

LUCAS LANGONI CASSETTARI

Efeitos da corrente elétrica contínua e do sulfato de zinco administrado pela iontoforese transdérmica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos induzidos pela aloxana. Análise morfológica e ultraestrutural.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em “Bases Gerais da Cirurgia” – Área de Concentração em Agressão, Reparação, Regeneração e Transplantes de Tecidos e Órgãos, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do título de Doutor

Orientador - Prof. Titular: César Tadeu Spadella

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2014

LUCAS LANGONI CASSETTARI

Efeitos da corrente elétrica contínua e do sulfato de zinco administrado pela iontoforese transdérmica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos induzidos pela aloxana. Análise morfológica e ultraestrutural.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
“Bases Gerais da Cirurgia” – Área de Concentração em
Agressão, Reparação, Regeneração e Transplantes de
Tecidos e Órgãos, da Faculdade de Medicina de Botucatu –
UNESP, para obtenção do título de Doutor

Orientador - Prof. Titular: César Tadeu Spadella

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Cassettari, Lucas Langoni.

Efeitos da corrente elétrica contínua e do sulfato de zinco administrado pela iontoforese transdérmica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos induzidos pela aloxana : análise morfológica e ultraestrutural / Lucas Langoni Cassettari. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: César Tadeu Spadella

Capes: 20604017

1. Cicatrização de feridas. 2. Aloxana. 3. Diabetes. 4. Iontoforese. 5. Estimulação elétrica.

Palavras-chave: Aloxana; Cicatrização de feridas; Diabetes mellitus; Estimulação elétrica; Iontoforese transdérmica.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali? “(Fernando Pessoa)

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho ao meu saudoso pai, Odilon Prado Cassettari, minha mãe, Maria Regina Langoni Cassettari, meu irmão, Vinícius Langoni Cassettari e minha esposa Vanessa Mello Granado Cassettari.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Professor Dr. César Tadeu Spadella**, pela dedicação e oportunidade a mim concedida de iniciar minha carreira acadêmica sob sua orientação, e pelo espírito incansável de pesquisador, o qual diariamente me despertou o desejo de prosseguir.

Ao **Professor Dr. Maurício Ferraz de Arruda** pela incomparável e eterna amizade, dedicação e incentivo em todos os momentos do desenvolvimento do presente trabalho.

À **Professora Dra. Érika Veruska Paiva Ortolan**, pelo incentivo, e incondicional auxílio durante todas as fases de desenvolvimento do trabalho.

À **Professora Dra. Mariângela Esther A. Marques**, pelo apoio e orientação durante a análise histológica, e pelo carisma em receber-nos sempre com entusiasmo.

Ao **Professor Dr. Hélio Langoni** por ter me incentivado e me acompanhado não somente neste trabalho, mas em todas as fases da minha vida.

OUTROS AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão a ***todos*** que, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração deste trabalho. Em especial:

À equipe técnica do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências – UNESP, em especial ao técnico **Tiago dos Santos Tardivo, Lígia Barbosa Castro e Claudete dos Santos Tardivo.**

Ao Corpo Docente do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências – UNESP, em especial à **Professora Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro, Professor Dr. Francisco Eduardo Martinez, Professora Dra. Raquel Fantin Domeniconi, Professor Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa, Professor Dr. Renato Ferretti, Professora Dra. Cintia Yuri Matsumura, e Professor Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior.**

À bióloga ***Amanda Natália Lucchesi***, aluna do curso de Doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela ajuda preciosa na indução do diabetes e na obtenção dos parâmetros clínicos e laboratoriais deste estudo.

Ao Sr. ***Danilo Chaguri***, funcionário do Laboratório de Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pelos serviços prestados e ajuda inestimável na realização das etapas experimentais deste trabalho, bem como nos cuidados dispensados aos animais.

Ao Sr. **Luis Carlos E. Bardella** funcionário do Laboratório de Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pelos serviços prestados e ajuda inestimável na realização dos ensaios biomecânicos das cicatrizes.

Aos ***demais funcionários*** do Laboratório de Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que colaboraram direta e indiretamente na realização das etapas experimentais deste trabalho.

Ao Sr. **José Carlos Georgette**, funcionário do Laboratório Experimental, do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela disponibilização da área física e dispensação dos cuidados necessários para o seguimento de ratos diabéticos em gaiolas metabólicas.

Aos bibliotecários da Biblioteca Central do Campus da UNESP de Botucatu, pela ajuda indispensável na organização das referências bibliográficas deste trabalho e na confecção de sua ficha catalográfica.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial a Sra. **Regina Célia Spadim e Janete Aparecida Herculano**, pela disposição admirável em sempre colaborar na solução de todos os assuntos relativos aos apontamentos das disciplinas, e na realização da defesa pública do meu Exame de Qualificação e Defesa da Tese.

A Sra. **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, pela preciosa colaboração em diversos momentos no decorrer do curso.

ARTIGO ORIGINAL

Efeitos da corrente elétrica contínua e do sulfato de zinco administrado pela iontoforese transdérmica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos induzidos pela aloxana. Análise morfológica e ultraestrutural

Lucas Langoni Cassettari¹, Amanda Natália Lucchesi², Pedro Colli Rocha Dias³, César Tadeu Spadella⁴

¹Mestre em Ciências, Aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, Faculdade Medicina de Botucatu (FM-Botucatu/UNESP), São Paulo, Brasil.

²Mestre em Ciências, Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, FM-Botucatu/UNESP, São Paulo, Brasil.

³Médico-Residente de Dermatologia e Ex-bolsista do Programa CNPq/PIBIC, FM-Botucatu/UNESP, São Paulo, Brasil.

⁴Professor Titular, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, FM-Botucatu/UNESP, São Paulo, Brasil.

Pesquisa financiada pela: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Autor correspondente: César T. Spadella, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina, Campus UNESP, Distrito de Rubião Jr s/nº, CEP: 18618-970 Botucatu, SP, Brasil, telefone: +55(14) 3880-1441; e-mail: spadella@fmb.unesp.br

Resumo

Bases científicas: Um grande número de alterações associadas ao processo de cicatrização das feridas cirúrgicas em indivíduos diabéticos tem sido descrito. Entretanto, os mecanismos exatos responsáveis por estas alterações e como elas estão inter-relacionadas, ainda não são completamente conhecidos. Por conta disto, a busca por um tratamento efetivo, capaz de melhorar a cicatrização das feridas em pacientes com diabetes mellitus continua sendo um campo aberto à pesquisa.

Objetivo: Avaliar os efeitos da corrente elétrica contínua isolada (CEC) e da administração de sulfato de zinco, através da iontoforese transdérmica (ITD+Zn), sobre as alterações morfológicas e ultraestruturais do processo de cicatrização da pele de ratos diabéticos induzidos pela aloxana, e estabelecer a correlação existente entre os baixos valores da força de ruptura encontrados nas incisões destes animais com as alterações histopatológicas observadas.

Material e Métodos: Cento e vinte ratos machos Wistar, pesando aproximadamente 250g, foram submetidos à incisão cirúrgica na parede anterior do abdome e distribuídos, por sorteio, em 6 grupos experimentais, com 20 animais cada um: GN/NT e GD/NT – ratos controles não-diabéticos e diabéticos hiperglicêmicos, induzidos pela aloxana, sem qualquer tratamento das incisões abdominais; GN/CEC e GD/CEC – ratos controles não-diabéticos e diabéticos hiperglicêmicos, induzidos pela aloxana, com incisões tratadas com corrente elétrica contínua; GN/ITD+Zn e GD/ITD+Zn - ratos controles não-diabéticos e diabéticos hiperglicêmicos, induzidos pela aloxana, com incisões tratadas com sulfato de zinco administrado através da iontoforese transdérmica. Cada grupo experimental foi posteriormente dividido em 4 subgrupos, com 5 ratos cada um, para serem avaliados e sacrificados no 4º, 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório (PO). Em cada um destes períodos foram avaliados parâmetros clínicos e laboratoriais dos animais

e colhidos fragmentos representativos das incisões para a análise morfológica e ultraestrutural à microscopia ótica (MO) e eletrônica por varredura (ME), respectivamente.

Resultados: Ratos do GD/NT apresentaram alterações morfológicas significativas do processo de cicatrização da ferida cirúrgica caracterizadas por retardo da contração e reepitelização das bordas epiteliais, aumento da intensidade e prolongamento da fase inflamatória mediada por neutrófilos, bem como retardo da migração de macrófagos e da proliferação de fibroblastos, células endoteliais vasculares e produção de fibras colágenas, quando comparado com ratos controles do GN/NT ou com ratos do GN ou GD, cujas incisões cirúrgicas foram tratadas com CEC ou ITD+Zn. À ME, observou-se que a deposição e organização do colágeno nas cicatrizes da pele também é defeituoso em ratos do GD/NT, sendo constituído por colágeno frouxo e pouco denso, constituído por fibras colágenas imaturas, dispostas desorganizadamente nas cicatrizes, mesmo nas fases mais tardias da cicatrização. Significativa correlação dos baixos valores da força de ruptura com as alterações histopatológicas encontradas também foi observada nas cicatrizes de animais do GD/NT. Por outro lado, observou-se que as alterações encontradas no processo de cicatrização da pele dos animais diabéticos hiperglicêmicos podem ser consistentemente melhoradas com o tratamento das incisões com CEC isolada ou aplicada em associação ao sulfato de zinco (ITD+Zn), tanto na fase inflamatória da cicatrização, como nas fases de proliferação celular, síntese, organização e remodelação do colágeno. Todavia, os benefícios foram mais evidentes com a utilização da ITD+Zn, em todos os períodos de avaliação efetuados.

Conclusões: A estimulação elétrica de feridas cirúrgicas, utilizada isoladamente ou em associação à administração de sulfato de zinco pela ITD, é capaz de melhorar consistentemente as alterações morfológicas e ultraestruturais observadas no processo

de cicatrização de animais diabéticos, mesmo quando o estado hiperglicêmico é mantido. Os benefícios da CEC, no entanto, foram mais evidentes quando a mesma foi utilizada em associação com o sulfato de zinco. Nítida correlação também foi observada entre os baixos valores da força de ruptura encontrados em incisões não-tratadas de animais diabéticos, com as alterações histopatológicas encontradas nas cicatrizes destes animais, tanto nas fases iniciais, com nas fases mais tardias da cicatrização. Nossos resultados sugerem que a diminuição da força de ruptura em incisões de animais diabéticos está muito mais associada às alterações morfológicas e ultraestruturais presentes nas cicatrizes, do que propriamente ao conteúdo de colágeno nelas depositado.

Palavras-Chave: Diabetes Mellitus. Aloxana. Cicatrização de Feridas. Estimulação Elétrica. Iontoforese Transdèrmica. Ratos

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e está associado a altas taxas de morbidade e mortalidade, e elevado custo social e econômico¹⁻³.

Falhas no processo de cicatrização de feridas cirúrgicas em portadores de diabetes têm sido associadas ao elevado risco de complicações pós-operatórias vinculadas, principalmente, a deiscências, fistulas e infecções^{4, 5}.

Estudos realizados em homens e animais mostram que o DM retarda a contração e o fechamento da ferida cirúrgica, diminui a força de ruptura de incisões e anastomoses, e atua negativamente em todas as fases da reparação tecidual, incluindo a inflamação, a migração de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, a proliferação vascular e a síntese, maturação e remodelação do colágeno⁶⁻¹⁰.

Pesquisas de longo prazo têm mostrado que o controle eficaz da hiperglicemia tem importante papel no controle das lesões diabéticas crônicas, podendo, por isto, melhorar as alterações do processo de cicatrização das feridas cirúrgicas^{11, 12}.

Todavia, a relação fisiopatológica entre o diabetes e as alterações da cicatrização é extremamente complexa, pois envolve uma plêiade de anormalidades bioquímicas, vasculares, neuropáticas e imunológicas, cada uma contribuindo isoladamente ou em conjunto, nas diversas fases do processo de reparação tecidual¹³. Por esta razão, a busca por um tratamento efetivo para melhorar a cicatrização das feridas em pacientes diabéticos continua sendo um desafio para os pesquisadores.

São numerosas as terapêuticas testadas em ensaios clínicos e experimentais com o objetivo de melhorar a cicatrização de feridas em hospedeiros normais e diabéticos. Entre elas, destacam-se a administração oral, parenteral ou tópica de substâncias derivadas de extratos herbais, a insulina, o zinco, o cromo¹⁴⁻¹⁸, e também terapêuticas

advindas dos avanços tecnológicos da ciência moderna, como a irradiação por raios laser, as ondas de choque por via extracorpórea, os fatores de crescimento, a pele artificial, a cultura de epitélio, com ou sem componentes da derme e a estimulação elétrica dos tecidos, isolada ou associada à administração de íons solúveis, através da iontoforese transdérmica (ITD)¹⁹⁻²⁵.

Entre as diversas substâncias utilizadas pela ITD, o zinco tem particular interesse neste estudo, pois é parte inerente da insulina, atua no metabolismo glicídico e do colágeno e está intrinsecamente relacionado ao processo de reparação tecidual²⁶. No pós-operatório, os níveis séricos de zinco podem estar diminuídos em homens e animais diabéticos. Esta deficiência pode levar à diminuição da formação do tecido conectivo e à alteração da reparação tecidual¹⁸.

Entretanto, apesar da quantidade de tratamentos disponíveis, os efeitos destas terapêuticas sobre a cicatrização das feridas cirúrgicas ainda são discutíveis ou conflitantes, justificando a busca de novas estratégias dotadas de maior efetividade, baixo custo e maior aplicabilidade clínica, sem impor riscos aos pacientes.

Também são escassos os estudos clínicos e experimentais sobre a cicatrização de feridas cirúrgicas agudas da pele de hospedeiros diabéticos onde o uso da CEC e da ITD associada ao zinco (ITD+Zn) tenha sido testado²⁷⁻²⁹. Estudo recente realizado em nosso laboratório mostrou que ratos diabéticos induzidos pela aloxana apresentaram redução significativa da força de ruptura de cicatrizes cutâneas, principalmente nas fases mais vulneráveis das incisões às deiscências e infecções. Contudo, esta alteração foi completamente revertida com o tratamento tópico das incisões com ITD+Zn, aplicado nas fases iniciais do processo de cicatrização³⁰.

Por outro lado, a despeito dos valores baixos da força de ruptura encontrados nas cicatrizes dos animais diabéticos observou-se que a quantidade de hidroxiprolina (OH-P) presente no tecido não diferiu dos valores encontrados em ratos normais ou

diabéticos tratados com ITD+Zn, em todas as fases do processo de cicatrização. Este achado sugeriu a hipótese de que a queda da força de ruptura em cicatrizes cirúrgicas da pele de animais diabéticos pode estar muito mais relacionada às alterações morfológicas presentes nas fases iniciais da reparação tecidual, e mais tardiamente, ao nível de organização e maturação do colágeno depositado nas cicatrizes, do que propriamente à quantidade desta proteína nos tecidos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da CEC e da ITD+Zn sobre as alterações morfológicas e ultraestruturais do processo de cicatrização da pele de ratos diabéticos induzidos pela aloxana, e estabelecer a correlação existente entre os baixos valores da força de ruptura encontrados nas incisões destes animais com as alterações histopatológicas observadas. Esperamos que os nossos achados possam esclarecer as questões reportadas aqui, e também contribuir para uma melhor abordagem terapêutica das alterações causadas pelo DM no processo de cicatrização das feridas cirúrgicas.

Material e Métodos

Animais e indução do diabetes

Foram utilizados no experimento 120 ratos machos, Wistar, com aproximadamente 250g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus da UNESP de Botucatu. Durante o estudo os ratos foram mantidos no biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FM-Botucatu/UNESP), tendo sido acondicionados em caixas de poliuretano, colocadas em ambiente climatizado à 25° C, com exaustão e iluminação controladas, recebendo diariamente ração balanceada padrão para roedores e água *ad libidum*. O uso de animais neste experimento seguiu o código de ética para animais de experimentação do Conselho da Organização Internacional de Ciências Médicas

(CIOMS), e foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da FM-Botucatu/UNESP.

O diabetes foi induzido pela aloxana (Sigma Co, USA), administrada por via endovenosa, na dose única de 42mg/kg de peso corporal, utilizando uma das veias da cauda do animal. Neste experimento foram utilizados somente ratos com sinais clínicos de diabetes grave e glicemia >250mg/dl, em duas determinações sucessivas, realizadas no 7º e 14º dias após a indução. Animais com diabetes leve ou que não ficaram diabéticos foram excluídos do estudo. Animais diabéticos que foram a óbito no período pós-indução ou no seguimento foram repostos para não comprometer o número final de ratos da amostra.

Grupos experimentais e momentos de avaliação

Os animais foram distribuídos por sorteio em 6 grupos experimentais, com 20 animais cada um, assim designados: GN/NT- Grupo controle não-diabético, constituído de ratos normais, sem qualquer tratamento da cicatriz cirúrgica do abdome; GD/NT – Grupo diabético, constituído de ratos diabéticos, hiperglicêmicos, sem qualquer tratamento da cicatriz cirúrgica do abdome; GN/CEC – Grupo não-diabético, com cicatriz cirúrgica tratada com corrente elétrica contínua; GD/CEC – Grupo diabético, hiperglicêmico, com cicatriz cirúrgica tratada com CEC; GN/ITD+Zn – Grupo não-diabético, com cicatriz cirúrgica tratada com sulfato de zinco, administrado pela iontoforese transdérmica; GD/ITD+Zn- Grupo diabético, hiperglicêmico, com cicatriz cirúrgica tratada com sulfato de zinco, administrado pela ITD + Zn.

Cada grupo experimental foi posteriormente dividido em 4 subgrupos de ratos, com 5 animais cada, para serem avaliados e sacrificados, respectivamente, em 4 diferentes períodos após a realização da incisão cirúrgica abdominal, correspondendo ao 4º, 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório (PO)(Figura 1). Animais que foram a óbito no PO

imediate e tardio foram repostos para não comprometer o tamanho da amostra.

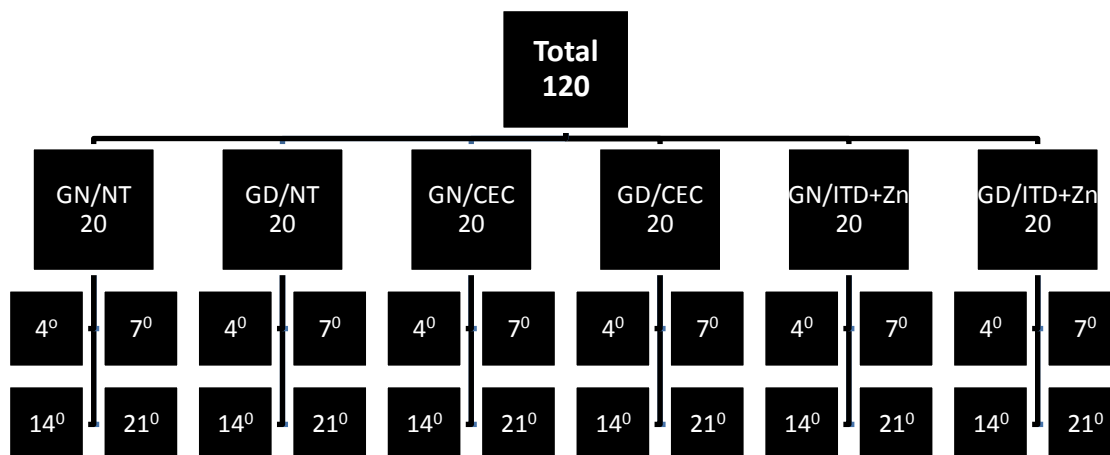


Figura 1 - Diagrama representativo da distribuição dos animais nos seus respectivos grupos e subgrupos.

