2: misturas (óleos de linhaça, cânola e oliva) 0,01mL/g. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle.

9.3. Resultados da imunohistoquímica realizada no 7º dia dos grupos tratados com óleos vegetais com marcadores; NF-kB , HSP-27 e Nitrotirosina

Os resultados da imunohistoquímica estão descritos na Figura 08 e na Tabela 06. Em relação à HSP27, o grupo controle obteve média de 88,80 ($\pm 7,01$), o grupo tratado com o óleo 1 obteve média de 76,60 ($\pm 13,55$), e o grupo tratado com o óleo 2 obteve média de 73,00 ($\pm 17,12$). Os grupos tratados com os óleos não apresentaram resultados estatisticamente diferentes do grupo controle.

Em relação ao NF-kB, o grupo controle obteve mediana de 23,50 com alcance de 17 a 61, o grupo tratado com o óleo 1 obteve mediana de 87,50 com alcance de 23 a 198 (estatisticamente significante em relação ao controle, $p = 0,0023$), e o grupo tratado com o óleo 2 obteve mediana de 72,00 com alcance de 14 a 110.

Em relação à nitrotirosina, o grupo controle obteve média de 77,50 ($\pm 15,21$), o grupo tratado com o óleo 1 obteve média de 76,20 ($\pm 14,43$), e o grupo tratado com o óleo 2 obteve média de 87,70 ($\pm 16,08$). Os grupos tratados com os óleos não apresentaram resultados estatisticamente diferentes do grupo controle.

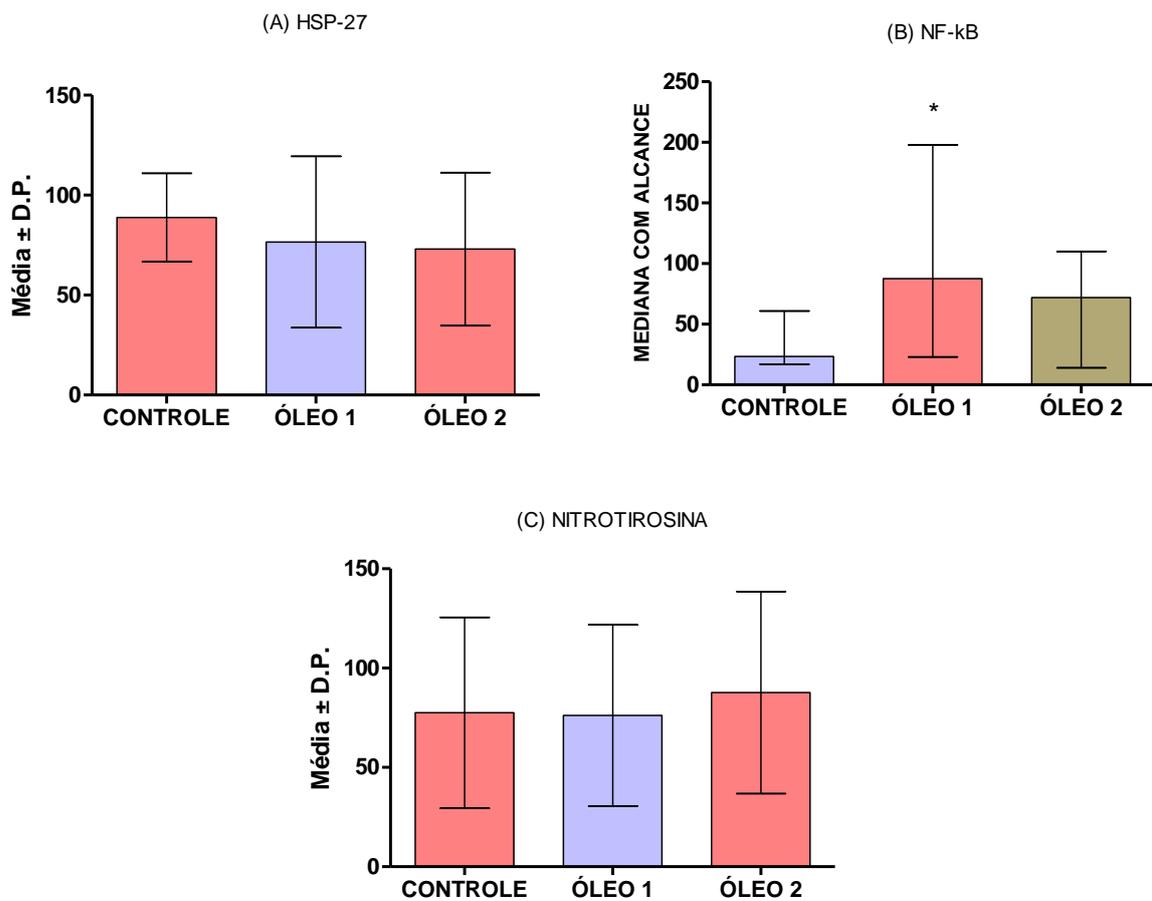
Tabela 06. Resultados da imunohistoquímica dos grupos tratados com os óleos vegetais.

	CONTROLE	ÓLEO 1	ÓLEO 2
HSP27	88,80 \pm 7,01	76,60 \pm 13,55	73,00 \pm 17,12
NF-kB	23,50 (17 – 61)	87,50 (23 – 198) *	72,00 (14 – 110)
NITROTIROSINA	77,50 \pm 15,21	76,20 \pm 14,43	87,70 \pm 16,08

* $p=0,0023$

Os dados representam os valores médios (\pm desvio padrão) ou de mediana (alcance) da contagem de células a partir de três marcadores específicos na imunohistoquímica, os grupos foram analisados com ANOVA e pós-teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn quando necessário. $P < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 16. Resultados da imunohistoquímica no 7º dia, dos grupos tratados com os óleos vegetais em relação aos marcadores (A) HSP27, (B) NF-kB e (C) NITROTIROSINA.



As barras representam os valores médios (e desvio padrão) da avaliação histológica. Grupo controle: água 0,01mL/g. Grupo óleo 1: óleos de milho e soja 0,01mL/g. Grupo óleo 2: misturas (óleos de linhaça, cânola e oliva) 0,01mL/g. *p < 0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle.