Parâmetros analisados

No início do experimento (14º dia de seguimento ou de indução do diabetes) e em cada período previamente definido de PO, parâmetros clínicos (peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese) e laboratoriais (glicose sangüínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada e insulina plasmática) foram obtidos de todos os animais, antes do sacrifício. Para obtenção de parâmetros clínicos foram utilizadas gaiolas metabólicas individuais. A glicose sangüínea e urinária foram determinadas pelo método enzimático padrão (Johnson & Johnson, USA)), a hemoglobina glicosilada pela eletroforese com gel de agarose (Sebia, France) e a insulina por radioimunoensaio (Diagnostic Products Corporation, USA).

Após o sacrifício dos animais, um segmento de pele, contendo toda a extensão da incisão, foi removido de cada rato e dividido em três partes iguais, sendo uma parte utilizada para a medida da força de ruptura e dosagem de OH-P tecidual (estudo prévio com os mesmos animais³¹) e as outras duas partes utilizadas, respectivamente, para o

estudo histopatológico à microscopia ótica (MO) e para a análise microscópica eletrônica por varredura (ME).

Técnicas utilizadas

Anestesia

Todos os procedimentos invasivos realizados nos animais, incluindo a diérese e síntese da incisão cirúrgica abdominal, a implantação dos eletrodos, o tratamento pela CEC ou ITD + Zn, bem como a secção da cauda para a coleta de sangue para as dosagens bioquímicas, no 14º dia de seguimento e no sacrifício, foram realizados sob o efeito de anestesia geral com ketamina (1ml/kg de peso corporal) + xilazina (0,5ml/kg de peso corporal), administrados por via intramuscular.

Produção da ferida cirúrgica abdominal

A ferida cirúrgica foi obtida com os animais em jejum de 12h, no 15º dia de seguimento normal ou de indução do diabetes. Após anestesia geral, os animais foram submetidos à tricotomia e anti-sepsia do abdome com álcool iodado a 2%, sendo, então, realizada incisão cirúrgica mediana, médio-umbilical, de 4 cm de extensão, interessando a pele e o subcutâneo da região anterior do abdome. Imediatamente após a realização da incisão foi realizada hemostasia por compressão, seguida da síntese da ferida, em plano único, em pontos separados, com fio monofilamentar de nylon 4-0, utilizando agulha curva, 3/8 de círculo, com 1,5cm de comprimento (Ethicon Inc.,USA). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições estéreis, tendo sido administrada no intra-operatório cefazolidina, em dose única profilática de 50mg/kg de peso corporal. No primeiro dia de PO, foi feita analgesia dos animais com dipirona, administrada por via intramuscular, na dose de 100mg/kg de peso corporal, 2 vezes ao dia. Eventuais complicações infecciosas da ferida operatória foram tratadas por meio de drenagem de secreções e curativos locais com solução anti-séptica de povidine.

Implantação dos eletrodos para o tratamento com CEC e ITD+Zn

Para a realização do tratamento com CEC isolada ou administração de sulfato de zinco, através da ITD, dois eletrodos foram implantados temporariamente na pele de cada animal, sendo o primeiro posicionado próximo ao ângulo inferior da incisão abdominal e o segundo na região dorsal interescapular. Ambos os eletrodos foram conectados a um eletro-estimulador de corrente contínua (IBRAMED, São Paulo), sendo o eletrodo abdominal conectado ao ânodo (positivo) e o da região dorsal ao cátodo (negativo) do equipamento. A amplitude da corrente elétrica emitida foi padronizada em 2mA, sendo os animais submetidos a sessões de tratamento com duração de 10 minutos. Cada sessão foi realizada em quatro momentos distintos do PO, sendo o primeiro imediatamente após a realização da síntese da incisão cirúrgica (PO imediato) e os demais, nos três dias subseqüentes (1º, 2º e 3º PO).

Conforme o tratamento proposto para cada grupo experimental, entre o eletrodo posicionado na base da incisão abdominal e a pele foi colocada uma compressa de gaze umedecida com 4 ml de água destilada (animais do GN/CEC e GD/CEC) ou com igual quantidade de sulfato de zinco, solubilizado em água destilada, na concentração de 100mg/kg de peso corporal (animais do GN/ITD+Zn e GD/ITD+Zn). A Fig. 2 ilustra a preparação dos animais para serem submetidos ao tratamento pela CEC e ITD+Zn.



Figura 2 - Ilustração do preparo dos animais para o tratamento das incisões com CEC e ITD+Zn. Em **A**, detalhe do animal com os eletrodos fixados na região anterior do abdome e na região dorsal (setas) para o início do tratamento; em **B**, animais durante o tratamento eletroterápico.

Análise morfológica à microscopia ótica

Para o estudo morfológico à MO, os segmentos de pele contendo a incisão cirúrgica foram cuidadosamente dissecados e separados do plano músculo-aponeurótico. A seguir, os mesmos foram estirados e fixados sobre uma placa de isopor, com a face dérmica voltada para cima, e então, pré-fixados em solução de formol tamponado a 10%, por um período de 24 horas. Após este período, os fios de sutura remanescentes foram retirados da incisão, e a pele seccionada perpendicularmente à linha de sutura (cortes transversais), com obtenção de fragmentos cilíndricos, com 10 mm de comprimento por 2 mm de largura. Estes fragmentos obtidos continham a linha cicatricial dermo/epidérmica, no centro, e o tecido conectivo adjacente à incisão, em ambas as laterais. Recolocados em frascos contendo formol tamponado a 10%, os fragmentos foram posteriormente embebidos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 6µm de espessura e corados pela hematoxilina & eosina (HE).

Cicatrizes cirúrgicas de todos os 5 animais de cada subgrupo de ratos, sacrificados com 4, 7, 14 e 21 dias de PO, foram submetidas à análise morfológica, totalizando 20 animais analisados/grupo experimental.

Todas as lâminas foram examinadas ao microscópio de luz, em estudo duplo-cego, por dois examinadores diferentes, sem o conhecimento prévio do grupo experimental ao qual o animal pertencia. Todas as análises foram supervisionadas por um patologista experiente.

As análises histológicas foram feitas pelo método qualitativo, baseadas nos graus de cicatrização descritos por Greenhalgh et al.²¹ e adaptados aos objetivos do estudo. A análise teve por interesse os seguintes parâmetros: contração e fechamento histológico da lesão produzida; grau de reparação das bordas epiteliais; presença, característica e intensidade do processo inflamatório; presença e intensidade do processo de vascularização e neoformação vascular e características do colágeno presente nas cicatrizes.

Análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura

Para o estudo à ME por varredura, os segmentos de pele contendo a incisão cirúrgica foram preparados conforme técnica descrita anteriormente, sendo pré-fixados em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato, pH 7,3, por um período inicial de 24h. A seguir, os segmentos de pele foram seccionados em fragmentos cilíndricos de 5 mm de comprimento por 1 mm de espessura e mantidos em glutaraldeído 2,5%, por um período de 7 a 15 dias. A seguir, os fragmentos de tecido foram submetidos à digestão em NaOH 10%, durante um período de 4 a 7 dias, visando a separação das fibras colágenas do tecido adjacente. Após a digestão, as seguintes etapas foram utilizadas no processamento do tecido: lavagens sequenciais dos fragmentos em água destilada, pós-fixação em tetróxido de ósmio 0,5%, desidratação em série crescente de etanol (7,5% a

100%), secagem dos fragmentos em aparelho de ponto crítico Balzers CPD-020, utilizando o dióxido de carbono líquido, montagem das amostras em suportes apropriados e cobertura das amostras com 10nm de ouro em metalizador MED-010 da Balzers.

Cicatrizes cirúrgicas de 3 animais, escolhidos por sorteio, foram examinadas à ME em cada subgrupo de ratos, sacrificados com 4, 7, 14 e 21 dias de PO, totalizando 12 animais analisados/grupo experimental. De cada animal, um bloco de tecido foi preparado e seccionado em cortes ultrafinos, tendo sido examinado através de um microscópio eletrônico de varredura QUANTA 200 da Fei Company, sob tensão de 15 kv, utilizando aumentos que variaram de 50 a 3000 vezes. Dez eletromicrografias de varredura foram obtidas de cada bloco, totalizando 30 imagens analisadas em cada subgrupo experimental ou 120 imagens por cada grupo experimental.

As análises ultra-estruturais foram feitas pelo método qualitativo, tendo por interesse a arquitetura e o grau de maturação e organização do colágeno depositado nas cicatrizes cirúrgicas.

Sacrifício

Os animais foram sacrificados sob anestesia geral, com morte por hipovolemia decorrente de exsanguinação total, realizada por punção cardíaca com o tórax aberto.

Análise estatística

O estudo das variáveis clínicas (peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese) e bioquímicas (glicose sanguínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada e insulina plasmática), segundo os 6 grupos experimentais e os 4 momentos de sacrifício, foi realizado através da análise de variância para o esquema fatorial 4x4, no delineamento inteiramente casualizado, complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey, ou pela análise não-paramétrica de Mann-Whitney e Kruskal-

Wallis, para as variáveis que tiverem resultados com distribuição heterogênea. Todas as discussões estatísticas foram realizadas no nível de significância de 5% ou $P < 0,05$.

Resultados

Achados clínicos e laboratoriais

Aproximadamente 16% do lote inicial de animais que receberam aloxana foram a óbito nos primeiros 14 dias após a indução do diabetes, em decorrência de distúrbios metabólicos e/ou dos efeitos tóxicos da droga. Cerca de 22% dos animais que receberam aloxana foram refratários à droga, não tendo desenvolvido diabetes, ou a apresentaram na forma leve ou moderada, tendo sido excluídos do estudo.

Dos animais colocados em seguimento nos grupos diabéticos, 4 animais apresentaram infecção/deiscência da incisão cirúrgica; 7 animais morreram no pós-operatório imediato da cirurgia de obtenção da ferida cirúrgica em decorrência do trauma anestésico - cirúrgico; 3 animais morreram no seguimento tardio, até 21 dias, em decorrência de pneumonia. Não houve complicações ou óbitos nos animais dos grupos controles não-diabéticos.

Ratos não-diabéticos (GN/NT, GN/CEC e GN/ITD+Zn) apresentaram parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com os observados em animais normais de mesma linhagem, em todos os períodos de avaliação do experimento. Em contraste, ratos diabéticos (GD/NT, GD/CEC e GD/ITD+Zn), sem qualquer tratamento da hiperglicemia, evoluíram com perda acentuada de peso corporal e aumento significativo da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, quando comparados com animais normais, não-diabéticos ($P < 0,001$). Os níveis de glicose sanguínea, glicose urinária e hemoglobina glicosilada também foram persistentemente elevados em ratos dos grupos diabéticos, sendo os valores plasmáticos da insulina significantemente baixos (Figs. 3 e 4)

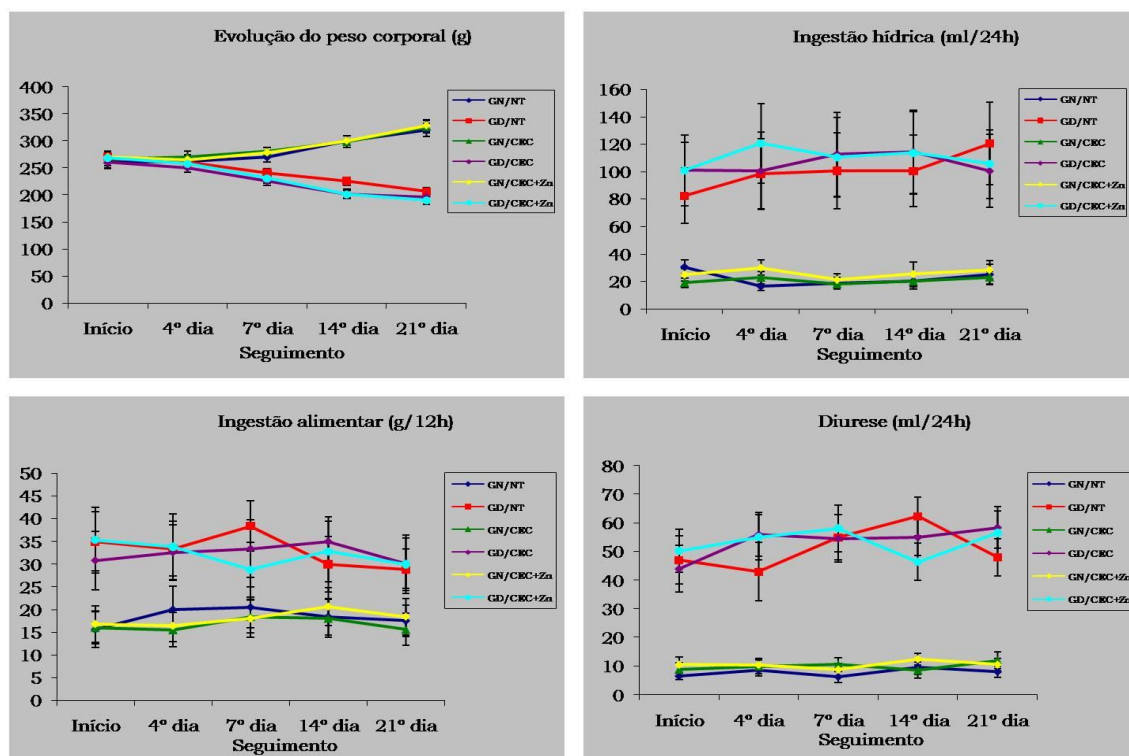


Figura 3 – Evolução do peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese em animais dos 6 grupos experimentais durante o seguimento

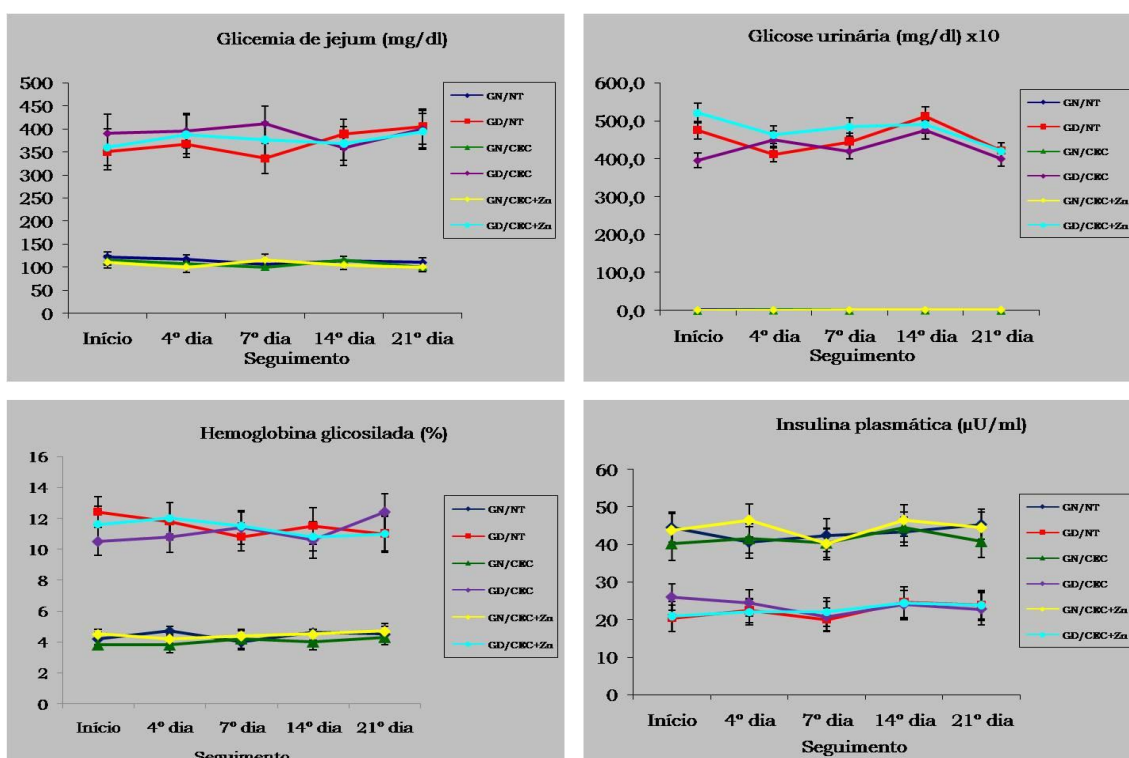


Figura 4 – Evolução da glicose sanguínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada e insulina plasmática em animais dos 6 grupos experimentais durante o seguimento.

Achados morfológicos à microscopia ótica

a) Contração da ferida cirúrgica e reepitelização da superfície epitelial

Feridas cirúrgicas de ratos diabéticos hiperglicêmicos, sem qualquer tratamento da incisão abdominal (GD/NT) apresentaram bordas completamente afastadas, no 4º dia de PO. A reepitelização da superfície epitelial também estava ausente nas cicatrizes dos animais deste grupo, no 4º e 7º dia de PO. Moderada contração da ferida cirúrgica foi observada em animais diabéticos tratados com corrente elétrica contínua isolada (GD/CEC) no 4º dia de PO, sendo a reepitelização da superfície epitelial ainda ausente neste período de avaliação, mas quase que completa no 7º PO. Por outro lado, tanto a contração da ferida cirúrgica como a reepitelização da superfície epitelial quase que se completaram em ratos diabéticos, cujas incisões cirúrgicas foram tratadas com sulfato de zinco, administrado através da iontoforese transdérmica (GD/ITD+Zn), já no 4º dia de PO.

Observou-se, também, que o processo de contração da ferida cirúrgica e reepitelização da superfície epitelial foram mais acelerados em ratos normais não-diabéticos (GN), principalmente nos grupos tratados com CEC e com ITD+Zn. Neste último grupo, as bordas epiteliais já se encontravam quase que completamente reepitelizadas no 4º dia de PO. Não houve diferenças morfológicas entre os 6 grupos experimentais, a partir do 14º dia de PO, em relação aos parâmetros anteriormente citados. A Fig. 5 ilustra os achados encontrados.