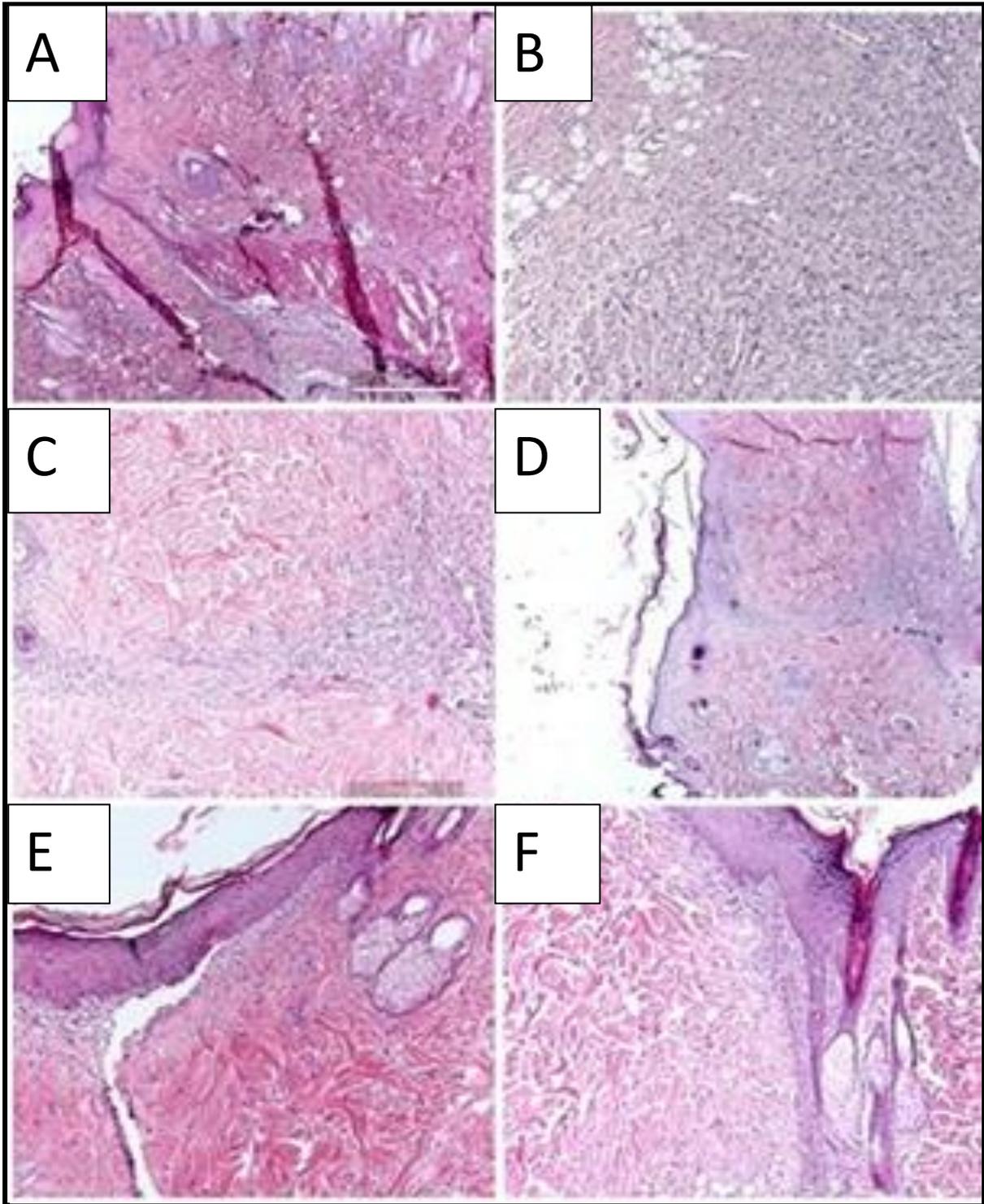


FIG.18. Corte histológico da pele de ratos do grupo salina não estimulado (A), grupo salina estimulado (B), grupo óleo de milho e soja não estimulado (C), grupo óleo de milho e soja estimulado (D), grupo óleo de canôla+linhaça+oliva não estimulado (E), grupo óleo de canôla+linhaça+oliva estimulado (F).

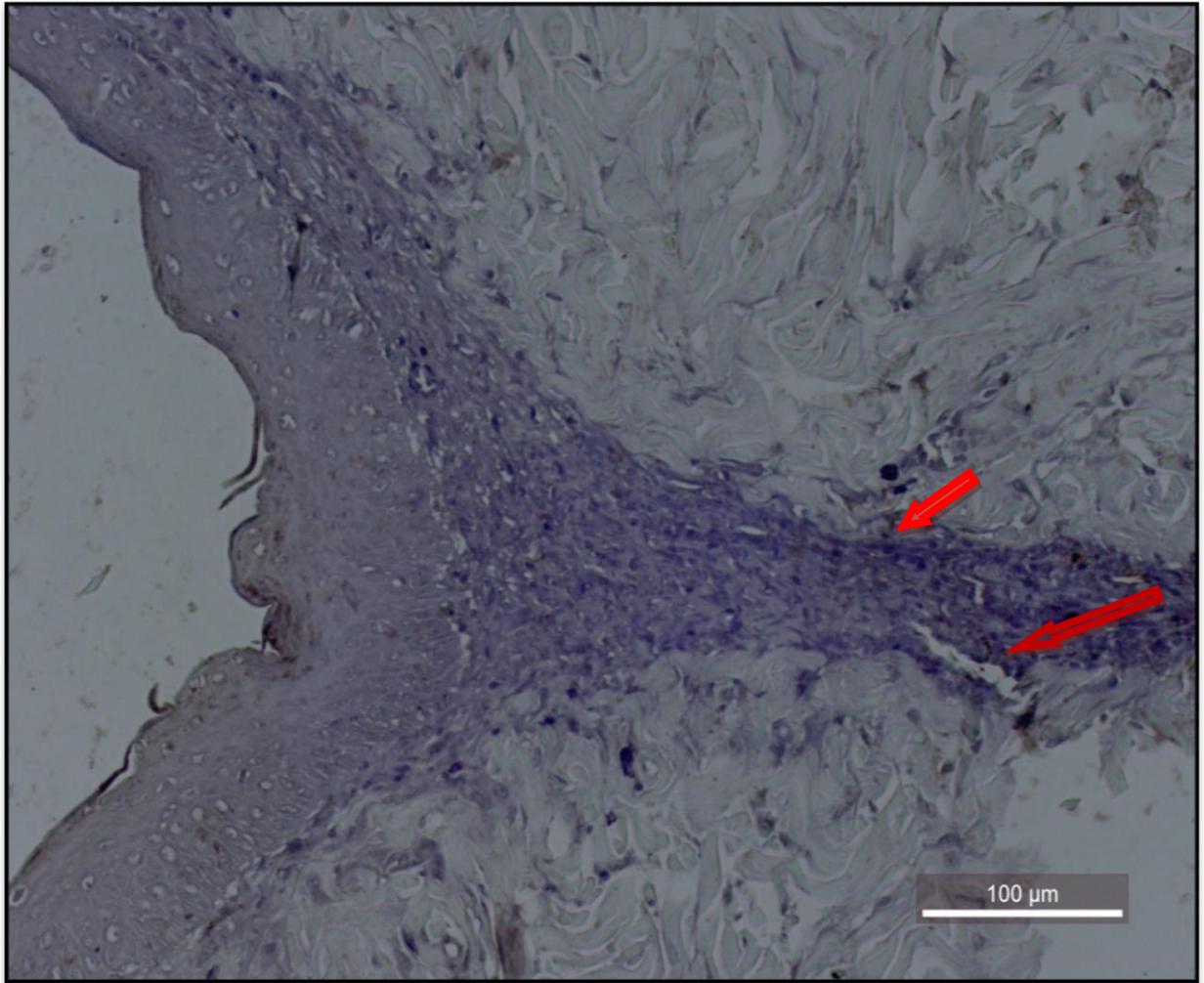


FIG 19. Corte histológico de pele de rato imunomarcado com NFκB.

Os parâmetros da cicatrização por análise histológica, na fig. 20, apresentou nos grupos não estimulados, exsudato e reepitelização e nos grupos estimulados exsudatos e neovascularização, enquanto na fig.21 apresentou marcação positiva pela presença de células epiteliais com marcação intensa na cor marrom (setas vermelhas).

DISCUSSÃO:

Neste trabalho, foi investigado o efeito dos ácidos graxos mono e poliinsaturados e da microcorrente sobre o reparo tecidual, analisando as fases inflamatória, proliferativa e de maturação.

Dentre os recursos mais recentes para tratamento da cicatrização, a eletroestimulação de baixa intensidade, se mostra como os mais comumente utilizados para favorecerem o reparo tecidual. Os primeiros estudos realizados com baixas intensidades, ou seja, microcorrentes para o reparo tecidual foram publicados por Assimacopoulos (1964), utilizando corrente contínua em tratamento de úlceras em pé diabético.

Estudos com diversos tipos de eletroestimulação como corrente direta e corrente em pulsos com alta e baixa frequência, em tecido cutâneo de várias espécies, demonstraram aumento na produção de colágeno e na resistência tensional dos tecidos tratados (DUNN et al, 1988; CASTILLO et al, 1995; TASKAN et al, 1997; BERRETA, 2006).

Vários estudos relatam o efeito do uso da corrente de baixa intensidade na cicatrização de feridas incisionais. A partir do resultado encontrado por Assimacopoulos (1964, 1968, 1998), diversos estudos *in vivo* foram realizados para demonstrar a eficiência da microcorrente e acelerar o processo de cicatrização e seus mecanismos de ação fisiológica. (BECKER; MURRAY; 1967; BECKER, 1985, FALANGA, 1987, WINDSOR, 1993; WATSON, 1998).

Com relação à estimulação elétrica, a literatura científica expressa um grande conflito. Pode-se evidenciar que as publicações não relatam os parâmetros exatos da estimulação, o número limitado de ensaios controlados dificultam a quantificação e comparação dos efeitos da estimulação elétrica na reparação da pele (WATSON, 2003). Os resultados no que diz respeito à intensidade, forma de onda e tempo de aplicação são controversos. Apesar desta falta de padronização nos resultados de ensaios clínicos, os efeitos benéficos predominam e somente a minoria de estudos mostra resultados nulos ou negativos.

Neste trabalho, foi realizado um modelo experimental, utilizando uma intensidade de 50 μ A com um tempo de 20 minutos e modo de aplicação automático, em 2,5 segundos. Os aparelhos de microcorrentes são projetados para simular as funções e os sinais bioelétricos c,

gerando uma corrente elétrica para compensar a bioeletricidade que está diminuída no tecido lesado, aumentando a capacidade do corpo em transportar nutrientes para as células da área afetada (CHENG et al,1982; BECKER,1985; WING,1989; KIRSCH; LENER,1990; VODOVNIK et al,1992; BECKER,1995; CRAFT,1998; STARKEY, 2001).

Becker e Jaffe e Vanable (1982); Becker (1974, 1982); Weiss, Kisner e Eaglsteir (2003). O mecanismo de ação da estimulação elétrica é baseado na teoria da bioeletricidade, como defesa de alguns autores: estes autores evidenciaram que a bioeletricidade endógena é responsável pela deflagração e direcionamento do processo de reparo. Eles defendem que os campos elétricos exógenos (eletroestimulação) teriam ação sobre o desencadeamento dos eventos químicos, celulares e vasculares relacionados às fases de cicatrização.

Alguns estudos evidenciam que as células envolvidas nas lesões de pele migram em direção ao ânodo ou catodo (galvanotaxia), dependendo do tipo de célula (EBERHARDT, 1986; DUNN, 1988; KLOTH, 2005).

O estudo investigado por Dunn (1988) demonstrou que o uso de corrente direta com intensidades entre 20 a 100 μA , foi capaz de aumentar o número de fibroblasto para o cátodo. Kloth (2005) destacou a galvanotaxia como efeito fisiológico evidenciado em treze investigações realizado *in vitro*.