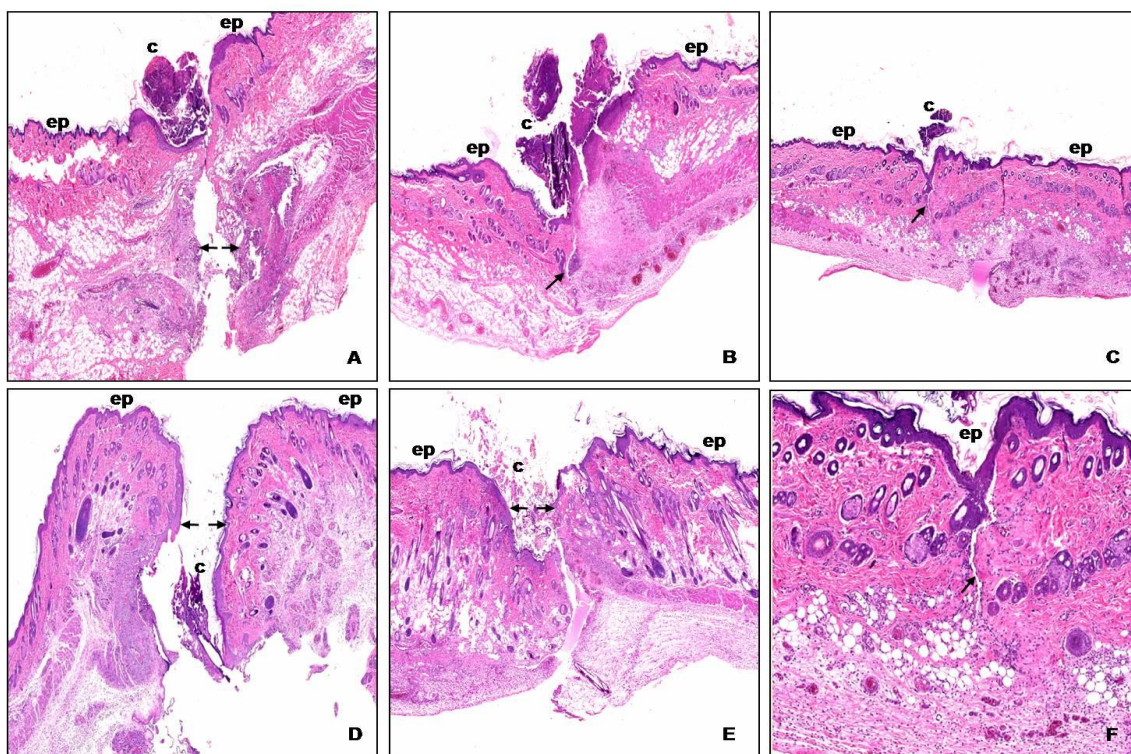


Figura 5 – Achados morfológicos observados em ratos normais, não-diabéticos (A, B, C) e diabéticos hiperglicêmicos (D, E, F), sem tratamento, ou com incisões tratadas com CEC e ITD+Zn, no 4º dia de PO, respectivamente. Observe a crosta fibrino-leucocitária (c) e a quase que completa contração das bordas cirúrgicas (setas) e avançada reepitelização da superfície epitelial (ep) em animais diabéticos tratados com ITD+Zn, quando comparado com ratos diabéticos com incisões não-tratadas ou tratadas com CEC isolada (H&E 20x).

b) Processo inflamatório e proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares

No 4º dia de PO, feridas cirúrgicas de ratos do GD/NT apresentaram intenso infiltrado inflamatório, predominantemente constituído por neutrófilos, tendo este processo se prolongado até o 7º dia de PO, com as mesmas características. Neste PO, escassa proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares foi observada (Fig.6). Em contraste, no 4º PO, feridas cirúrgicas de ratos do GN/NT ou GN ou GD, tratadas com CEC ou ITD+Zn, apresentaram infiltrado inflamatório de intensidade moderada, predominantemente constituído por macrófagos, que foi substituído, no 7º

PO, por tecido de granulação composto por fibroblastos, proliferação endotelial vascular e deposição de fibras colágenas (Fig. 7). Achados morfológicos da fase inflamatória em ratos diabéticos tratados com CEC ou ITD+Zn não diferiram entre si à MO e foram compatíveis com os encontrados em ratos do GN não tratados ou tratados com ambas as terapêuticas.

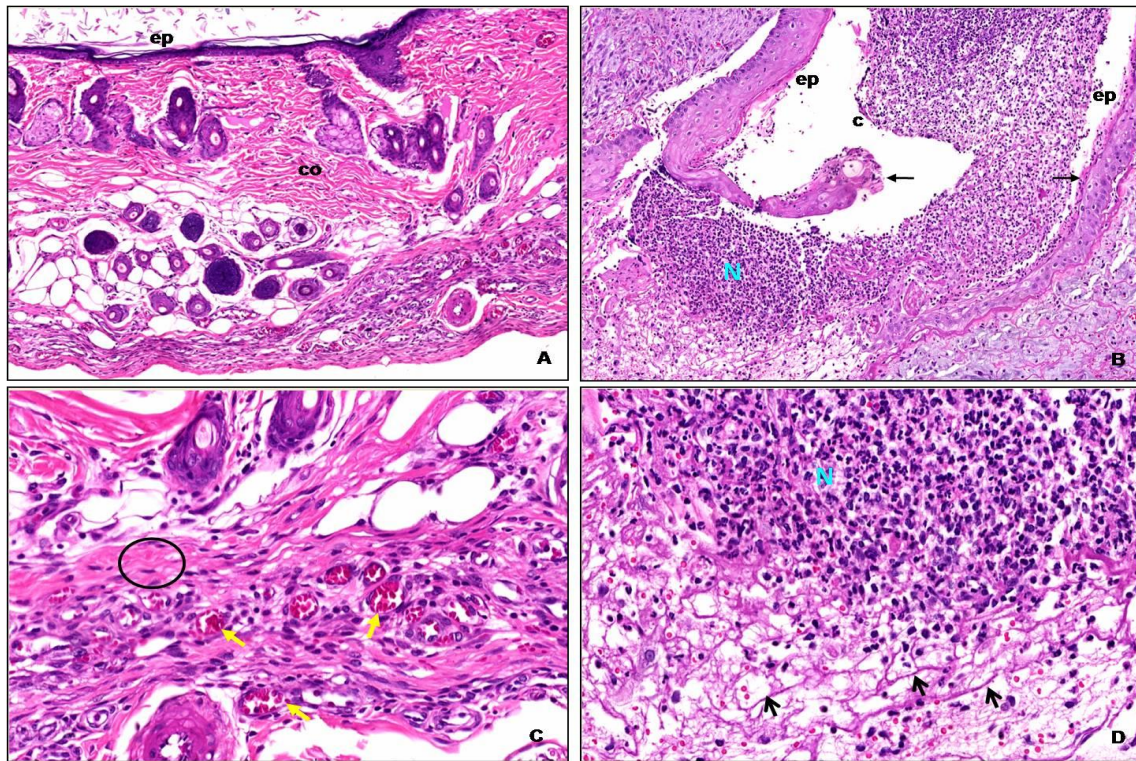


Figura 6 – Achados morfológicos observados em ratos normais, não-diabéticos (A, C) e diabéticos hiperglicêmicos (B, D), com incisões não-tratadas, no 7º dia de PO. Observe a ausência de reepitelização da superfície epitelial (ep) em animais diabéticos, com intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear (N) e discreta proliferação de fibras colágenas (setas pretas), quando comparado com ratos normais, cuja superfície epitelial está completamente formada, com síntese de colágeno denso (co/círculo) e intensa proliferação neovascular (setas amarelas) (H&E 100x e 300x).

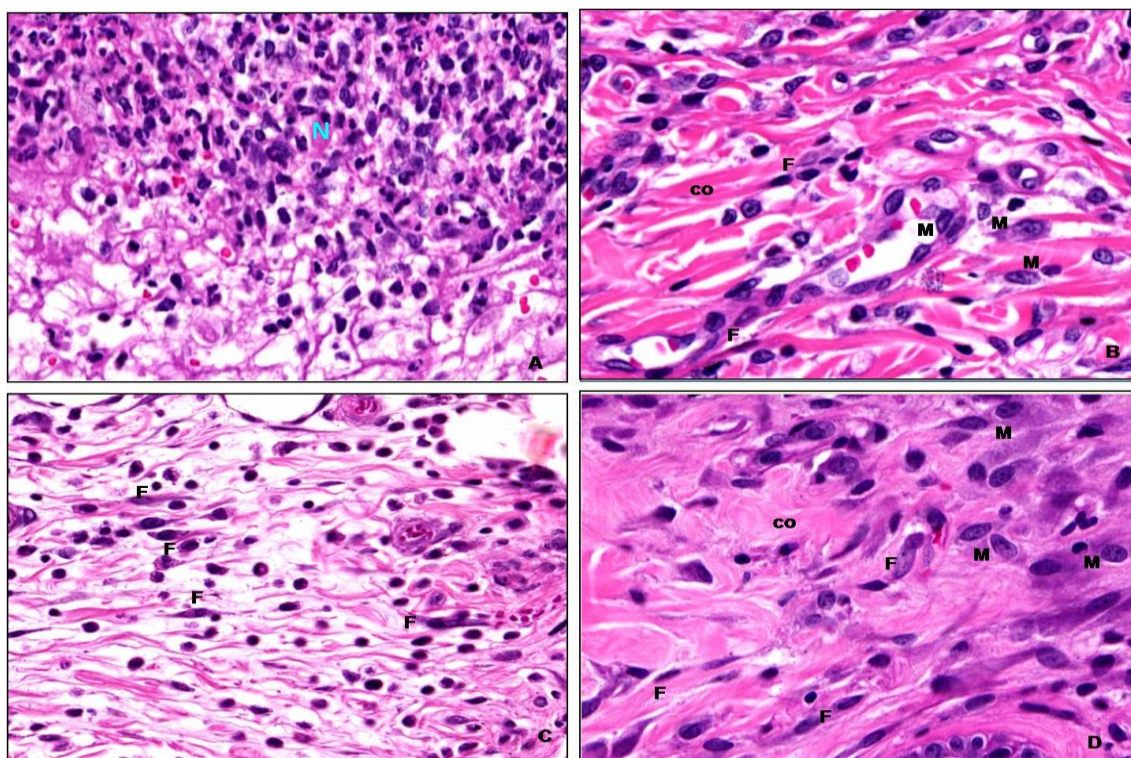


Figura 7 – Achados morfológicos observados em ratos diabéticos hiperglicêmicos (A, C, D), com incisões não-tratadas ou tratadas com CEC e ITD+Zn, respectivamente, no 7º dia de PO, quando comparados com ratos normais, não-diabéticos (B), cujas incisões não receberam tratamento. Observe a melhora significativa do processo inflamatório neutrofílico (N) em animais diabéticos tratados com CEC isolada (C) e ITD+Zn (D), o qual foi substituído por macrófagos (m) e fibroblastos (F). Note que a produção de colágeno (co) é mais densa em animais diabéticos tratados com ITD+Zn, mesmo quando comparada ao observado em animais normais, com incisões não-tratadas (H&E 400x)

c) Deposição e organização de fibras colágenas

Proliferação de fibroblastos e formação de fibras colágenas foi escassa em animais do GD/NT até o 7º dia de PO. Deposição de colágeno frouxo, com disposição desorganizada das fibras, abaixo da superfície epitelial, foi observada neste grupo somente a partir do 14º dia de PO. Em contraste, ratos do GN ou GD, tratados com CEC ou ITD+Zn, apresentaram progressiva deposição de fibras colágenas nas cicatrizes, já a partir do 4º dia de PO. Colágeno denso, disposto horizontalmente abaixo da superfície

epitelial foi observado nestes grupos a partir do 7º dia de PO. Diferenças qualitativas e organizacionais na estrutura morfológica do colágeno depositado nas cicatrizes de ratos diabéticos, cujas incisões foram tratadas com CEC e ITD+Zn, quando comparado com ratos onde as incisões não foram tratadas foram evidentes. Todavia, à MO, não possível atribuir vantagem de uma terapêutica sobre a outra, em relação a esta variável morfológica. As Figs. 8 e 9 ilustram os achados relatados.

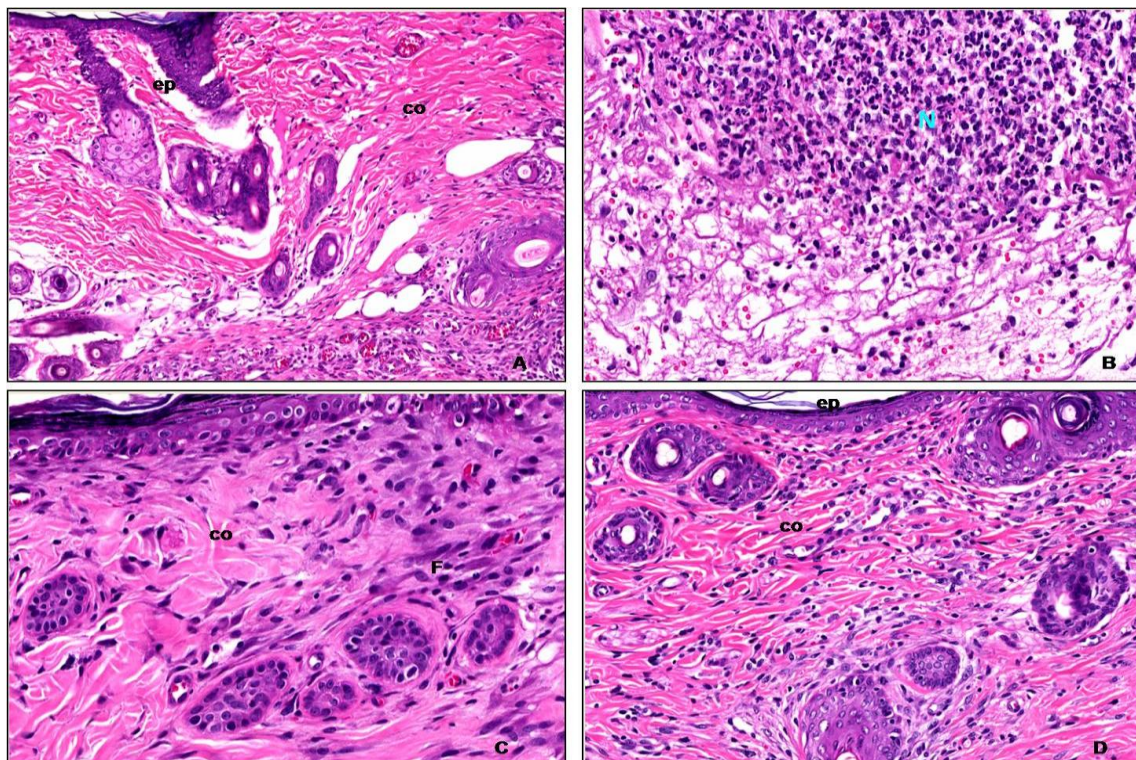


Figura 8 – Achados morfológicos observados em ratos normais, não-diabéticos, com incisões não-tratadas (A) e em diabéticos hiperglicêmicos (B, C, D), respectivamente com incisões não-tratadas ou tratadas com CEC isolada ou ITD+Zn, no 7º dia de PO. Observe a progressiva deposição de colágeno denso (co), disposto horizontalmente abaixo da superfície epitelial (ep) em animais normais não-tratados (A) ou diabéticos, com incisões tratadas com CEC isolada (C) ou ITD+ZN (D), quando comparado com ratos diabéticos, com incisões não-tratadas (B), onde a produção de colágeno é praticamente inexistente. Note a existência, ainda, de grande infiltrado inflamatório polimorfonuclear nos animais diabéticos não-tratados deste grupo (N) (H&E 100x e 300x).

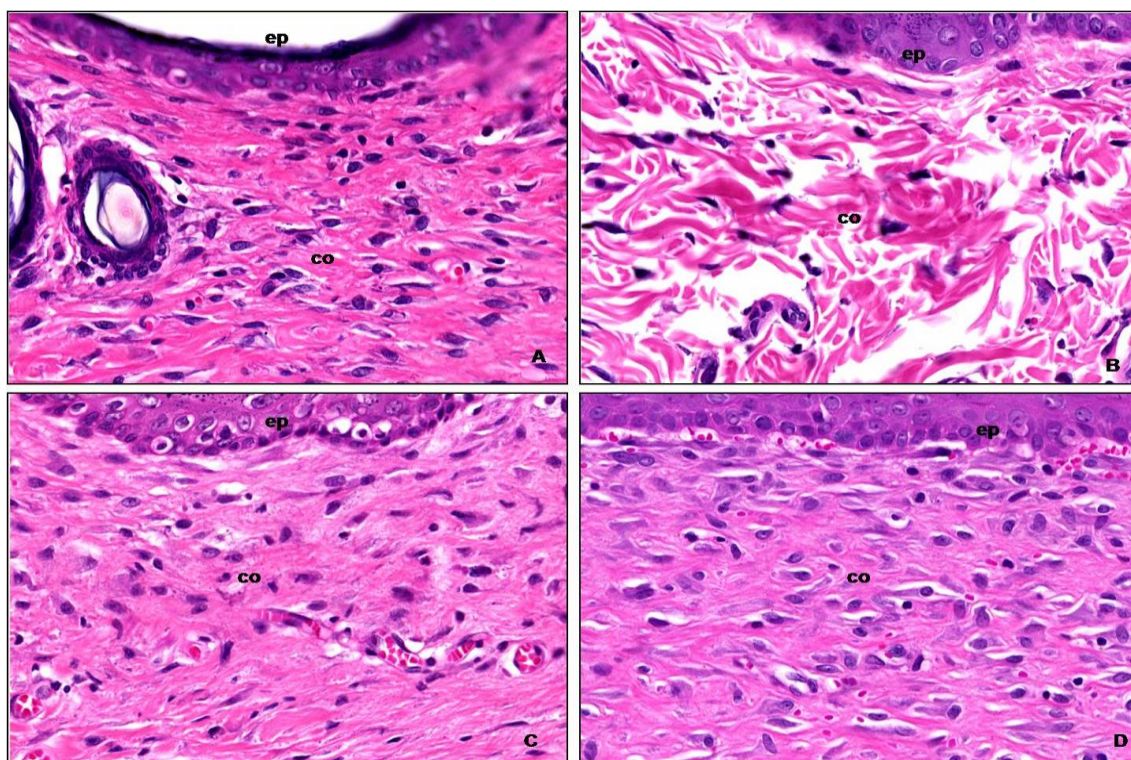


Figura 9 – Achados morfológicos observados em ratos normais, não-diabéticos, com incisões não-tratadas (A) e em diabéticos hiperglicêmicos, com incisões não-tratadas (B) ou tratadas com CEC (C) ou ITD+Zn (D), no 14º dia de PO. Observe a deposição de colágeno frouxo (co), com disposição desorganizada das fibras, abaixo da superfície epitelial (ep), em animais diabéticos, cujas incisões não foram tratadas (B), quando comparada à observada em ratos do GN/NT, GD/CEC e GD/ITD+Zn, onde o colágeno é denso e horizontalmente organizado (H& 400x).

Achados ultraestruturais à microscopia eletrônica por varredura

A análise ultraestrutural do colágeno depositado nas cicatrizes cirúrgicas de animais pertencentes aos 6 grupos experimentais não foi possível de ser realizada no 4º dia de PO, em virtude da fragilidade dos espécimes e o seu conseqüente rompimento durante o processo de digestão química do tecido.