Weiss, et al. analisaram o comportamento da migração celular da microcorrente nas primeiras oito horas em ratos. Ignorando também o fato que a eletroestimulação, é mais apropriada para reverter o potencial elétrico da lesão em torno do 4º dia de reação inflamatória.

Estudos *in vitro* indicam os efeitos da estimulação elétrica em nível celular. Cheng et al mostram a ação da eletroestimulação de baixa intensidade (100 a 500 μA) na concentração de ATP e na incorporação de aminoácidos nas células em pele de ratos. Esses efeitos são explicados pelas modificações causadas pela eletroestimulação, nos gradientes da membrana celular.

Os resultados encontrados neste estudo evidenciaram que à eletroestimulação pré-condicionante promoveu elevação do exsudato e redução da reepitelização no 7º dia ($p = 0,0361$ e $p=0,0072$). Em relação ao grupo tratado com as misturas de óleos e eletroestimulação, não apresentou diferenças significativas no 7º, 14º e 21 dias com relação ao grupo controle. Quanto à fibrose e vascularização, não apresentou grande significância em

nenhum grupo tratado com solução salina e a eletroestimulação. Isso indica que no 7º dia de tratamento ocorreu um pico de atividade com a eletroestimulação, de acordo com alguns achados de pesquisa como o estudo de Wietzkoski et al (2005), que demonstraram haver alteração do tecido de granulação com o grupo tratado com microcorrentes entre o 3º e 7º dia . Quanto à mistura de óleo e a eletroestimulação, não houve aceleração desse processo, corroborando com os achados de Junior et al (2012), que o uso de óleo de sementes com eletroestimulação não alterou o reparo tecidual.

Neste estudo, foram utilizadas misturas de óleos contendo ácidos graxos poliinsaturados; foram avaliados em modelo de cicatrização em ratos tendo em vista a sua ação nutracêutica. No experimento, foi utilizada uma mistura com potencial nutracêutico com ALA (óleo de canôla, linhaça e oliva) e uma mistura isolipídica, sem potencial nutracêutico utilizada como controle neutro (óleo de milho e soja). Também foi utilizado um grupo controle, que recebeu apenas solução salina; tanto o controle quanto os óleos foram administrados durante 7, 14 e 21 dias por via orogástrica.

A administração prévia das misturas nutracêuticas, durante 7,14 e 21 dias antes da incisão cirúrgica, caracteriza-se o pré-condicionamento nutricional. Verificou-se que o modelo experimental desse trabalho está consistente; com relação ao uso da mistura de óleos, o óleo 1 (milho e soja) e óleo 2 (canôla+linhaça+oliva) comparado ao grupo controle, não apresentou diferença estatística em relação a exsudato e reepitelização em todos os tempos analisados; e com relação à fibrose e à vascularização, entretanto a diferença estatística foi observada no tempo de 7 e 14 dias com redução destas variáveis.

O ácido linolênico é o AGPI mais encontrado na dieta ocidental; é metabolizado em ácido araquidônico por reações de dessaturações e alongação, e via cicloxigenase, em prostaglandinas e tromboxanos da série 2 e, via lipoxigenase, em leucotrienos da série 4 (NAKAMURA, 2005; PINHEIRO, 2011). O resultado final do metabolismo excessivo de ácidos graxos ω -6 é a produção de mediadores pró-inflamatórios, ocorrendo imunossupressão, vasoconstrição, edema, aceleração da quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, aumento de citocinas pró-inflamatórias.

Na revisão de literatura, feita até o presente momento, não foram encontrados trabalhos utilizando microcorrentes e o uso da suplementação com ALA em pele de ratos nos tempos de 7, 14 e 21 sobre o reparo tecidual.

Valle *et al*, 2006) utilizou 8 ratos com peso médio de 300g, induziu a ferida com peróxido de hidrogênio e uso da microcorrente, apresentando melhora na primeira semana da cicatrização. Já Junior *et al* (2012) utilizou 48 ratos, tratados com microcorrentes e óleo de sementes de *Jatropha curcas* nos 2º, 6, 10º e 14º dia, a aplicação tópica do óleo de sementes não promoveu melhora no reparo tecidual, mais a microcorrente isolada apresentou resposta positiva, combinada com o óleo foi pouco significativa. Cavazanacw *et al* (2009) utilizou açúcar e AGE na cicatrização das feridas em 96 ratos com incisão quadrangular, não houve resultados no tratamento, enquanto na resposta inflamatória obteve significância sob influência do tempo.

Moritz *et al* (2008) utilizou 88 ratos com o uso do ω -3 (na dose de 2/3 de EPA, 1/3 de DHA e vitamina E) distribuídos em dois grupos, observou significância em todos os grupos; e Martin *et al* (2005) fez uso da lanolina tópica a 2% em 30 ratos e ferida de área 1x2cm e não apresentou respostas no processo de cicatrização

Os resultados dos óleos com relação ao grupo controle, sem eletroestimulação, apresentou estatística significativa em relação à fibrose no tempo de 14 dias $p = 0,0117$ e em relação à vascularização apresentou estatística significativa nos tempos de 7 dias $p = 0,0346$ e 14 dias $p = 0,0162$ em relação ao grupo controle. Isso confirma que houve proliferação celular e remodelação. Já os dados achados na pesquisa de Rodrigues *et al* (2012) utilizou 108 ratos em dois grupos com suplementação do ácido linolênico e ácido oleico, apresentando aceleração da fase inflamatória da cicatrização.

Estudos prévios demonstraram que a aplicação tópica de alguns óleos melhora parâmetros de cicatrização de feridas, tais como fibras do tecido conjuntivo (CARDOSO, *et al*, 2004), redução na espessura da camada de células necróticas em torno da ferida (PEREIRA *et al*, 2008), de aceleração e de fechamento da ferida (PARK *et al*, 2010; OTRANTO *et al*, 2010).

Um dos primeiros acontecimentos após ocorrer a lesão na pele é a hipóxia. A oxigenação dos tecidos é comprometida devido à interrupção de vasos, limitando o processo de reparo. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são importantes não só para desinfecção do local da ferida, mas também serve de sinalização e regulação a ativação de fatores de transcrição (MORGAN e LIU, 2011), a resposta inflamatória da migração de células (TOBER *et al*, 2008), e na produção de citocinas (HAN *et al*, 2009).

Yates e Rayner (2002) estudaram os efeitos da suplementação de ácidos graxos na ativação desses fatores de transcrição na cicatrização de feridas em ratos.

A expressão tecidual de nitrotirosina e HSP27 não apresentou diferença estatística com relação ao grupo controle e entre os grupos; já expressão tecidual do NFkB apresentou elevação de seus níveis no 7º dia $p = 0,023$ com relação ao grupo controle, justificando os resultados encontrados em Rodrigues *et al*, (2012), quando a suplementação com o ácido linolênico confirma a redução da ativação do NF-kB em 1 hora após o ferimento.

Tendo em vista o crescente aumento do uso de microcorrentes em tratamentos estéticos, cirúrgicos e clínicos, alguns fatores merecem ser objeto de novas pesquisas. Neste experimento, foi desenvolvido um modelo experimental com uma ferida linear. O pré-condicionamento tanto com a eletroestimulação como o uso do óleo 1 (milho e soja) induziram aumento de marcadores inflamatórios, tais como, elevação do exsudato e da expressão tecidual do NFkB. O uso condicionante tanto do óleo 1 (milho e soja), quanto do óleo 2 (câbola, linhaça, oliva) promoveram redução da vascularização (angiogênese) e da formação da fibrose na fase proliferativa do processo cicatricial. Além disso, necessita-se da realização de estudos mais aprofundados para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação do ácido linoleico e da corrente de baixa intensidade nos tecidos biológicos.

CONCLUSÃO:

1. O pré-condicionamento por meio de eletroestimulação com microcorrentes tem efeito benéfico na fase inflamatória no processo de cicatrização.
2. O uso dos óleos de milho e soja promoveu inflamação tecidual por maior elevação da expressão tecidual de NFkB.
3. O pré-condicionamento com óleos mono e poliinsaturados reduziu a fibrose e a vascularização na fase proliferativa do processo cicatricial.
4. Não houve efeito précondicionante modulador no reparo cicatricial com uso da eletroestimulação de baixa intensidade e óleos mono e poliinsaturados.

REFERÊNCIAS

ABDULA, A.M.; AHMED A.K.;HAPIPAH M.A.; NOOR,M.S.; ISMAIL,S. Wound Healing Activities of Reflexia Hameltii Extract in rats. **J.Clin.Biochem, Nutrition**. 45, 304-308, 2009.

ALEXANDER, J.W. Immunonutrition: trhe role of ω -3 fatty acids. **Nutrition**, v. 14, n. 7-8, p. 627-633, 1998.

ALEXANDROVA, M.L.; BOCHEV, P.G. Oxidative stress during the chonic phase after stroke. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 39, n 3, p. 297-316, 2005.

ALVAREZ, OM, Mertz, PM, Smerbeck , RV, Eaglstein, WH: The healing of superficial skin wounds is stimulated by external electrical current. **Jornal of investigations in Dermatology** 81: 144 – 148, 1983.

AGNE, Jones E. Eletroterapia: teoria e prática – Santa Maria (RS): **Editora Orrium**, 2005.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 1994. p. 620.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. Dermatologia, Rio de Janeiro, 3ed. **Guanabara Koogan**, 2004.

AIRES, M. M. Fisiologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. **Guanabara Koogan**, 1999.

BALBINO, C.A., PEREIRA L.M.,CURI R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 41, 27-51, 2005.

BARBOSA, K.B.F; COSTA, NM.B.; ALFENAS, R.C.G. Oxidative stress: assessment of biomarkers. Nutrire: rev. **Soc.Bras.Alim. Nutr.**, São Paulo, v.33, n.2, p.11-128, 2008.

BARKER. AT; Jaffe, LF; Banable,J.W. the Glabrous epidermis of cavies contains a powerfull battery. **Am J. Physiol.** V.242, pR 358 – 366, 1982.

BERCKER, P.f.L. Patologia geral. São Paulo. **Sarvier**, 1997.

BERNACCHIO,R.M.G. Quantificação de miofibroblastos em tecido cutâneo de ratos submetidos a incisão cirúrgica com laser de CO₂ e diodo,bisturi elétrico e convencional. **dissertação**. São Paulo, 2007.

BORBA,G.C.Estimulação elétrica pré-incisional na cicatrização em pele de rato, **dissertação**,Universidade Federal de São Paulo, 2009.

BULLOCK,J. BARKER,T.A.; COULTON.L.MACNEILS.S.the effect of induced biphasic Pulsed Currents on Re-epithelialization of a novel wound healing model. **Bioeletromagnetics**.28:31-41, 2007.

BUVINIC, et al. ATP Released by electrical stimuli elicits calcium transients and genes expression in skeletal muscle. **Biological chemistry** vd. 289, Nº 50 p. 34490-34505, 2009.

B.Y.lee, et al. Microcurrent treatment for chonic Resistant Wounds. **Advances in therapy**. V24 No 6, 2007.

CAVAZANA,W; SIMÕES,M.L.;YOSCHIL,S.;Sugar and fatty acids with triglicerydes on the treatment of wounds\}: experimental study in rats.**Anais Bras.Dermat** 84(3):229-36, 2009.

CALDER, P.C. Immunoregulatory and antiinflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 4, p. 467-490, 1998.

CALDER, P.C. Fatty acids and gene expression related to inflammation. **Nestlé Nutr. Workshop Ser. Clin. Perform. Programme**, v. 7, p. 19-36, 2002.

CHANG, Ks SNELLEN JW (1982) Bioelectric activity in the rabbit ear regeneration. **Journal of experimental zoology** 221: 193 – 203.

CHENG,N; Van Hoff, H; Bockx, E; et al. The effect of electric currents on ATP generations protein syntesis, and membrane transport in rat skin. **Clin, Orthop** v. 171, p 264-272, 1982.

CRAFT, J. massage your eith health ,love,and jov. Hawaii: **Dr Joy Craft**, 1998.