No 7º PO, porém, observou-se que ratos do GD, com incisões cirúrgicas não-tratadas (GD/NT), apresentaram retardo da epitelização das bordas incisionais quando comparado com ratos controles não-diabéticos (GN/NT), onde o processo de reepitelização, ainda que incompleto, encontrava-se em estágio mais avançado. Por

outro lado, epitelização completa ou quase que completa foi observada, respectivamente, em ratos do GN e GD, neste período de avaliação, quando as incisões foram tratadas com CEC isolada ou com ITD+Zn (Fig. 10).

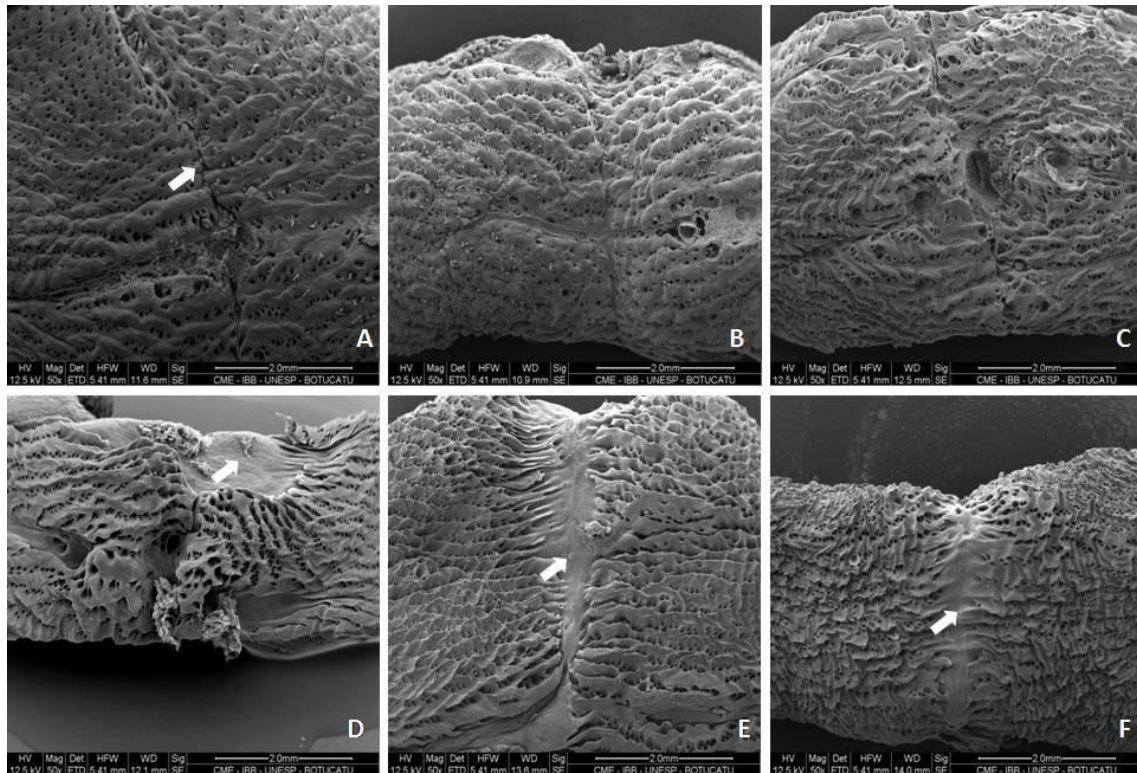


Figura 10 – Fotomicrografias de cicatrizes cirúrgicas da pele de ratos normais (A, B, C) e diabéticos (D, E, F), sacrificados no 7º PO, mostrando avançado processo de reepitelização das bordas epiteliais (setas) em ratos do GN/NT (A) quando comparado com ratos do GD/NT (D). Observe melhora significativa da reepitelização da ferida cirúrgica (setas) em ratos do GD com incisões tratadas com CEC isolada e ITD+Zn (E, F). A reepitelização é completa, porém, em incisões do GN (B, C), para ambos os tratamentos (ME - 50x).

Todavia, o colágeno depositado nas cicatrizes tratadas com CEC isolada, em ratos dos grupos GN e GD mostrou-se caracteristicamente de padrão fino e desorganizado, ainda apresentando múltiplas fenestrações entre as fibras de colágeno, em contraste à deposição de colágeno denso, com poucas fenestrações, observada no 7º PO de cicatrizes tratadas com ITD+Zn, tanto em ratos do GN, como do GD. Observou-

se, porém, que a deposição das fibras colágenas foi mais expressiva em animais normais, quando comparada aos diabéticos (Fig. 11).

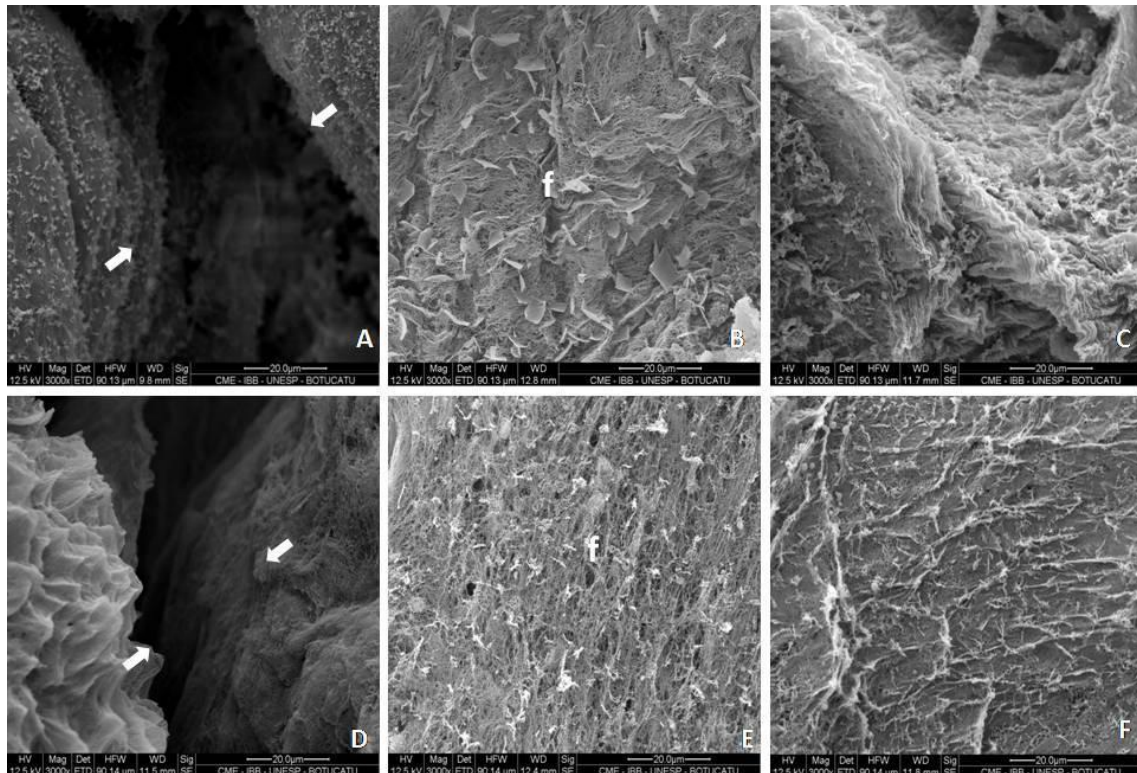


Figura 11 - Fotomicrografias de cicatrizes cirúrgicas da pele de ratos normais (A, B, C) e diabéticos (D, E, F), sacrificados no 7º PO. Observe que o processo de reepitelização das bordas incisionais ainda é incompleto (setas) em ratos do GN/NT e GD/NT, no maior aumento (A, D). Note a deposição desorganizada de colágeno fino, com múltiplas fenestrações (f) em ratos GN e GD, com incisões tratadas com CEC isolada (B, E), quando comparada com a deposição de colágeno denso, com poucas fenestrações, observada em rato GN e GD, com incisões tratadas com ITD+Zn (C, F) (ME – 3000x).

Por outro lado, nítida diferença ultraestrutural das cicatrizes cirúrgicas entre animais normais e diabéticos foi observada a partir do 14º dia de PO, onde ratos do GN, com incisões não-tratadas ou tratadas com CEC isolada ou ITD+Zn, apresentaram bordas epiteliais da ferida cirúrgica completamente epitelizadas e organizadas, com linhas cicatriciais praticamente invisíveis, em permeio a inúmeros orifícios de brotamento piloso, em contraste ao observado em animais do GD, com incisões não-

tratadas ou tratadas com CEC isolada, onde a linha cicatricial ainda se mostra alargada, sem a presença maciça dos orifícios dos folículos pilosos emergindo na superfície da epiderme. Em contraste, porém, observou-se que o padrão ultraestrutural das cicatrizes de ratos do GD, tratadas com ITD+Zn, foi o mesmo encontrado em animais controles normais, com incisões não-tratadas ou tratadas com CEC isolada ou com ITD+Zn (Fig. 12).

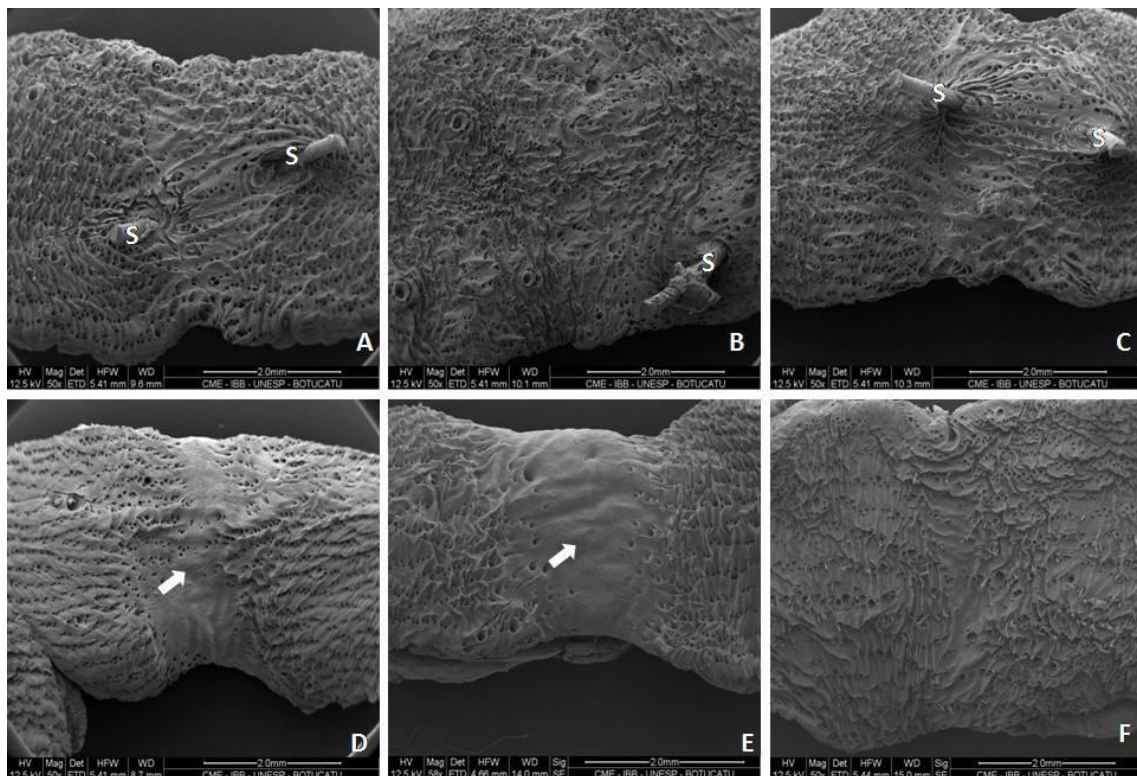


Figura 12 - Fotomicrografias de cicatrizes cirúrgicas da pele de ratos normais (A, B, C) e diabéticos (D, E, F), sacrificados no 14^o PO. Observe bordas cirúrgicas completamente epitelizadas, com inúmeros orifícios pilosos e alguns fios de sutura remanescentes (s) em ratos do GN, com incisões não-tratadas (A) ou tratadas com CEC isolada ou ITD+Zn (B, C), quando comparadas com linhas cicatriciais ainda alargadas (setas), sem orifícios pilosos, observadas em ratos do GD/NT ou GD/CEC (D, E). Note, porém, que cicatrizes de ratos do GD tratadas com ITD+Zn (F) apresentam padrão ultraestrutural similar ao observado em ratos normais, tratados ou não tratados (ME – 50x).

No 14º PO, observou-se também que animais saudáveis, com incisões não-tratadas ou tratadas com CEC isolada ou ITD+Zn, apresentaram deposição de colágeno nitidamente denso, mais espesso, ondulado e uniformemente distribuído ao longo da superfície epitelial, quando comparado com animais do GD/NT ou GD/CEC, onde houve a deposição de fibras colágenas mais finas, desorganizadas, ainda apresentando fenestrações entre elas. Por outro lado, em ratos do GD/ITD+Zn observou-se um padrão organizacional das fibras colágenas superior aquele observado em ratos do GD não-tratados ou tratados com CEC isolada, porém, o calibre das fibras colágenas nestes animais foi menor que o observado em animais controles saudáveis tratados ou não tratados (Fig. 13).

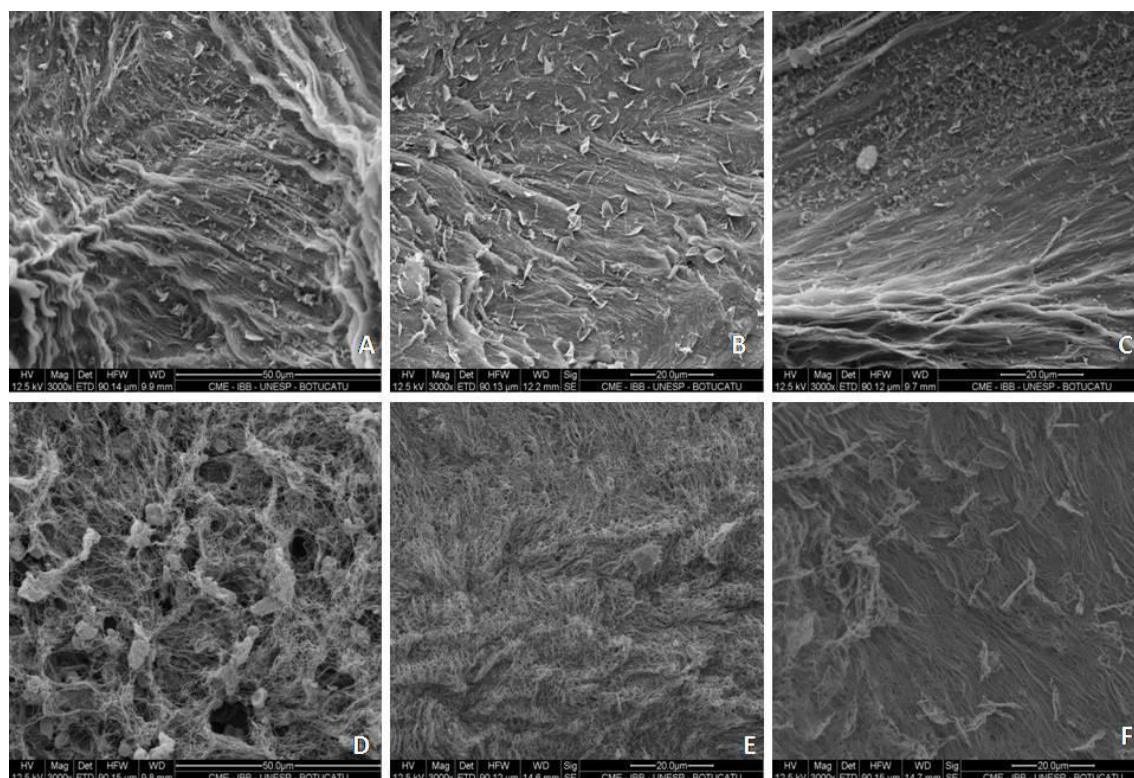


Figura 13 - Fotomicrografias de cicatrizes cirúrgicas da pele de ratos normais (A, B, C) e diabéticos (D, E, F), sacrificados no 14º PO. Observe a deposição de colágeno ondulado, denso e espesso, uniformemente distribuído ao longo da superfície epitelial, em ratos não-tratados (A) ou tratados com CEC isolada ou ITD+Zn (B, C), quando comparada à deposição desorganizada de fibras colágenas mais finas, com fenestrações,

em ratos do GD/NT ou GD/CEC (D, E). Note melhor organização do colágeno em incisões de ratos do GD, tratadas com ITD+Zn (F) (ME – 3000x).

Com 21 dias de seguimento, não foram observadas diferenças ultraestruturais significantes entre as incisões de animais normais e diabéticos, tanto nos grupos não-tratados, como naqueles tratados com CEC isolada ou com ITD+Zn, quando as análises foram efetuadas em menor aumento (Fig. 14).

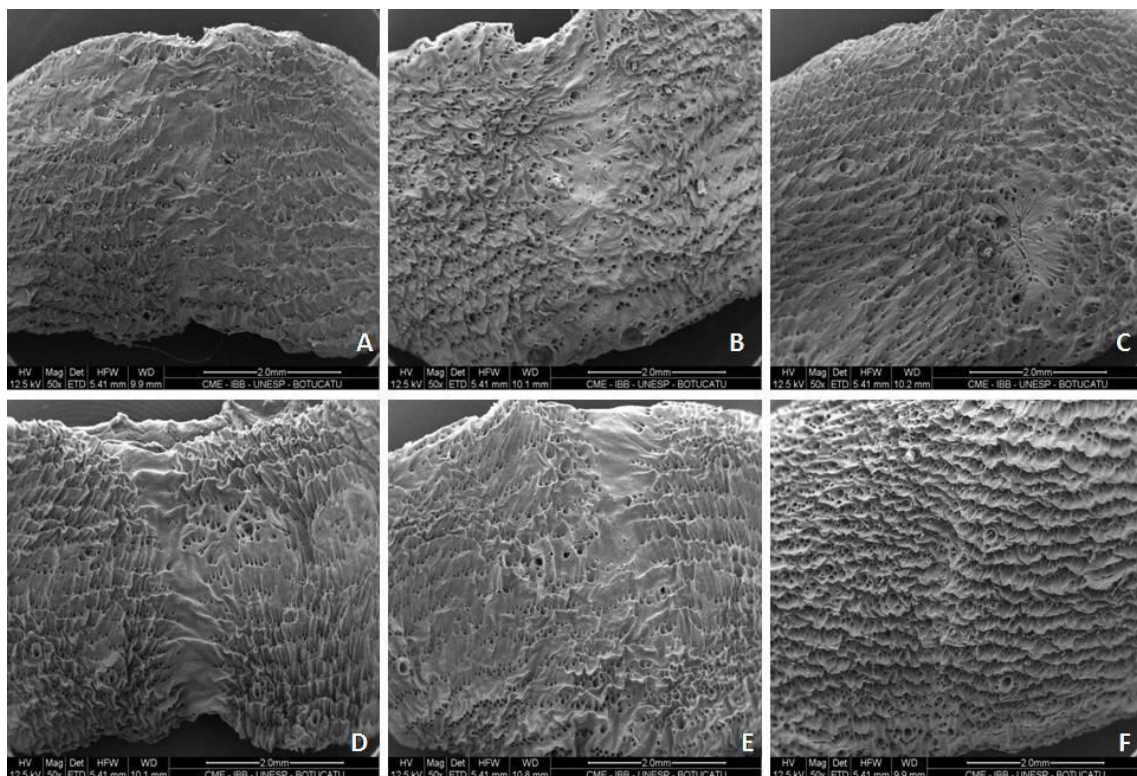


Figura 14 – Visão panorâmica em menor aumento de cicatrizes cirúrgicas da pele de ratos normais (A, B, C) e diabéticos (D, E, F), sacrificados no 21º PO, onde não se observa diferenças ultraestruturais significativas na superfície epitelial, independentemente de as incisões terem sido tratadas ou não-tratadas. Em A e D, animais não-tratados; em B e E, tratados com CEC isolada e em C e F, tratados com ITD+Zn (ME – 50x).