CRUZ, A. N. N. Estimulação elétrica neuromuscular por microcorrente na cicatrização cutânea pós-operatória: análise do colágeno em ratos, **dissertação**, 2008.

COTRAN,R; Kumar, V; Collins, T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000. 125lp.

CURI,R;NEWSHOLME,P;PITHON-CURI,TC;PIRES-DE-MELO,M, et al.Metabolic fate of glutamine in lymphocytes,macrophages and neutrophils.**Braz.J.Biol.Res.**, v. 32n. I, p.15-21,1999.

DARSHAN S. Kelley,.Modulation of humam immune and inflammatory responses by Dietary Fatty Acids. **Nutrition**,17:669-673, 2001.

DECLAIR, V. Tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização com ácido linoleico. **J.Bras.Med.** 82(6): 36-41, 2002.

DUNN, M.G.; et al- Wound healing using a collagen matrix: effect of DC electrical stimulation. **J. biomed. Mater Res. Applied Biomateriais.** v . 22,p 191 -206 1988.

DOMINGUES, S.P.T.: Respostas das proteínas de choque térmico (27,60,72 e 73) em músculos de ratos após sessão de exercícios físicos de baixa moderada intensidade. **Dissertação**.Universidade Metodista de Piracicaba, 2006.

EDGAIR, F.M, et al.influence of lanolina on cicatrization.**Rev.Saúde**,7(16):19-25, 2005.

FALANGA, V. *et al.* - Electrical stimulation increases the expression of fibroblast receptor for transforming growth factor-beta, abstracted, **J. Invest. Dermatol.** v. 88, p.488, 1987.

FERREIRA, et al. The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature. **Rev. Esc Enferm USP**, 46 (3):752-60, 2012.

FOULDES; Barker, A.T. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. *Br. S. Dermatology*. v. 109, p 515-522, 1983.

GARCIA, *et al.* Effects of diet supplemented with omega 3 in soleus muscle of rats submitted to swimming: Histological and Morphometric Analisis. **Rev. Bras. Med Esporte**. Vol. 16, Nº-2010.

GARREL,C.*et al.* Ômega-3 fatty acids enlace mitochondrial superóxido dismutase activity in rat organs during post- natal **development**, 2011.

GASPI, *et al.* Effects of the topical Aplicacion of Hidroalcoholic leaf Extract of *oncidium flexuosum sims*(Orchidaceae) and Microcurrent on the healing of wounds surgically Induced in Wistar Rats, Evidence-Based Complementary and alternative. **Medicine**. 2011.

HATANAKA,E; CURI,R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Rev.Bras.Farmacol.** 88(2): 53-8, 2007.

JAFFE, L.F.; Vanable J.W. Electric fields and wound hearing. **Clin Dermatol** v. 2, p. 34-44, 1984.

JUNQUEIRA, L. C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. 10 ed Rio de janeiro: Editora **Guanabara Koogan**, 2004.

JUNIOR, J.R.P; GASPI,F.O.G.; NEVES,L.M.G.; ESQUISATTO,M.A.M.; SANTOS,G.M.T.; MENDONÇA, F.A.S. Application of *Jatropha Curcas* L. seed oil (Euphorbiaceae) and microcurrent on the healing of experimental wounds in Wistar rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol. 27 (7), 2012.

KANG,K.S. *et al.* Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and in vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. **Plos One**, 2010.

KAADA, B.; Flatheim, E.; Woie, L. Low-frequency transcutaneous nerve stimulation in mild/moderate hypertension. **Clinical Physiology**, v. 11,p.161-168, 1991.

LEE,J.W.; YOON.S.W.; KIM, T.H.; BARK, S.J.The effects of microcurrents on inflammatory reaction induced by ultraviolet irradiation. **Physical therapy**, 2011.

LUNDEBERG, T, Klartausson, J, Samuelson, U. Effect of electrical nerve stimulation on healing of ischaemic skin flaps. **The Lancet Sept 24**: 712-714, 1988.

MAIO, M. tratado de medicina estética, **Ed. Rocca**, São Paulo, 2004.

MAHAN, LK; ESCOLT-STUMP, K. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 11^a Ed. São Paulo: Rocca, 2005.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTI, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - parte 1. *An. Bras. Dermatol.*, 78 (4):393-408, 2003.

MANHEZI, A; BALCHION, M.M.; PEREIRA, A.L.: The use essential fatty acids in the treatments of wounds. **Rev. Bras. Enferm.**, 61(5): 629-9, 2008.

MARTIN, P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. **Science** v. 276, n 5309, p. 75- 81, 1997.

MARTINS N.L.P.; Malafaia O, Ribas – et al. Healing process in cutaneous surgical wounds in rats under the influence of *Orbignya phalerata* aqueous extract. **Acta cirúrgica brasileira** - vol. 21, 2000.

MERTZ, M.P., PATTI, M.J.; MARCIN, J. JAMES, MARSHALL, A.D.: Model for studying Bacterial Adherence to skin Wounds. **Microbiology**. p. 1601-1604. Vol. 25, Nº 9, 1987.

MESQUITA, R.T. et al. Anti-inflammatory effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids in rats. Instituto Basico de Biociência. *Rev. Dor*. São Paulo, 2011.

MOFFAT, M; HARRIS, K. Fisioterapia do sistema tegumentar, **Guanabara Koogan**, Ribeirão Preto, 2007.

MONTEIRO, V.C.B. Avaliação do estresse oxidativo em humanos e em animais suplementada com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3. **Dissertação**: São Paulo, 2006.

MULDER, G.D.; Treatment of open skin wounds with electric stimulation. **Archives of Physical Medicine in Rehabilitation** 72: 375 – 377, 1991.

NIEMOLLER, T.D.; BAZAN, N. G. Docosahexanoic acid neurolipidomics. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v-91, n. 3-4, p.85-89, 2010.

PALACIOS-PELAEZ, R.; LUWKI, W.J.; BAZAN, N.G. Omega-3 essential fatty acids modulate initiation and progression of neurodegenerative disease. **Mol. Neurobiol.**, v. 147, n.2, p. 291-299, 2007.