Todavia, fotomicrografias efetuadas em maior aumento mostraram deposição de colágeno denso e ondulado, disposto organizadamente no sentido horizontal, tanto em

cicatrizes de ratos normais, com incisões não-tratadas ou tratadas com CEC isolada ou ITD+Zn, como em ratos diabéticos cujas incisões foram tratadas com ITD+Zn. Este achado, porém, não foi observado em ratos do GD/NT ou tratados com CEC isolada, onde se observou ainda o predomínio de fibras colágenas mais finas, desorganizadamente depositadas (Fig. 15).

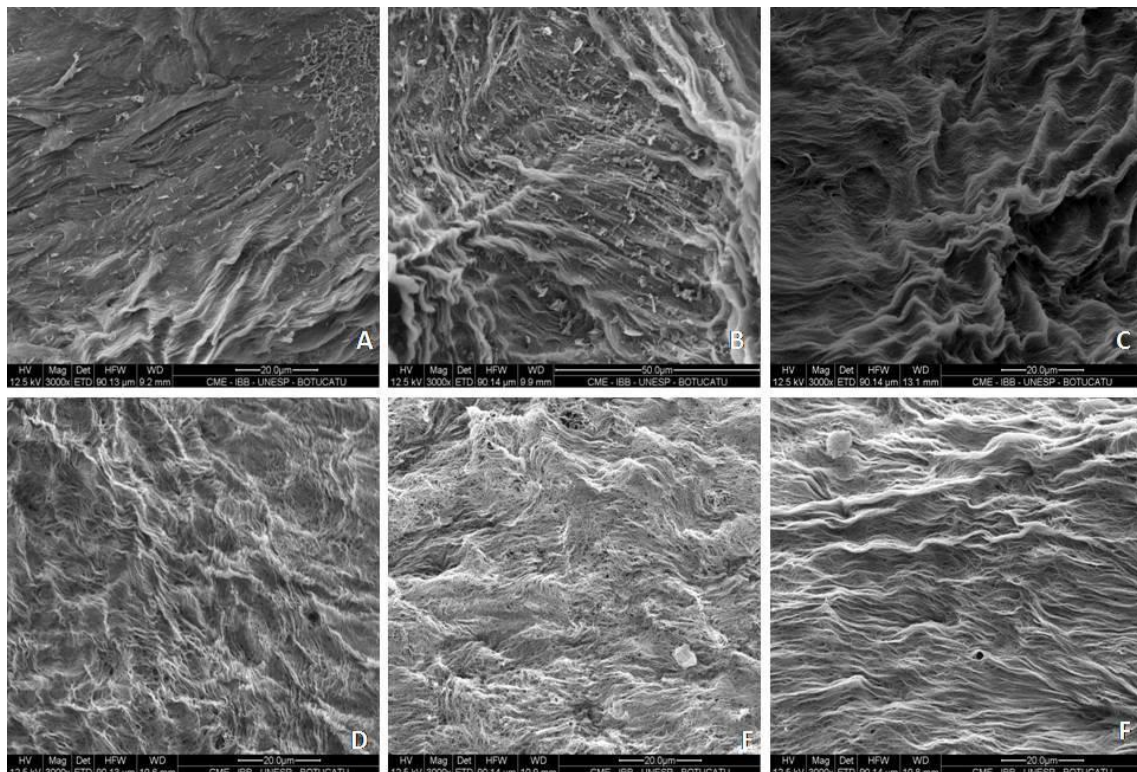


Figura 15 - Fotomicrografias de cicatrizes cirúrgicas da pele de ratos normais (A, B, C) e diabéticos (D, E, F), sacrificados no 21º PO, mostrando deposição organizada de colágeno denso e ondulado, disposto horizontalmente na superfície epitelial, em feridas cirúrgicas de ratos do GN/NT (A), GN/CEC (B), GN/ITD+Zn (C) e GD/ITD+Zn (F). Observe que este padrão ultraestrutural de deposição do colágeno não foi observado em cicatrizes de ratos diabéticos não-tratados (D) ou tratados com CEC isolada (E) (ME – 3000x).

Correlação entre a força de ruptura e os achados morfológicos e ultraestruturais

A Fig. 16 e a Tabela 1 ilustram os valores médios da força de ruptura (FR) encontrados em cicatrizes cirúrgicas dos animais deste experimento, obtidos em estudo

prévio realizado no nosso laboratório³¹. Observa-se que a FR das cicatrizes foi praticamente nula nas fases iniciais da reparação tecidual (4º PO), tanto em animais normais ou diabéticos, tratados ou não-tratados. Este achado se correlaciona ao fato de a resistência mecânica da cicatriz, nesta fase inicial da cicatrização, ser dada quase que exclusivamente pelos pontos de sutura (que foram retirados), uma vez que a ausência de epitelização ou imaturidade do epitélio recém-formado nas bordas incisórias, aliados à presença de infiltrado inflamatório, edema e deposição de colágeno frouxo ou inexistente, observados histologicamente nas cicatrizes, não seriam capazes de suportar qualquer força de tensão.

Todavia, cicatrizes cirúrgicas de ratos do GD/NT mantiveram valores significativamente baixos da FR, quando comparados com os demais grupos, no 7º, 14º e 21º dia de PO ($P < 0,01$). Os achados morfológicos descritos anteriormente mostraram que ratos diabéticos, sem qualquer tratamento das incisões, apresentaram retardo na contração e reepitelização das bordas da ferida cirúrgica, bem como prolongamento da fase inflamatória neutrofílica, com escassa proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, até o 7º PO, características que provavelmente não poderiam conferir maior resistência à cicatriz. Estes achados contrastam com o observado em cicatrizes de animais normais, as quais se mostraram completamente reepitelizadas, com discreto processo inflamatório, intensa proliferação de fibroblastos e progressiva produção de fibras colágenas, conferindo-lhes, por isto, maior resistência à ruptura.

No entanto, a FR ainda persistiu baixa em animais do GD/NT, no 14º e 21º dia de PO. Este achado coincidiu com a falta de organização e imaturidade das fibras colágenas depositadas na cicatriz. Nestes períodos de avaliação observou-se que o colágeno depositado nas cicatrizes de animais normais, visto à ME por varredura, era nitidamente denso e disposto horizontalmente abaixo da superfície epitelial, em

contraste ao colágeno frouxo e pouco organizado observado em cicatrizes de animais diabéticos não-tratados.

Por outro lado, animais diabéticos, tratados com CEC isolada ou associada à administração de sulfato de zinco, através da ITD, tiveram melhora significativa das alterações histológicas observadas em animais diabéticos com cicatrizes não-tratadas, sendo os achados morfológicos compatíveis com aqueles observados em animais normais com incisões tratadas ou não-tratadas, a partir do 7º dia de PO. Apesar disso, incisões de ratos diabéticos tratadas exclusivamente com CEC isolada não tiveram aumento estatisticamente significativo da FR, em todos os períodos de avaliação do experimento; o contrário, porém, sendo observado com o tratamento com ITD+Zn, onde houve aumento significativo da FR em todas as avaliações efetuadas.

Observou-se, também, que os valores da FR, observados em cicatrizes de ratos normais, quando tratadas com CEC ou ITD+Zn, foram expressivamente mais elevados do que aqueles observados em animais diabéticos, durante todo o seguimento. Apesar deste fato, não foram observadas diferenças morfológicas ou ultraestruturais significativas nas cicatrizes de animais normais que pudessem justificar o efeito mais efetivo dos tratamentos.

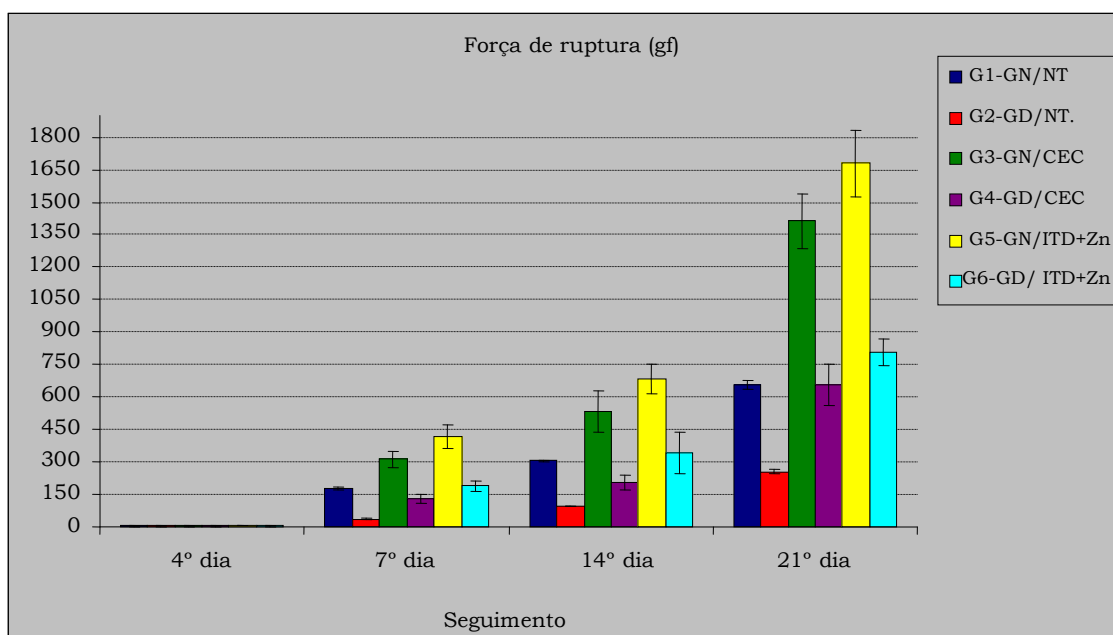


Figura 16 – Variação dos valores da força de ruptura (gf) de cicatrizes realizadas na pele de ratos dos 6 grupos experimentais, durante o período de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	4º dia	7º dia	14º dia	21º dia
GN/NT	5,96 ± 2,93	176,98 ± 5,62	304,16 ± 5,38	656,92 ± 22,12
GD/NT	4,34 ± 2,16	35,60 ± 2,57	95,52 ± 2,23	256,25 ± 10,84
GN/CEC	6,14 ± 2,84	312,78 ± 37,32	533,58 ± 96,55	1412,80 ± 125,82
GD/CEC	5,20 ± 2,44	127,75 ± 21,62	205,57 ± 36,79	655,60 ± 98,25
GN/ITD+Zn	6,36 ± 2,40	414,78 ± 55,35	682,30 ± 67,42	1678,40 ± 151,12
GD/ITD+Zn	4,90 ± 2,36	189,41 ± 22,65	342,61 ± 95,74	805,26 ± 62,35

Tabela 1 – Médias ± SEM dos valores da força de ruptura (gf) em cicatrizes cirúrgicas realizadas na pele de ratos, nos 6 grupos experimentais, nos 4 momentos de avaliação do experimento.

Discussão

Neste estudo, utilizando um modelo incisional de cicatrização, demonstramos que ratos diabéticos hiperglicêmicos, sem qualquer tratamento da incisão, apresentaram alterações morfológicas significativas do processo de cicatrização da ferida cirúrgica caracterizadas por retardo da contração e reepitelização das bordas epiteliais, aumento da intensidade e prolongamento da fase inflamatória mediada por neutrófilos, bem como retardo da migração de macrófagos, da proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares e da produção de fibras colágenas, quando comparado com ratos normais, não-diabéticos, não-tratados ou com ratos normais ou diabéticos, cujas incisões cirúrgicas foram tratadas com corrente elétrica contínua isolada (CEC), ou associada ao sulfato de zinco, administrado através da iontoforese transdérmica (ITD).

Estudos mostram que o processo normal de cicatrização das feridas envolve uma complexa cascata de eventos altamente integrados, na qual interagem vários tipos de células, incluindo células inflamatórias, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, bem como o envolvimento de fatores de crescimento (FC) e enzimas³². Imediatamente após a injúria, plaquetas se agregam no local da ferida, liberando vários FC, os quais promovem vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos mais próximos, favorecendo o início da cascata de coagulação que, uma vez estimulada, resulta na formação de um tampão de fibrina, que juntamente com a fibronectina, formam uma matriz cicatricial provisória que protege a ferida das agressões externas e permite o recrutamento inicial de células inflamatórias e mais tardiamente de fibroblastos³³.

Inicialmente neutrófilos, e depois macrófagos, são atraídos para o tecido injuriado, com a função de prevenir a infecção por microorganismos patogênicos e promover a limpeza da ferida de debris resultantes da morte celular. Nosso estudo

mostrou, porém, que a fase inflamatória da cicatrização da pele é alterada em ratos diabéticos hiperglicêmicos, sem qualquer tratamento da incisão, havendo um prolongamento da fase neutrofílica, que ainda persistia no 7º dia de PO. Por conta disto, também foi observado um atraso no aparecimento dos macrófagos, que por consequência, não permitiu a migração de fibroblastos e o início da formação do colágeno, nos períodos mais vulneráveis da incisão à infecção e à deiscência.

Komesu et al (2004)³⁴ estudando os efeitos morfológicos do DM sobre o processo de cicatrização da pele excisada de ratos diabéticos induzidos pela aloxana, após 1, 3 e 7 dias da cirurgia, observaram que a fase inicial da inflamação mediada por neutrófilos, tanto se iniciou mais lentamente, como se prolongou após o 3º dia de PO, período em que estas células já deveriam ter deixado a área lesada, para serem substituídas por macrófagos e posteriormente por fibroblastos. Baixa densidade de neutrófilos também foi observada por estes autores, até o 3º dia de cicatrização, havendo porém, um aumento significativo do número destas células, após 7 dias de cirurgia.

Estudo recente realizado por Tellechea et al. (2013)⁸, que analisaram biópsias da pele do antebraço e fragmentos de espécimes descartados em cirurgias dos pés, de indivíduos sadios e diabéticos, do tipo 1 e 2, também mostrou um número total primariamente maior de células inflamatórias e de células endoteliais dispostas ao redor dos vasos pré-existentes, nos tecidos de pacientes diabéticos, quando comparado com o encontrado em indivíduos não-diabéticos. Achados similares também foram observados experimentalmente por estes autores, na pele da orelha de coelhos, ratos e camundongos diabéticos, após um período variável de 10 dias a 8 semanas, após a indução do diabetes pela aloxana ou estreptozotocina.

Pesquisas realizadas por vários autores mostram que a qualidade da resposta inflamatória dos tecidos à agressão é um importante estágio no processo de reparação tecidual^{6,35,36}. Assim, defeitos observados na fase inflamatória da cicatrização em indivíduos diabéticos podem reduzir a expressão de fatores de crescimento, com subsequente falha nos processos de proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese do colágeno^{37,38}.

Falhas em número e função dos macrófagos, bem como a incapacidade destas células em proceder à limpeza da ferida cirúrgica, exposta ao conteúdo tóxico de células e neutrófilos mortos, também representam um ponto crítico na resolução da inflamação, considerada pré-requisito básico para a restauração da função e integridade normal dos tecidos⁹.

Nossos resultados mostraram também uma marcada deficiência na capacidade de contração e reepitelização das bordas epiteliais da ferida cirúrgica em ratos diabéticos não-tratados, quando comparados com ratos controles normais não-tratados ou com ratos normais e diabéticos com incisões tratadas com CEC ou ITD+Zn.

Embora os mecanismos ainda não sejam inteiramente conhecidos, os macrófagos têm papel crucial na transição entre a fase inflamatória e a fase de proliferação de fibroblastos e síntese do colágeno, necessárias à reparação tecidual. Estudos mostram que estas células além de eliminar os debris celulares da área injuriada, também liberam uma série de substâncias biologicamente ativas, que incluem os FC responsáveis, pelo menos em parte, pela angiogênese e formação do tecido de granulação, que gradualmente preenche os espaços vazios da ferida, recompondo a barreira epitelial injuriada através dos processos de contração, reepitelização e fibroplasia³⁹. Estes processos, porém, são alterados em indivíduos diabéticos, sendo caracteristicamente atrasados em relação aos indivíduos normais, como observado neste

estudo. Sabe-se que a formação da barreira epitelial depende inicialmente da contração das células mesenquimais, que ao trazerem as margens da ferida mais perto, reduzem o tamanho da área injuriada. Células da epiderme e da derme, então se movem através da ferida, e auxiliada pela proliferação celular, a superfície epitelial acaba-se por recompor: primeiro sobre a margem residual da derme e depois sobre o tecido de granulação recém-formado, que gradualmente é preenchido por uma nova matriz extracelular, produzida pelos fibroblastos, que progressivamente vai sendo substituída por colágeno até preencher todo espaço injuriado abaixo da derme^{33,40}.

Este estudo demonstrou, no entanto, que o processo de deposição e organização do colágeno nas cicatrizes de pele também é defeituoso em ratos diabéticos hiperglicêmicos, não-tratados, sendo constituído por colágeno frouxo e pouco denso, mesmo no 14º dia de PO, quando comparado com os respectivos controles tratados ou não-tratados. À microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que diferentemente de animais controles, a deposição de fibras colágenas em animais diabéticos é marcadamente desorganizada e composta por fibras imaturas, com inúmeros “vazios” ainda não preenchidos na área lesada. Este achado já havia sido observado em nosso laboratório em anastomoses do intestino grosso e delgado de ratos diabéticos aloxânicos, sem qualquer tratamento da doença⁴¹. Em ambos os estudos, porém, observou-se que não houve variação do conteúdo do colágeno nas cicatrizes de pele e intestinos, sendo encontrados níveis normais de OH-prolina e proteína tecidual nestes tecidos.

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura são bastante ilustrativos no que diz respeito à melhoria da qualidade da cicatrização com relação ao tratamento proposto.

Segundo Rizk (1891)⁴², durante a primeira semana após a lesão, as bordas das feridas ainda não estão completamente epitelizadas, fato este, corroborado em nosso estudo no 7^o dia de PO em animais normais e diabéticos sem tratamento. Entretanto nos ratos tratados com CEC ou ITD+Zn, no mesmo período, foi observada reepitelização completa das bordas cirúrgicas, indicando a efetividade do método nas fases iniciais da cicatrização.