PASSARELA, S; CASAMASSIMA, F; MOLINARI, S; CARRETO, G; JIRILLO, E. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in liver mitochondria irradiated in vitro by helium neon laser. **FEBS**, v. 175 n.1, p. 95-99, 1984.

PEREIRA L.M., Hatanaka E., Martins E.F. et al. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. **Cell Biochem Funct** 26:197–204, 2008.

PURI, B.K. The clinical advantages of cold-pressed nonrefined evening primrose oil over refined preparations. **Med Hypotheses**; 62(1):116- 118, 2004.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A.P.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. The influence of low-level laser therapy on bromodulation of collagen and elastic fibers. **Braz. Oral Res.**17(4): 307-103, 2003.

Poltawski, L. and WATSON, T. **Bioelectricity and microcurrent therapy for tissue healing. Medicine**, 2009.

RICARDO U., ALFONSO V. **Marine oils: The Health benefits of n-3 fatty acids.** *Journal Nutrition*, v. 16, 2000.

ROBINSON A. & SNYDER-MACKLER L. **Eletrofisiologia Clínica-eletroterapia e teste eletrofisiológico.** Ed. 2º R.S.: Porto Alegre, Artmed, 2001.

ROCHA J. C. T. **Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese.** Artigo de revisão. *RBPS* nº17, vol.1 p.44-48; 2004.

RUIZ, S. C. **Efeito da corrente elétrica de baixa intensidade em feridas cutâneas de ratos.** Dissertação – Univasp, 2005.

SAMPAIO S.A.P.; RIVITTI. A. **Dermatologia**, 2^a ed. São Paulo Artes Médicas, 2000.

SANTOS, V. N. S.. FERREIRA, M. L. et al. **Eletric microcurrent in the restoration of the skin undergone a trichoroacetic acid peeling in rats.** Acta Cir Bras, 19 (5), 2004.

SEN R, Baltimore D. **Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.** Cell.; 46: 705-16; 1986.

SIEBENLIST U. **NF- κ B/I κ B proteins. Their role in cellgrowth, differentiation and development.** Biochim Biophys. Acta; 1332:7-13; 1997.

SIMOPOULOS, A.P. **Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases.** J. Am. Coll. of Nutr., v. 21, n. 6, p. 495-505, 2002.

SIMOPOULOS, A.P. **The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases.** Exp. Biol. Med., v. 233, n. 6, p. 674-688, 2008.

SHIROUCHI, B. et al. **Physiological Function of iso-type short-chain fatty acid and omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Containing oil in obese oletf rats.** J. Oleo. Sci. 59(6), 299-305, 2010.

RAJPUROHIT, B.; KHATRI, M.S.; METEGUD, D.; BAGEWADI, A. **Effectiveness of transcutaneous electrical nerve stimulation in bruxism associated with masticatory muscle pain – a comparative study Indian.** J.Dent Res, 2010.

TSUGUHKO T, Hideo Y, *et al.* **N-3 versus n-6 polyunsaturated fatty acids in critical illness.** Nutrition 14: 551-553, 1998.

VIDISNKĀ B., P. Gal, T. Toporcer, F. Longauer, L. Lenhardt, N. Bobrov, J. Sabo: **Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats.** Acta Vet. Brno, 75: 197-202, 2006.

WATSON, T. **Electrotherapy and tissue Repair.** sportex medicine, 29; 7-13, 2009.

WAITZBERG, D.L.; TORRINHAS, R.S. **Fish oil lipid emulsions and immune response:** what clinicians need to know. Nutr. Clin. Pract., v. 24, n. 4, p. 487-499, 2009.

WIEZILKOSKI, E.C.; ALMEIDA, M.F.C.; BORGES, L.O.; POMPEU, A.L, ANDREATA, K,S. **Laser HeNe no processo de cicatrizaçāo de feridas na pele de ratos.** J.P.C.F.E.P, Curitiba; 2009.

ANEXO- A – Preparo de solução tamponada de formaldeído a 10%

▪ Solução aquosa de formaldeído a 37%	100 ml
▪ Água destilada	900 ml
▪ Fosfato de sódio monobásico	4g
▪ Fosfato de sódio dibásico (anidro)	6,5

ANEXO- B- Protocolo de Calibração do aparelho de Microcorrentes

Procedimentos:

Antes de iniciar os procedimentos, verificar as especificações que devem estar contidas nos manuais de instruções, como por exemplo, a amplitude do pulso, a corrente (mA), a frequência (Hz) e o período (Is).

1. Conectar o cabo de força do equipamento na tomada (220V) e ligá-lo;
2. Verificar, visualmente, se todos os leds estão funcionando quando é selecionada a respectiva função através da chave de seleção;
3. Colocar a CARGA RESISTIVA especificada nos manuais de instruções dos equipamentos. Caso não esteja especificado nos manuais, considere a norma NBR-IEC 601-2-10;
4. Conectar a ponta do osciloscópio a um dos canais;
5. Calibrar o osciloscópio em is/DIV de modo que permita medir a largura do pulso em duas divisões na escala de tempo. Congelar a imagem para a medição;
6. Como procedimento anterior, medir a tensão (pico-pico) ainda com a imagem congelada e FOTOGRAFAR a forma de ondas;
7. Calibrar o osciloscópio para uma escala de tempo de modo que permita visualizar 3 pulsos, medir as frequências mínima e máxima e a tensão RMS;
8. Todas essas medidas devem ser feitas aumentando gradativamente a intensidade do estímulo no equipamento de Microcorrentes em mínima escala, escala média e máxima escala de intensidade de corrente. Também deverá ser feita a mesma medida para a frequência mínima e máxima;
9. Repetir os procedimentos acima citados três vezes para todos os canais do equipamento de microcorrentes testado.

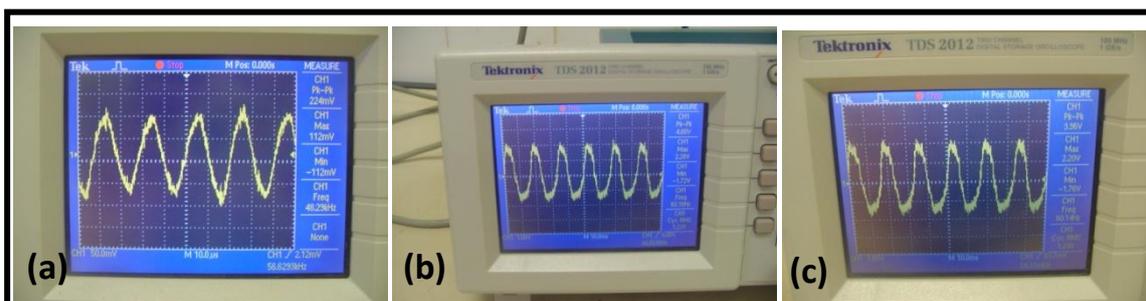


FIG.11: imagem (a) modo/polaridade (-) ; (b) modo/polaridade (+) , (c) modo/polaridade **AUT** – Resist- 133K π e largura do pulso.

ANEXO – C: Protocolo Imunohistoquímica

Sequência: 1º DIA

- ❖ Aquecer as lâminas na estufa (temperatura entre 60º) por 3 horas. Primeiro, espere-se a estufa chegar à temperatura para somente então começar a colocar as lâminas e começar a marcar 3 horas. As lâminas são colocadas separadas no xilol;
- ❖ 3 banhos no xilol à temperatura ambiente (5min cada);
- ❖ 1 vez no álcool 95% (10min cada);
- ❖ Álcool 70% (10min);
- ❖ 3 a 5 lavagens em água corrente, com a última passagem em água destilada;
- ❖ Tampão citrato PH 6.0 – deverá ser aquecido no micro-ondas na potência máxima programado para 18min;
- ❖ O tampão do citrato tem que ser diluído 10x (900 ml de água destilada + 100 ml do tampão citrato concentrado (fica na geladeira);
- ❖ Retira do micro-ondas e deixa esfriar por 20min;
- ❖ Escorre o tampão citrato e adiciona água destilada – lavagem em H²O_d (3min);
- ❖ Bloqueio da peroxidase endógena: peróxido de hidrogênio a 3% - 180 ml de água destilada + 20 ml de água oxigenada 30% (fica na geladeira); 2 banhos de 10min cada;
- ❖ Depois da peroxidase, lava em PBS (3min);
- ❖ Incubação com leite desnatado 10% para bloqueio de ligações inespecíficas. Leite Molico 10g diluído em 100 ml de água destilada. 30 minutos a 37⁰ C, aproveita para diluir com BSA – 120 a 150 ul por lâmina;
- ❖ Antes de aplicar o anticorpo primário, secar as lâminas com o papel de filtro recortados, com cuidado para não tocar nos cortes;
- ❖ Incubação com antigo primário overnight.

Sequência: 2º dia – manhã seguinte:

- ❖ Retira as lâminas da geladeira e espera 10 minutos antes de incubar com o anticorpo secundário;
- ❖ Lavagem em PBS (1min);
- ❖ Secagem das lâminas com papel filtro com os mesmos cuidados recomendados anteriormente e aplicação do anticorpo secundário, em todas as lâminas, incubação com o anticorpo secundário, por 30min;
- ❖ Logo que iniciar a incubação com o anticorpo secundário, deve-se preparar o complexo ABC e deixar descansar por 30 min. Esse passo deve seguir as instruções do fabricante do Kit utilizado;
- ❖ Lavagem em PBS (5min);
- ❖ Incubação com complexo ABC (30min) antes de aplicar o ABC, as lâminas devem ser secas com papel filtro ao redor dos cortes, lembrando que os cortes não devem ficar secos;
- ❖ 3 lavagens em PBS (5min); enquanto isso, prepara o DAB, lembrando de usar luvas. O DAB DEVERÁ SER PROTEGIDO DA LUZ COM PAPEL ALUMÍNIO;
- ❖ Secagem das lâminas para a aplicação do DAB;
- ❖ Coloca as lâminas na água destilada para parar a reação;
- ❖ As lâminas deverão ser monitoradas no microscópio;
- ❖ Contracoloração com hematoxilina de Mayer;
- ❖ Após a contracoloração lava com água corrente até a retirada total do corante;
- ❖ Álcool 95% (2vezes, 10 seg.);
- ❖ Álcool absoluto (3 vezes, 10 seg. cada);
- ❖ Xilol (3 vezes, 10 seg. cada);
- ❖ Montagem das lâminas.

ANEXO-D Declaração do Comitê de Ética

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº105/09, sobre o projeto intitulado: **“EFEITO DO PRECONDICIONAMENTO COM MIX DE ÓLEOS PUFAS E ESTUMULAÇÃO ELÉTRICA DE BAIXA INTENSIDADE NA PELE EM PELE DE RATOS”** de responsabilidade de Maria dos Prazeres Carneiro Cardoso, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Dados Brutos

DADOS BRUTOS IMUNOHISTOQUIMICA

VARIAVEIS DA MARCAÇÃO: AUSÊNCIA=0 ; LEVE=1 ; MODERADA = 2 ; INTENSA = 3

MARCADORES	GRUPOS	Campo1	Campo2	Campo3	Campo4	Campo5	ESPECIFICAÇÕES
	G-1(sh)	61	24	23	17	30	
	G-1(E.E)	17	30	23	24	23	
NFKB	G-2(SH)	104	88	23	75	86	
	G-2(E.E)	198	87	86	103	88	
	G-3(SH)	110	14	80	72	30	
	G-3(E.E)	30	72	14	80	110	
HSP27	G-1(sh)	126	78	109	87	111	
	G-1(E.E)	101	58	66	70	82	
	G-2(sh)	79	115	148	68	72	
	G-2(E.E)	84	73	10	107	10	
	G-3(sh)	107	10	100	72	76	
NITRO	G-1(sh)	90	60	173	128	100	
	G-1(E.E)	81	42	61	23	17	
	G-2(sh)	128	124	98	10	18	
	G-2(E.E)	80	119	101	23	61	
	G-3(sh)	72	120	96	10	24	
	G-3(E.E)	42	88	116	156	153	