A literatura demonstra que a presença de ondulações nas fibras de colágeno caracteriza uma aceleração na formação e maturação das mesmas, sendo este fato relacionado ao aumento da resistência mecânica das cicatrizes⁴³. A presença de folículos pilosos emergindo na epiderme correlaciona-se com um grau elevado de cicatrização, o qual é caracterizado pela produção de estímulos para o crescimento de folículos pilosos^{44,45}. Estes fatores supracitados também foram observados em nosso estudo, a partir do 14^o dia de PO, em animais normais e diabéticos tratados com ITD +Zn.

Estes resultados sugerem que a queda da força de ruptura (FR), observada nas cicatrizes da pele dos animais deste estudo, está muito mais relacionada ao prolongamento da fase inflamatória e ao retardo do início da fibroplasia (nas fases iniciais da cicatrização) e ao grau de organização e maturação do colágeno depositado nas cicatrizes (nas fases mais tardias), do que propriamente à quantidade desta proteína nos tecidos. Onodera et al (2004)⁴⁶, porém, tentando estabelecer uma correlação entre a síntese do colágeno com a FR de anastomoses realizadas no cólon de ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina concluíram que a queda da resistência mecânica nestas anastomoses era muito mais dependente do colágeno recém-formado na cicatriz (do tipo I), do que do conteúdo total de colágeno presente no tecido.

Estudo recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa¹⁰ mostrou que incisões cirúrgicas praticadas na parede abdominal de ratos diabéticos aloxânicos, 3 meses após

a indução do diabetes, apresentaram significativa queda da força de ruptura, dificuldade para promover a contração da ferida e aumentar a densidade do colágeno nas cicatrizes, principalmente nas fases mais precoces da cicatrização.

Não obstante as diversas alterações encontradas no processo de cicatrização da pele dos animais diabéticos hiperglicêmicos deste estudo, nós mostramos que as mesmas podem ser completamente revertidas pelo tratamento das incisões com a estimulação elétrica dos tecidos, aplicada isoladamente, ou em associação ao sulfato de zinco, através da iontoforese transdérmica (ITD). Ambos os tratamentos foram eficazes em modificar as alterações observadas em animais diabéticos, não-tratados, tanto na fase inflamatória da cicatrização, como nas fases de proliferação celular, síntese, organização e remodelação do colágeno. Todavia, os benefícios foram mais evidentes com a utilização da ITD+Zn, em todos os períodos de avaliação efetuados.

São escassos, porém, os estudos realizados em feridas agudas de hospedeiros diabéticos, onde os efeitos da CEC e ITD foram testados, sendo a maioria das pesquisas disponíveis realizada em animais saudáveis, não-diabéticos²⁴ ou dedicada ao tratamento clínico das úlceras crônicas de extremidades inferiores, associadas ou não à neuropatia diabética⁴⁷.

Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados em animais saudáveis, no entanto, têm demonstrado que a estimulação elétrica (EE) das células teciduais tem capacidade para melhorar o suprimento sanguíneo e limitar a formação de edema em áreas lesadas, agir como agente bactericida ou bacteriostático contra infecções, estimular a migração de neutrófilos e macrófagos, aumentar a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno, acelerar a reepitelização da ferida cirúrgica, aumentar a força tênsil das cicatrizes, a síntese do DNA, a síntese protéica, o transporte de substâncias através da

membrana celular, o influxo de cálcio e a exposição dos receptores da insulina, e também, a expressão de receptores de fibroblastos ao fator de crescimento-beta²⁴.

Reed (1988)⁴⁸ estudando os efeitos da EE de alta voltagem sobre a permeabilidade microvascular às proteínas do plasma, na bochecha de hamsters, mostrou que o tratamento reduziu o extravasamento de fluidos para o interstício vascular, retardando a formação de edema. Resultados similares também foram descritos por outros autores⁴⁹.

Brown & Gogia (1987)⁵⁰ mostraram que a EE de alta voltagem melhorou a cicatrização de incisões da pele do dorso de coelhos, determinando o aumento da força tênsil e maior porcentagem de fechamento da ferida, quando comparado com animais controles não-tratados. Os autores observaram, porém, que os efeitos benéficos do tratamento só foram significativos nas fases mais tardias da cicatrização (7º PO), não tendo sido observada melhora das variáveis analisadas no 4º dia de PO. Apesar dos efeitos positivos do tratamento, não foram observadas diferenças significativas no exame histológico da pele incisa entre os grupos tratados e não-tratados.

Estudo posterior realizado por Brown et al. (1988)⁵¹, porém, mostrou que a EE monofásica, pulsátil, de alta voltagem, acelerou a epitelização de incisões realizadas na pele do dorso de coelho, no 4º e 7º dia de PO, quando comparado com animais controles não-tratados.

Rápido ingresso de fibroblastos e deposição de colágeno em matrizes esponjosas, implantadas em excisões da pele de camundongos, foram observados em animais tratados com EE direta dos tecidos, quando comparado com animais controles não-tratados⁵². Cruz (1989)⁵³ também relatou efeitos benéficos da EE pulsátil de alta voltagem sobre a cicatrização de feridas produzidas por queimadura da pele de porcos,

tendo observado maior contração da ferida e maior população de fibroblastos na área injuriada, quando comparado com animais não-tratados.

Bach et al. (1991)⁵⁴ avaliando os efeitos da EE contínua e alternada sobre incisões praticadas no dorso de ratos, concluíram que ambos os métodos promoveram aumento significativo do conteúdo do colágeno ao redor da linha de incisão. Todavia, o aumento desta proteína não melhorou a força tênsil ou a energia de absorção dos tecidos destes animais, nas fases mais precoces da cicatrização.

Taskan et al. (1997)⁵⁵ comparando os efeitos das ondas de ultrassom (US) com a EE direta de feridas cirúrgicas produzidas na pele de ratos observaram que a EE teve efeito positivo mais evidente que o US em abreviar a fase inflamatória da cicatrização. No entanto, ambos os tratamentos tiveram efeitos benéficos sobre a fase proliferativa deste processo, sendo a EE superior ao US na fase de maturação do colágeno.

Estudando feridas excisionais da pele de camundongos diabéticos e não-diabéticos, submetidas à EE, Thawer & Houghton (2001)⁵⁶ observaram que doses elevadas de estimulação reduziram as taxas de colágeno medidas na região superficial das feridas realizadas em animais não-diabéticos, mas não tiveram qualquer efeito sobre excisões de animais diabéticos. Por outro lado, enquanto baixas doses de EE foram necessárias para produzir aumento na produção de colágeno em feridas profundas de animais não-diabéticos, doses significativamente maiores foram requeridas para produzir os mesmos efeitos em animais diabéticos. Estes resultados sugerem que a EE altera a deposição de colágeno em feridas excisionais em animais diabéticos e não-diabéticos, mas que a dose aplicada de estimulação pode assumir papel de crucial importância nos resultados.

Efeitos benéficos da ITD e suas variantes (eletroporação, sonoforese e os sistemas potenciadores químicos) também têm sido observados em uma ampla

variedade de situações e condições clínicas nos campos da dermatologia (hiperhidrose palmar, escleroderma, quelóides), oftalmologia (administração de escopolamina, gentamicina e fluoresceína), odontologia (anestesia local para múltiplas extrações dentárias), otorrinolaringologia (anestesia local do conduto auditivo externo para cirurgia), ortopedia (contraturas musculares, tendinites, tenossinovites), reumatologia (artrite reumatóide, artrose), neurologia (doenças neuro-musculares), endocrinologia (administração de insulina em pacientes diabéticos) e outras^{25,57,58}. Todavia, são escassas as publicações sobre o uso destes métodos com a finalidade de corrigir os distúrbios da cicatrização de feridas cirúrgicas, praticadas na pele de hospedeiros diabéticos, especialmente utilizando substâncias com efeitos positivos sobre a hiperglicemia e/ou sobre o processo de cicatrização, como a insulina, os fatores de crescimento, o cromo e o zinco.

Estudo realizado por Mao et al. (1995)⁵⁹, utilizando a ITD associada à administração de insulina, observaram que a redução dos níveis de glicose sanguínea, em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, guarda estreita relação com a intensidade, frequência e duração das ondas de pulso de corrente elétrica utilizada. Maior eficácia da insulina no controle da hiperglicemia também foi observada por Zakzewski et al (1998)⁶⁰ quando o hormônio foi administrado através da ITD, sobre a pele depilada de ratos diabéticos BB/Wor, do que quando administrado sobre a pele sem depilação.

Lee et al. (2004)⁶¹ utilizando a EE e a ITD por eletroporação, associada à administração do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-beta 1), em feridas excisionais de camundongos geneticamente diabéticos (db/db), observaram que a taxa de cicatrização, medida pela velocidade de fechamento e diminuição da área da ferida, foi significativamente acelerada nos animais tratados somente com a EE quando

comparada aos animais controles não-tratados. Todavia, quando o TGF-beta 1 foi administrado por eletroporação, a taxa de cicatrização foi maior ainda, pois, 5 a 7 dias após a aplicação intradérmica da substância, os leitos das feridas mostraram aumento significativo da taxa de reepitelização, síntese do colágeno e angiogênese.

Efeitos positivos sobre a cicatrização de feridas cirúrgicas em animais e homens normais e diabéticos também têm sido relatados com o uso do zinco administrado por via oral, enteral, intraperitoneal ou tópico^{17,18,62}, porém, os resultados destas pesquisas são controversos ou limitados, haja vista que os benefícios da terapêutica somente têm sido bem documentados em indivíduos com deficiência comprovada deste oligoelemento no organismo^{63,64,65}.

Por outro lado, estudo conduzido por Cornwal (1981)⁶⁶ mostrou que pacientes submetidos à amputação bilateral das pernas e que evoluíram com ulcerações nos cotos tiveram retração e fechamento mais rápido das áreas ulceradas, quando tratados com ITD+Zn, do que aqueles pertencentes ao grupo controle histórico do serviço, onde o tratamento não foi empregado.

Esen et al. (2006)⁶⁷ também observaram que a administração de zinco associado à ITD promoveu a dilatação local dos vasos sanguíneos do antebraço em indivíduos normais, não-diabéticos ocasionando, à análise pelo “doppler”, maior fluidez do sangue. Os autores sugeriram que esta propriedade poderia favorecer a cicatrização de feridas em indivíduos diabéticos, devido ao efeito benéfico do mineral sobre a agregação de sangue e plaquetas.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório^{30,31} já haviam comprovado que a ITD+Zn aumentou significativamente a força tênsil de incisões praticadas na pele do abdome dos animais deste estudo, sem que houvesse variação dos níveis de colágeno presente nestas cicatrizes, medidos pela concentração de OH-prolina tecidual. Neste

estudo, porém, demonstramos que o tratamento das incisões com ITD+Zn modificou completamente o curso das alterações morfológicas e ultraestruturais observadas no processo de cicatrização da pele de animais diabéticos hiperglicêmicos, sem qualquer tratamento da incisão. Resultados similares também foram observados com a utilização da EE dos tecidos, todavia, a administração de sulfato de zinco, através da ITD, se mostrou mais efetiva, tanto na fase aguda, como nas fases mais avançadas do processo.

Conclusões

A estimulação elétrica (EE) de feridas cirúrgicas, utilizada isoladamente ou em associação à administração de sulfato de zinco pela ITD, é capaz de melhorar consistentemente as alterações morfológicas e ultraestruturais observadas no processo de cicatrização de animais diabéticos, mesmo quando o estado hiperglicêmico é mantido. Os benefícios da EE, no entanto, foram mais evidentes quando a mesma foi utilizada em associação com o sulfato de zinco. Nítida correlação também foi observada entre os baixos valores da força de ruptura encontrados em incisões não-tratadas de animais diabéticos, com as alterações histopatológicas encontradas nas cicatrizes destes animais, tanto nas fases iniciais, com nas fases mais tardias da cicatrização. Nossos resultados sugerem que a diminuição da força de ruptura em incisões de animais diabéticos está muito mais associada às alterações morfológicas e ultraestruturais presentes nas cicatrizes, do que propriamente ao conteúdo de colágena nelas depositado.

Original Article

Continuous electrical current and zinc sulphate administered by transdermal iontophoresis improves skin healing in diabetic rats induced by alloxan. Morphological and ultrastructural analysis

Lucas Langoni Cassettari^I, Pedro Colli Rocha Dias^{II}, Amanda Natália Lucchesi^{III}, César Tadeu Spadella^{IV}

^IMS, Doctoral Student, Graduate Program in General Basis of Surgery, Faculty of Medicine, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

^{II}Graduate Student, Faculty of Medicine, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^{III}MS, Doctoral Student, Graduate Program in General Basis of Surgery, Faculty of Medicine, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^{IV}PhD, Full Professor, Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Abstract

Purpose: To evaluate the effects of CEC and Zn+TDI on morphological and ultrastructural changes of the healing process of the skin of alloxan-induced diabetic rats, and to establish the correlation between low values of breaking strength found incisions in these animals with histopathological changes observed. **Methods:** One hundred and twenty male Wistar rats were submitted to an incision surgery at the anterior region of abdomen and randomly distributed into 6 experimental groups with 40 animals each: NG/NT- non-diabetic control group consisting of normal mice without any treatment of abdominal surgical scar; DG / NT - diabetic group consisting of diabetic hyperglycemic rats without any treatment of abdominal surgical scar; NG/CEC - non-diabetic group, treated with continuous electrical current ; DG/CEC - Diabetic hyperglycemic group treated with CEC; NG/Zn+TDI - non-diabetic group, treated with zinc sulfate, administered by transdermal iontophoresis; DG/Zn+ TDI diabetic hyperglycemic group, treated with zinc sulfate, administered by Zn+ TDI., administered for a period of 4 consecutive days after surgery, in sessions of 10 minutes duration, using a continuous-current electrostimulator. Each experimental group was further divided into 4 subgroups with 10 rats each to be evaluated on the 4th, 7th, 14th, and 21st day after surgery. In each period were analyzed clinical and laboratory from the animals, measured the breaking strength, hydroxyproline content (OH-P), histopathological analysis by light microscopy and ultrastructural analysis by scanning electron microscopy of the skin scars. **Results:** The analysis by scanning electron microscopy and optical microscopy showed a delay in the phases of wound healing in diabetic rats without treatment in all periods of the experiment, breaking strength (BS) was significantly reduced ($P<0.05$) in skin scars of untreated diabetic rats (DG/NT) when compared to other groups. In contrast, BS in skin scars of non-diabetic groups, and diabetic rats treated with Zn + TDI showed significant increase ($P<0.05$) in those, besides not presenting delayed healing. The OH-P content of the scars did not show statistically significant variation in all studied groups at four different times evaluated after surgery. **Conclusion:** Electrical stimulation of surgical wounds, used alone or in association with administration of zinc sulphate by TDI, is able to consistently improve the morphological and ultrastructural changes observed in the healing of diabetic animals

Key words: Iontophoresis. Zinc. Diabetes Mellitus. Healing. Alloxan. Rats.

Introduction

Studies in humans and animals show that DM slows contraction and closure of the incision, decreases the breaking strength of incisions and anastomosis, and acts negatively on all phases of wound healing¹⁻⁵.

Long-term research has shown that effective control of hyperglycemia plays an important role in the control of chronic diabetic lesions, and may, therefore, improve the changes of the healing process of surgery wounds^{6,7}.

Additionally, currently, the search for an effective treatment to improve wound healing in diabetic patients remains a challenge for researchers. There are numerous therapies tested in clinical and experimental studies in order to improve wound healing in normal and diabetic hosts. Among them, we highlight the oral, parenteral, or topical substances derived from herbal extracts administration, insulin, zinc, chromium, laser irradiation, extracorporeal shock wave pathway, growth factors, artificial skin, the culture of epithelium, with or without dermal components and electrical stimulation of tissues, isolated or associated with administration of soluble ions by transdermal iontophoresis (TDI) ⁸⁻¹⁴.

Among the various substances used by TDI, zinc has particular interest in this study because it is an inherent part of the insulin acts in carbohydrates metabolism and collagen and is intrinsically related to the repair process ¹⁵. Postoperatively, zinc levels may be reduced in diabetic men and animals. This deficiency can lead to decreased formation of connective tissue repair and alteration of wound healing process ¹⁶.

Are scarce, however, clinical and experimental studies on the healing of acute surgical wounds of the skin hosts diabetics where the use of CEC and TDI associated with zinc (Zn + TDI) has been used ¹⁷⁻¹⁹.

A recent study in our laboratory demonstrated that hyperglycemic diabetic rats showed a significant reduction of breaking strength of skin scarring, especially in the most vulnerable stages of incisions as dehiscence and infection. However, this change was completely reversed by the topical treatment of incisions TDI + Zn in the early stages of the healing process. Moreover, despite the low values of breaking strength found in the scars of diabetic animals was observed that the amount of hydroxyproline (P-OH) present in the tissue not differ from the values found in normal or diabetic rats

treated with Zn + TDI in all phases of the healing process. This finding suggested the hypothesis that the decrease of breaking strength in surgical scars skin of diabetic animals may be more related to morphological changes present in the early stages of tissue repair, and later, the level of organization and maturation of collagen deposited the scars, than the amount of this protein in the tissues.

The objective of this study was to evaluate the effects of CEC and Zn+ TDI on morphological and ultrastructural changes of the healing process of the skin of alloxan-induced diabetic rats, and to establish the correlation between low values of breaking strength found incisions in these animals with histopathological changes observed. We hope that our findings can clarify the issues reported here, and also contribute to a better therapeutic approach to changes caused by the DM in the process of healing of surgical wounds.

Methods

Animals and diabetes induction

Use of laboratory animals was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of our institution. One hundred and twenty male Wistar rats, with approximately 250g, from the Central Animal Laboratory, Faculty of Medicine, UNESP, Botucatu-SP, were used in this experiment.

Animals were randomly assigned into 6 experimental groups, with 20 animals each, as follows: NG/NT- non-diabetic control group consisting of normal mice without any treatment of abdominal surgical scar; DG/NT - diabetic group consisting of diabetic hyperglycemic rats without any treatment of abdominal surgical scar; NG/CEC - non-diabetic group, treated with continuous electrical current; DG/CEC-Diabetic hyperglycemic group treated with CEC; NG/Zn+TDI - non-diabetic group, treated with zinc sulfate, administered by transdermal iontophoresis; DG/Zn+TDI-diabetic hyperglycemic group, treated with zinc sulfate, administered by Zn+ TDI. Each

experimental group was further divided into 4 subgroups with 10 animals each, to be evaluated and sacrificed, respectively, in four different times of the experiment, on the 4th, 7th, 14th and 21st day after surgery.

Diabetes was induced by alloxan administered intravenously at a dose of 42 mg/kg of body weight using one of the tail veins. We only used animals with clinical signs of severe diabetes and fasting glucose ≥ 250 mg/dL in two successive determinations (seven and 14 days after diabetes induction).

Analyzed parameters

At the beginning of the experiment (14th day of follow-up or diabetes onset) and at each time point of follow-up, clinical (body weight, water intake, food intake and diuresis) and laboratory (blood glucose, urinary glucose, glycosylated hemoglobin and plasma insulin) parameters were analyzed. Clinical parameters were obtained using individual metabolic cages. Blood glucose was determined by standard enzymatic method (Johnson & Johnson's), glycosylated hemoglobin by agarose gel electrophoresis (Sebia, France), and insulin by radioimmunoassay (Diagnostic Products Corporation, USA). At sacrifice, a segment of the skin containing the incision was removed from each rat to histopathological analysis by light microscopy, ultrastructural analysis by scanning electron microscopy and measure breaking strength (BS) of the scars. After performing the biomechanical assays representative fragments of the scars were also obtained for dosage of tissue OH-P using the Switzer method.

Technical procedures

All invasive procedures on animals were performed under general anesthesia using ketamine (100mg/kg of body weight) + xylazine (50mg/kg of body weight), administered intramuscularly (Rhubifarma Ind. Farmacêutica Ltda, Hortolândia-SP). Blood samples at sacrifice were obtained by cardiac puncture, with chest open.

Euthanasia was by exsanguination, followed by the section of the vena cava infradiaphragmatic.

The surgical wounds were performed on the 15th day of normal follow-up or of diabetes induction with the animals under 12-hour fasting. After general anesthesia and trichotomy of the anterior region of the abdomen, the rats were placed on a flat surface with their limbs extended, and antisepsis of the abdomen was performed by 2% iodinated. A median, medium-umbilical incision with 4 cm in length was performed with interest in the epidermis and dermis. The incision was immediately closed with 4-0 nylon strands (Ethicon Inc., USA) using simple separate stitches at a distance of 8 mm from each other.

To treat the surgical wounds with Zn + TDI, two electrodes were positioned on the corneal layer of the epidermis of each animal. The first was placed near the lower angle of the abdominal incision and the second in the interscapular dorsal region. Both electrodes were connected to a continuous-current electrostimulator (Ibramed, São Paulo, Brazil). The abdominal electrode was connected to the anode (positive) of the device, and that located on the dorsal region to the cathode (negative). The electric current emitted standardized amplitude of 2mA, with 10-minute treatment sessions. Each session was performed at four different times in the postoperative period, of which the first was immediately after the performance of the surgical incision (immediate PO) and the other on the three subsequent days (1st, 2nd and 3rd PO).

According to the proposed treatment, a small gauze pad moistened with 4 ml of zinc sulphate solubilized at the concentration of 100mg/kg of body weight was interposed between the electrode positioned on the base of the abdominal incision and the corneal layer of the epidermis for each experimental group, as shown in Figure 1.



Figure 1 - Illustration of the preparation of animals for treatment by means of iontophoresis: **A)** Detail of the animal with electrodes fixed in the anterior region of the abdomen and on the dorsal region (arrows) for treatment commencement; **B)** Animals during the electrotherapeutic treatment.

Statistical analysis

The study of the clinical, laboratory and biomechanical variables, according to the 6 experimental groups and the 4 sacrifice times, was conducted by means of 6 x 4 factorial analysis of variance, in a completely randomized design, complemented by the Tukey's multiple comparisons test for homogeneous or parametric variables or by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis' non-parametric analysis for the variables showing results with a heterogeneous distribution. All the statistical discussions in the study were performed at the level of significance of 5% or $p < 0.05$.

Results

Clinical and laboratory findings.

Non-diabetic rats showed clinical and laboratory parameters compatible with those observed in normal animals of the same strain in all evaluation periods of the experiment. In contrast, diabetic rats without any treatment of hyperglycemia progressed to severe loss of body weight and significant increase in water intake, food intake and urine output when compared with animals normal non-diabetic subjects ($P < 0.001$). The blood glucose levels, urine glucose and glycosylated hemoglobin were consistently elevated in the diabetic mice groups, plasma insulin values significantly lower (Fig. 2 e 3)

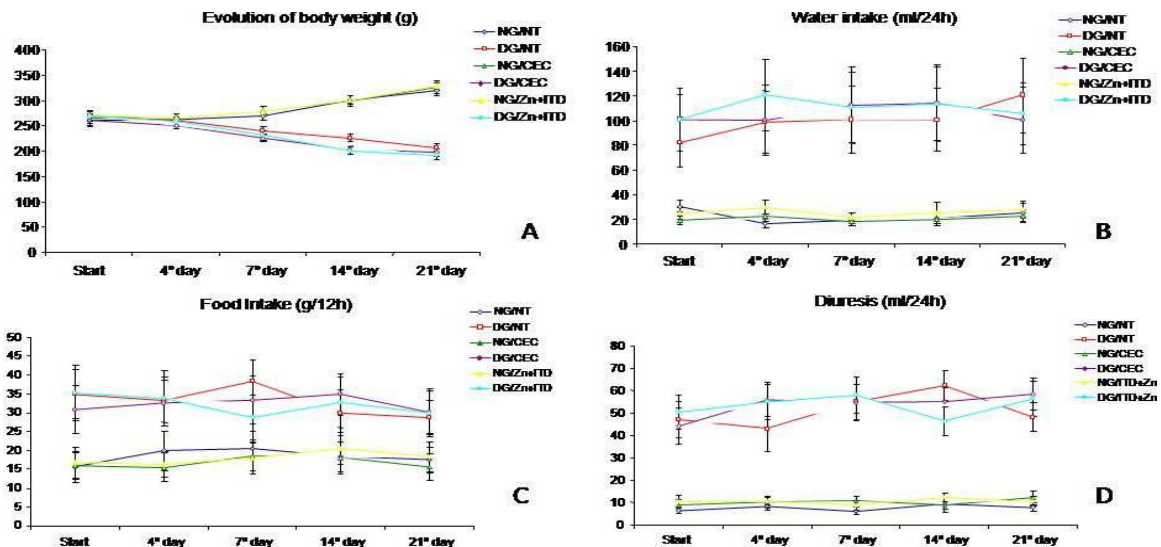


Figure 2 – Graphs showing the variation of clinical parameters in six experimental groups during follow-up: A) Body weight (g); B) Water intake (ml/24h); C) Food intake (g/12h); D) Diuresis (ml/24h).

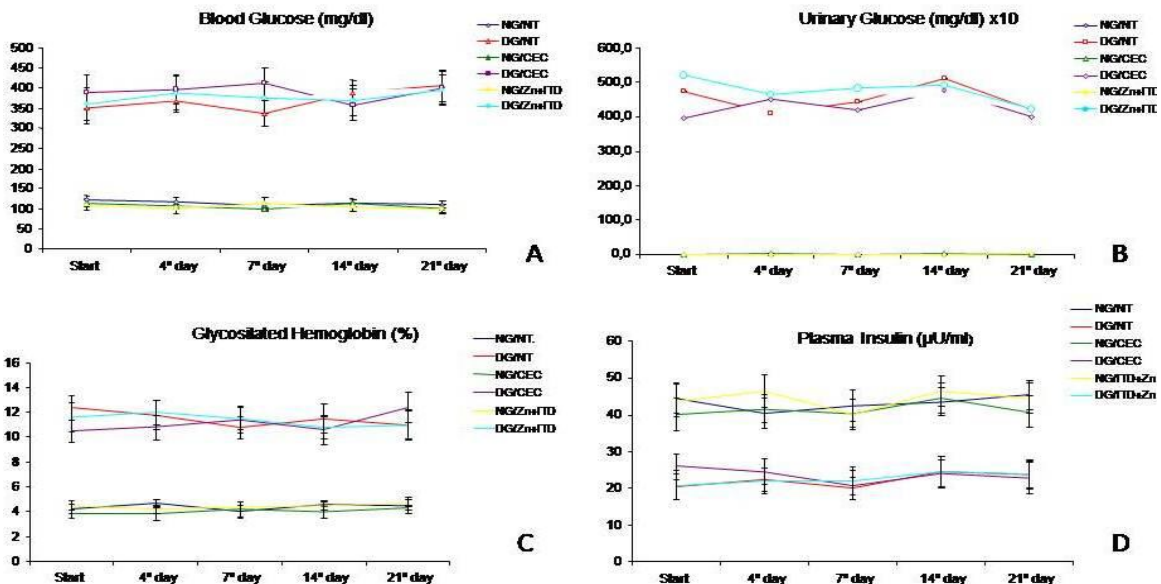


Figure 3 – Graphs showing the variation of laboratory parameters in six experimental groups during follow-up: A) Blood glucose (mg/dL); B) Urinary glucose (mg/dL); C) Glycosylated hemoglobin (%); D) Plasma insulin (µIU/ml).

Morphological findings by light microscopy

a) Contraction of the wound and re-epithelialization of epithelial surface

Surgical wounds DG/NT rats had completely removed and no edges and re-epithelialization in the 4th and 7th. Moderate contraction of the wound was observed in animals DG / CEC on the 4th postoperative day with reepithelialization of the epithelial surface still absent in this period of review, but almost complete on postoperative day 7.

Moreover, both the contraction of the wound re-epithelialization as the epithelial surface is almost completed in rats DG / Zn+TDI in the 4th postoperative day.

These processes have been accelerated more under normal non-diabetic mice (NG), especially in the groups treated with CEC and Zn+TDI. In the latter group, the epithelial edges were already almost completely epithelized on the 4th postoperative day (Fig.4).

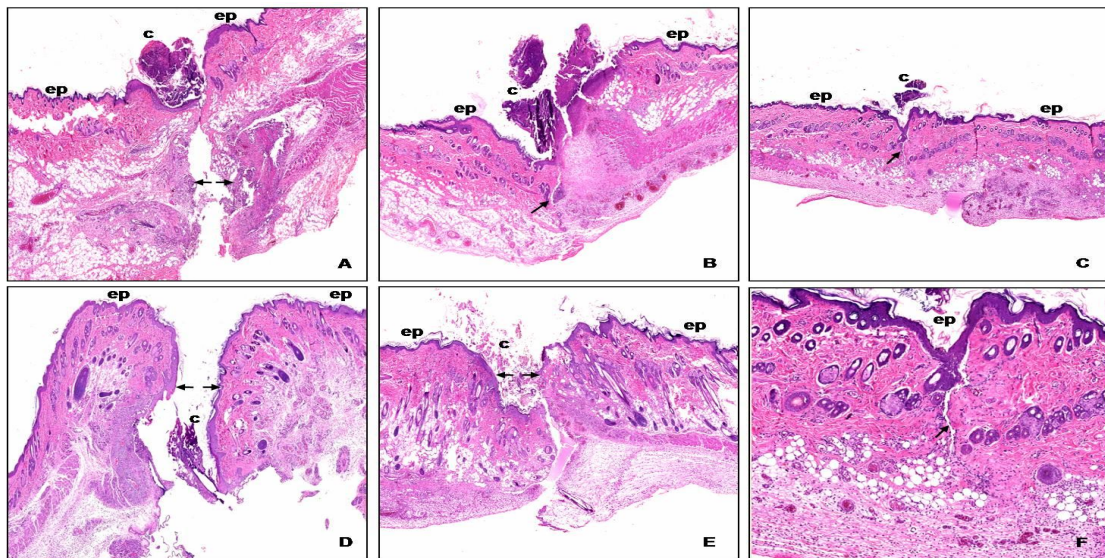


Figure 4 – Morphological findings observed in normal mice, non-diabetic (A, B, C) and hyperglycemic diabetic (D, E, F), untreated or incisions treated with CEC and Zn+TDI, on the 4th postoperative day, respectively. Note the fibrin crust leukocyte (c) and the almost complete contraction of surgical margins (arrows) and re-epithelialization of advanced epithelial surface (ep) in diabetic animals treated with Zn + TDI compared to non-diabetic rats treated with incisions or treated with CEC alone (H & E 20x).

b) Inflammatory Process and proliferation of fibroblasts and vascular endothelial cells

Inflammation and proliferation of fibroblasts and vascular endothelial cells on the 4th postoperative day, surgical wounds in rats DG/NT showed intense inflammatory infiltrate, predominantly composed of neutrophils, and this process is continued until the 7th postoperative day, with the same characteristics. In this period, little proliferation of fibroblasts and vascular endothelial cells was observed. In contrast, in the 4th PO, surgical wounds in rats of NG/NT or NG or DG treated with CEC or Zn+TDI, showed inflammatory infiltrate of moderate intensity, predominantly consisting of macrophages, which was replaced on postoperative day 7, for tissue

granulation composed of fibroblasts, vascular endothelial proliferation and collagen deposition. Morphological inflammatory process in diabetic rats treated with CEC or Zn⁺ TDI, did not differ in the light microscopy, and were consistent with those found in rats treated or untreated NG with both the therapeutic.

c) Deposition and organization of collagen fibers

Fibroblast proliferation and collagen fiber formation was scarce in animals DG/NT until the 7th postoperative day. Deposition of dense collagen, with disorganized arrangement of fibers below the epithelial surface, was observed in this group only from the 14th postoperative day. In contrast, mice NG or DG treated with CEC or Zn⁺ TDI showed progressive deposition of collagen fibers in the scar as early as the 4th postoperative day. Dense collagen arranged horizontally below the epithelial surface was observed in these groups from the 7th postoperative day. Qualitative and organizational differences in morphological structure of collagen deposition in the scar of diabetic rats, whose incisions were treated with CEC and Zn +TDI, when compared with mice where the incisions were not treated were evident.

Ultrastructural findings by scanning electron microscopy

On postoperative day 7 was observed that collagen deposited in scars treated with CEC alone in rats of groups NG and DG showed characteristically thin and disorganized pattern although presenting multiple fenestrations between the collagen fibers, in contrast to the deposition of collagen dense, with few fenestrations observed on postoperative day 7 of scars treated with Zn⁺TDI, both in mice NG, as the DG. It was observed, however, that the deposition of collagen fibers was more pronounced in normal animals, when compared to diabetics (Fig. 5).

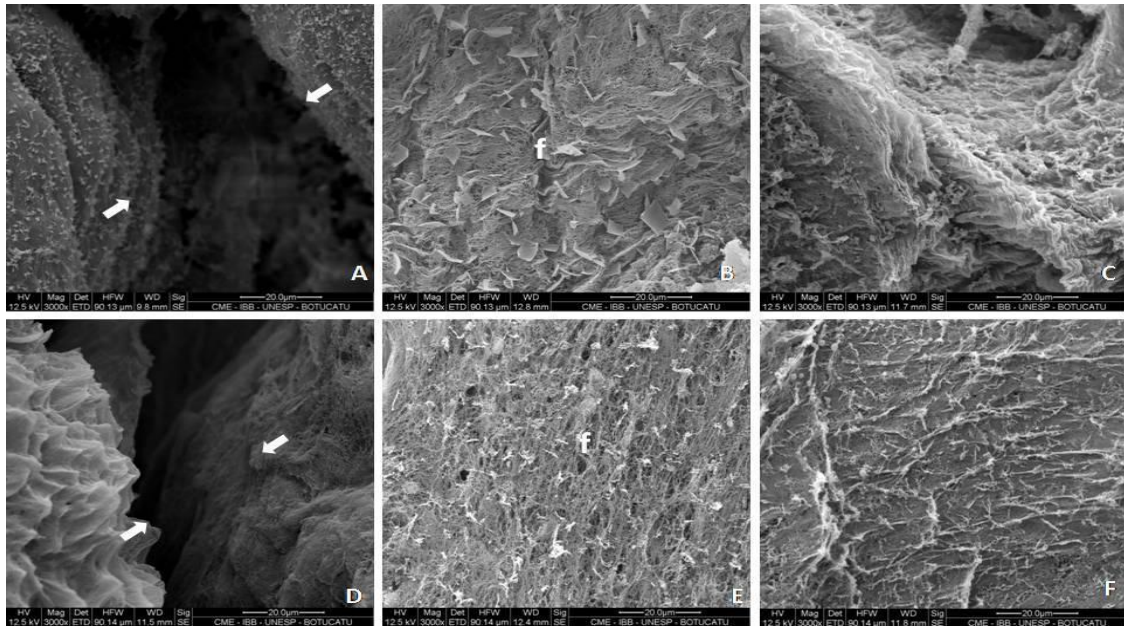


Figure 5 - Photomicrographs of surgical scars from the skin of normal mice (A, B, C) and diabetic (D, E, F), sacrificed on postoperative day 7. Note that the process of re-epithelialization of incisional surgery wounds is still incomplete (arrows) in rats of NG/NT and DG/NT, the largest increase (A, D). Note the disorganized collagen deposition thin, with multiple fenestrations (f) in NG and DG rats with incisions treated with CEC alone (B, E) compared with the deposition of dense collagen with few fenestrations observed in mouse NG and NG with incisions treated with Zn+TDI (C, F) (ME - 3000x).

On the 14th postoperative day, it was observed that healthy animals with untreated or treated incisions with CEC alone or TDI + Zn showed collagen deposition clearly dense, thicker, wavy and evenly distributed along the epithelial surface, when compared with animals DG/NT or DG/CEC, where there was the deposition of thinner, disorganized collagen fibers, yet having fenestrations between them. Moreover, in mice DG/Zn+TDI we observed an organizational pattern of the collagen fibers exceeding that observed in DG rats untreated or treated with CEC alone. 21-day follow-up, the photomicrographs showed deposition of dense, wavy collagen, neatly arranged in the horizontal direction, both in normal mice scars with untreated or treated incisions with CEC alone or Zn+TDI, as in diabetic rats whose incisions were treated with Zn+TDI. This finding, however, was not observed in mice DG / NT or treated with CEC alone, where also noted the predominance of collagen thinner, disorganized fibers deposited (Fig.6)

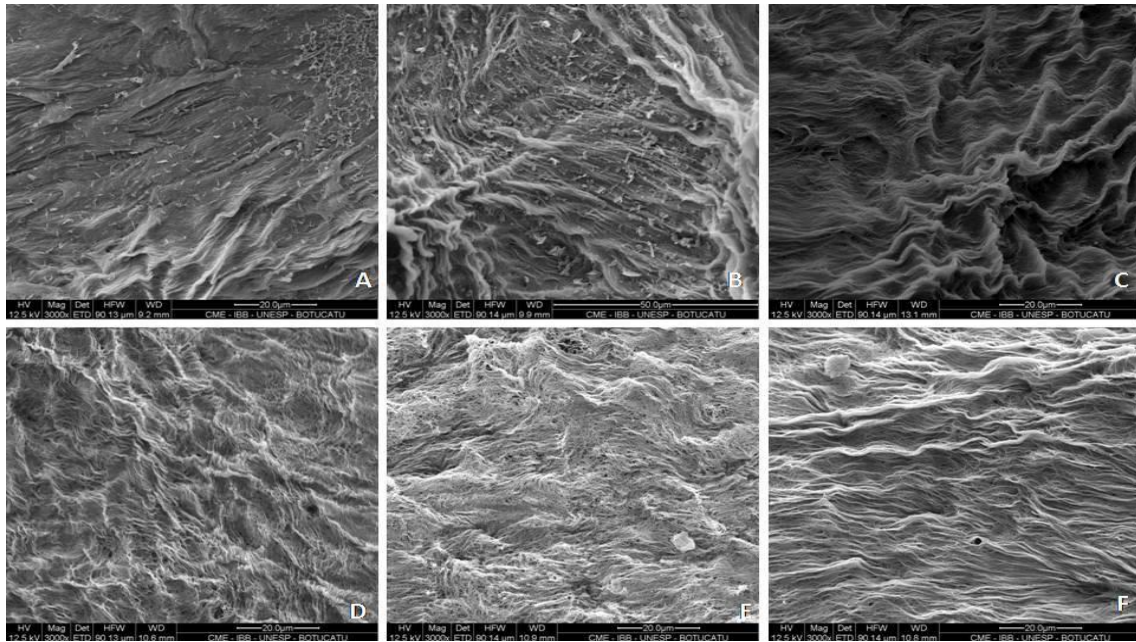


Figure 6 - Photomicrographs of surgical scars from the skin of normal mice (A, B, C) and diabetic (D, E, F), sacrificed on postoperative day 21, showing organized deposition of dense, wavy provisions collagen horizontally on the epithelial surface, surgical wounds in rats of NG / NT (a), NG / CEC (B), NG / Zn+TDI (C) and DG / Zn+ TDI (F). Note that this ultrastructural pattern of collagen deposition was not observed in scars of untreated (D) or treated with CEC alone (E) (EM - 3000x) diabetic rats.

Correlation between the breaking strength and the morphological and ultrastructural findings

Figure 7 shows the mean values of breaking strength (BS) found in surgical scars of animals in this experiment, obtained in a previous study conducted in our laboratory²⁰. We observe that the BS of the scars was extremely low in animals DG/ NT at all times of the experiment compared with normal untreated animals, or normal and diabetic patients undergoing treatments with CEC alone or Zn+TDI. However, this finding was reversed in diabetic animals when used CEC alone or Zn+TDI, with values, more expressive on animals DG/Zn+TDI.

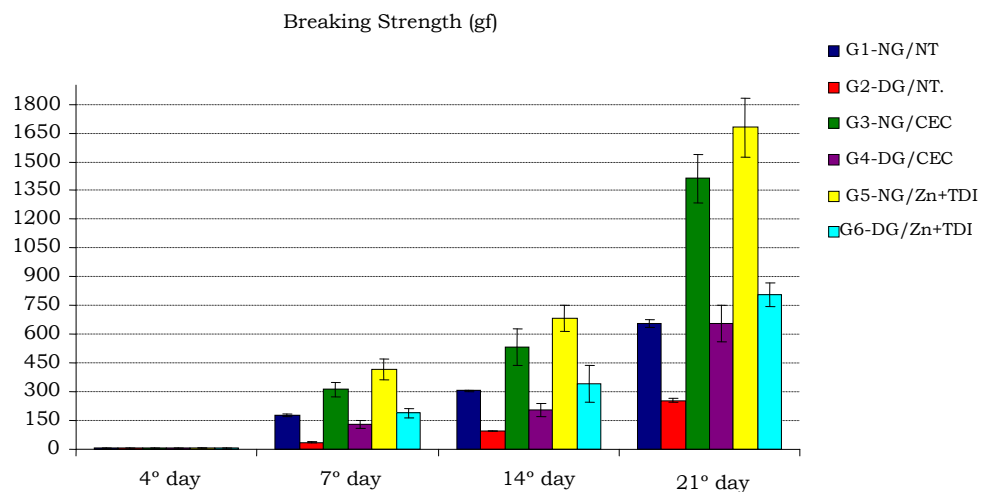


Figure 7 – Variation in breaking strength values (gf) of scars produced in the skin of rats in the 6 experimental groups sacrificed at the 4 experimental moments.

Discussion

Numerous therapeutic adjuvants have been proposed in order to modify the abnormal response of the diabetic organism during the healing of surgical wounds. In this study, we demonstrated that hyperglycemic diabetic rats without any treatment of the incision showed significant morphological changes in the healing process of the wound characterized by contraction and epithelialization of epithelial edges, increasing the intensity and prolongation of neutrophil-mediated inflammatory phase delay and as macrophage migration, proliferation of fibroblasts and vascular endothelial cells and delay of the production of collagen, when compared to normal non-diabetic untreated rats or normal or diabetic rats which surgical incisions were treated with CEC, or Zn + TDI.

Komesu et al (2004)²¹ studied the morphological effects of diabetes on the healing process of the skin excised from alloxan-induced diabetic rats, they observed that the initial phase of inflammation mediated by neutrophils, both started slowly, as if after prolonged 3rd postoperative day, during which these cells should have already left the injured area, to be replaced later by macrophages and fibroblasts. Low density

neutrophils were also observed by these authors, until the 3rd day of healing, however, with a significant increase in the number of these cells after 7 days of surgery.

Researches by various authors show that the quality of the inflammatory response of tissues to injury is an important stage on the tecidual repair process^{22, 23,24}. Thus, defects observed in the inflammatory phase of wound healing in diabetic patients can reduce the expression of growth factors, with subsequent failure in the processes of fibroblast proliferation, angiogenesis and synthesis of collagen²⁵⁻²⁷.

Our results also showed a marked impairment in the ability of contraction and re-epithelialization of skin edges of the wound in untreated diabetic rats compared with control normal rats untreated or normal and diabetic rats treated with incisions or CEC or Zn+ TDI .

Macrophages play a crucial role in the transition between the inflammatory phase and the phase of fibroblast proliferation and collagen synthesis, necessary for tissue repair. These processes, however, are altered in diabetic patients, characteristically delayed relative to normal, as observed in this study.

It is known that the formation of the initial epithelial barrier depends on the contraction of mesenchymal cells, which bring the edges of the wound closer to reduce the size of the injured area. Cells of the epidermis and dermis start to move across the wound, and aided by cell proliferation, epithelial surface ends up by reset, first on the edge of the residual dermis and then woven about the newly formed granulation, which is gradually filled by a new extracellular matrix produced by fibroblasts, which is being progressively replaced by collagen to fill the entire space below the dermis reviled^{28,29}.

This study showed, however, that the process of deposition and organization of collagen in the skin scars is also defective in hyperglycemic non-treated diabetic rats, consisting of loose and low density collagen fibers, even on the 14th postoperative day

when compared with respective treated or non-treated controls. Analyzing by scanning electron microscopy, it was found that unlike control animals, the collagen deposition in diabetic animals is markedly disorganized and composed of immature fibers with numerous "empty" not yet filled in the injured area. This finding has already been observed in our laboratory in anastomosis of small and large intestine of diabetic rats without any treatment³⁰. In both studies, however, revealed that there was no change in the content of collagen in skin scars and intestines being found normal levels of OH-P and tissue protein in these tissues.

The results of scanning electron microscopy are very illustrative with regard to improving the quality of healing in relation to the proposed treatment.

According to Rizk (1891)³¹, during the first week after injury, the edges of the wounds are still not completely epithelialized, a fact corroborated in our study on postoperative day 7 in normal and diabetic animals without treatment. However in mice treated with CEC alone or Zn +TDI in the same period, complete epithelialization of surgical margins was observed, indicating the effectiveness of the method in the early stages of healing. The presence of ripples on collagen fibers featuring acceleration in the formation and maturation of the same, this fact being related to increased mechanical strength of wound healing³². The presence of hair follicles holes emerging in epidermis correlates with a high degree of healing³³. These aforementioned factors were also observed in our study, from the 14th postoperative day in normal and diabetic animals treated with Zn+TDI.

These results suggest that the decrease in breaking strength (BS), observed in scarring of the skin of animals in this study is much more related to prolongation of the inflammatory phase and delay the onset of fibroplasia (in the early stages of healing)

and the degree organization and maturation of collagen deposition in the scar (in later stages), than the amount of this protein in tissues.

Onodera et al (2004)³⁴, however, trying to establish a correlation between collagen synthesis with the BS of anastomosis in the colon of diabetic rats concluded that the decrease in strength in these anastomosis was much more dependent of the collagen newly formed on the scar, that the total content of collagen present in the tissue.

Recent study by our research group showed that practiced surgical incisions in the abdominal wall of diabetic rats, 3 months after induction of diabetes, showed significant decrease of BS, difficulty to promote wound contraction and increase collagen density in scars, especially in the early stages of healing.

In this study, we show that the derived scarring of the DM can be completely reversed by treatment of the incisions with electrical stimulation of tissues, applied alone or in combination with zinc sulfate by TDI. Both treatments were effective in modifying the changes observed in diabetic, non-treated animals, both in the inflammatory phase of healing, as the phases of cell proliferation, synthesis, organization and remodeling of the collagen.

However, the benefits were more evident with the use of the Zn+TDI in all periods of evaluation conducted. Beneficial effects of TDI and its variants (electroporation, phonophoresis and chemical enhancers systems) have also been observed in a wide variety of situations and clinic conditions^{14, 36.37}. However, there are few publications on the use of these methods in order to correct the disorders of surgical wound healing practiced in the skin of diabetic hosts, especially using substances with positive effects on hyperglycemia and / or the healing process, as insulin, growth factors, chromium and zinc.

Lee et al. (2004)³⁸ using TDI by electroporation associated with the administration of transforming growth factor beta 1 (TGF beta-1), diabetic (db / db) factor, observed healing rate was higher than in untreated groups, therefore 5-7 days after intradermal application of the substance, the beds of the wounds showed a significant increase in the rate of epithelialization, collagen synthesis and angiogenesis.

Positive effects on surgical wound healing in normal and diabetic animals and men have also been reported with the use of zinc given orally, enteral, intraperitoneal or topic^{16, 39,40}. However, the results of these searches are limited or controversial, given that the benefits of therapy have only been well documented in individuals with proven this trace element in disability on organism^{41, 42,43}.

On the other hand, a study conducted by Cornwall (1981)⁴⁴ showed that patients underwent bilateral amputation of the legs and who developed ulcerations on the stumps had shrinkage and faster closing of the ulcerated areas, when treated with Zn+TDI than those belonging to historical control service, where treatment was not employed group.

Esen et al. (2006)⁴⁵ also observed that administration of zinc associated with TDI promoted local dilation of blood vessels of the forearm in normal subjects, resulting in non-diabetic, the analysis by the "Doppler", fluidity of blood. The authors suggested that this property could promote wound healing in diabetic subjects due to the mineral beneficial effect on the aggregation of blood and platelets.

Previous studies in our laboratory^{20,46} have already proven that Zn+TDI significantly increased the tensile strength of skin incisions practiced in the abdomen of the animals in this study, with no change in the levels of collagen present in these scars, measured by the concentration of OH-P tissue.

In this study, however, demonstrated that treatment of incisions with Zn+TDI completely changed the course of morphological and ultrastructural changes observed in

the healing process of the skin of diabetic hyperglycemic animals without any treatment of the incision. Similar results were observed with the use of electrical stimulation(ES) on tissues, however, the administration of zinc sulfate by TDI was more effective in acute phase, as in the later stages of the process.

Conclusion

The electrical stimulation (ES) to surgical wounds used alone or in combination with the administration of zinc sulfate by TDI, is able to consistently improve the morphological and ultrastructural changes seen in the healing of diabetic rats process, even when the hyperglycemic state is maintained. The benefits of ES, however, were more evident when it was used in combination with the zinc sulfate. Our results suggest that the decrease of breaking strength of incisions in diabetic animals is much more associated with morphological and ultrastructural alterations present in the scars, than the content of collagen deposited in them.

Referências/References

1. World Health Organization (WHO). Health topics. Diabetes. Fact sheet n°312. Reviewed October 2013. Retrieved from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>
2. American Diabetes Association. Statistics about diabetes. Data from the 2011 National Diabetes Fact Sheet (released Jan. 26, 2011). Retrieved from: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/?loc=superfooter>
3. International Diabetes Federation (IDF). Country summary table: estimates for 2012. Diabetes cases and prevalence. Retrieved from: http://www.idf.org/sites/default/files/5E_IDFAtlasPoster_2012_EN.pdf
4. Rosenberg CS. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. Nurs Clin North Am; 25: 247-253, 1990.
5. Meyer JS. Diabetes and wound healing. Crit Care Nurs Clin North Am; 8(2):195-201, 1996.
- 6/1. Goodson WH 3rd, Hunt TK. Wound healing and the diabetic patient. Surg Gynecol Obstet; 149:600-608, 1979.
- 7/2. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetes rats. Diabetes; 37: 371-376, 1988.
- 8/3. Tellechea A, Kafanas A, Leal EC, Tecilazich F, Kuchibhotla S, Auster ME, Kontoes I, Paolino J, Carvalho E, Nabzdyk LP, Veves A. Increased skin inflammation and blood vessel density in human and experimental diabetes. In J Loww Extrem Wounds; 12(1):4-11,2013.
- 9/4. Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, Bhasker V, Gordillo GM, Sen CK, Roy S. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. PLoS One; 5(3/e9539): 1-12, 2010.
- 10/5. Minossi, JG, Lima FO, Caramori CA, Hasimoto CN, Ortolan EV, Rodrigues PA, Spadella CT. Alloxan diabetes alters the tensile strength, morphological and morphometric parameters of abdominal wall healing in rats. Acta Cir Bras; 29(2): 118-124, 2014
- 11/6. Nathan DM, Bayless M, Cleary P, Genuth S, Gubitosi-Klug R, Lachin JM, Lorenzi G, Zinman B; DCCT/EDIC Research Group. Diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: advances and contributions. Diabetes; 62(12):3976-3986, 2013.

- 12/7. McMurry JF Jr. Wound healing with diabetes mellitus. Better glucose control for better wound healing in diabetes. *Surg Clin North Am*; 64(4): 769-778, 1984.
13. Greenhalgh DG. Wound healing and diabetes mellitus. *Clin Plast Surg*; 30(1): 37-45, 2003.
14. Pérez-Gutiérrez RM, Muñoz-Ramírez A. Hexane extract of the seeds of *Byrsonima crassifolia* accelerates wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chin J Integr Med*; 2013 Nov 16. 1-7. Doi: 10.1007/s11655-013-1556-x
15. Kwon AH, Qiu Z, Hashimoto M, Yamamoto K, Kimura T. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Surg*; 197(4): 503-509, 2009.
16. Apikoglu-Rabus S, Izzettin FV, Turan P, Ercan F. Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. *Clin Exp Dermatol*; 35(2):180-5, 2010.
- 17/36. Agren MS, Söderberg TA, Reuterving CO, Hallmans G, Tengrup I. Effect of topical zinc oxide on bacterial growth and inflammation in full-thickness skin wounds in normal and diabetic rats. *Eur J Surg*; 157(2): 97-101, 1991.
- 18/16. Moraes SP, Chaves FRB, Banci S, Rover PA, Georgetti F, Reis-Neto JA. The effect of zinc and chromium on wound healing in normal and diabetic rats. *Rev Col Bras Cir*; 27 (5): 394-399, 2000.
- 19/8. Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo MS, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*; 24(4): 474-479, 2006.
- 20/9. Yang G, Luo C, Yan X, Cheng L, Chai Y. Extracorporeal shock wave treatment improves incisional wound healing in diabetic rats. *Tohoku J Exp Med*; 225 (4): 285-292, 2011.
- 21/10. Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol*; 136(6): 1235-1246, 1990.
- 22/11. Inpanya P, Faikruea A, Ounaroorn A, Sittichokechaiwut A, Viyoch J. Effects of the blended fibroin/aloe gel film on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Mater*; 7(3):13pp, 2012. Retrieved from: <http://iopscience.iop.org/1748-605X/7/3/035008/>
- 23/12. Velandar P, Theopold C, Bleiziffer O, Bergmann J, Svensson H, Feng Y, Eriksson E. Cell suspensions of autologous keratinocytes or autologous fibroblasts

accelerate the healing of full thickness skin wounds in a diabetic porcine wound healing model. *J Surg Res*; 157(1):14-20, 2009.

24/13. Kloth LC. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *Int J Low Extr Wound*;4(1): 23-44, 2005.

25/14. Dixit N, Bali V, Baboota S, Ahuja A, Ali J. Iontophoresis – an approach for controlled drug delivery: a review. *Curr Drug Deliv* 2007:1-10.

26/15. Lansdown ABG. Zinc in the healing wound. *Lancet*; 347: 706-707, 1996.

27/17. Smith J, Romansky N, Vomero J, Davis RH. The effect of electrical stimulation on wound healing in diabetic mice. *J Am Pediatr Assoc*; 74(2): 71-75, 1984.

28/18. Lee PY, Chesnoy S, Huang L. Electroporatic delivery of TGF-beta1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic wound healing in db/db mice. *J Invest Dermatol*; 123(4):791-798, 2004

29/19. Thawer HA, Houghton PE. Effects of electrical stimulation on the histological properties of wounds in diabetic mice. *Wound Repair Regen*; 9(2):107-115, 2001.

30/20. Cassettari LL, Dias PCR, Lucchesi AN, Arruda MF, Spadella CT. Zinc sulphate administered by transdermal iontophoresis improves breaking strength of surgical wounds in skin of alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras*; 28(8): 601-606, 2013.

31/42. Cassettari LL. Efeitos da corrente elétrica contínua isolada e da iontoforese transdermal, associada ao zinco, sobre a resistência mecânica e o conteúdo de hidroxiprolina de cicatrizes realizadas na pele de ratos diabéticos aloxânicos. Botucatu. Dissertação [Mestrado em Agressão, Reparação, Regeneração e Transplantes de Tecidos e Órgãos] – Faculdade de Medicina da UNESP; 2010.

32. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*; 341: 738-746, 1999.

33/27. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wound and delayed healing in diabetes. *Diabet Med*; 23: 594-608, 2006.

34/21. Komesu MC, Tanga MB, Buttros KRm Nakao C. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*; 11: 63-67, 2004.

35/22. Barbul A, Regan MC. Immune involvement in wound healing. *Otolaryngol Clin North Am*; 28(5): 955-968, 1995.

36/23. Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*; 61(5): 571-575, 1989.

- 37/24. Mustoe TA, Pierce A, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Devel TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- β . *Science*; 237 (4820): 1333-1336, 1987.
- 38/25. Falanga V. Growth factors and wound healing. *Dermatol Clin*; 11(4): 667-675, 1993.
- 39/26. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Me*; 14: 29-34, 1997.
- 40/28. Clark RA. Cutaneous tissue repair: basic biologic consideration. I. *J Am Acad Dermatol*; 13(5 Pt1): 701-725, 1985.
- 41/29. Ortolan EVP, Spadella CT, Caramori C, Machado JLM, Gregório EA, Rabello K. Microscopic, morphometric and ultrastructural analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*; 116: 198-202, 2008.
- 42/30. Rizk NN. Scanning electron microscopy of the structural reconstruction of the abdominal wall after experimental paramedian incision. *Journal of Surgical Research*; 35: 354-364, 1983.
- 43/31. Parizotto NA. Ação do laser Hélio-Neônio sobre o processo de raparo tecidual: Um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho. Campinas. Dissertação [Doutorado em Engenharia Elétrica]- Universidade de Campinas; 1998.
44. Beheregaray WK, Gianotti GC, Leal JS, Monteiro FM, Simas SM, Elizeire M, Contesini EA. Use of algainp Laser in the Wound Healing of Experimental Cutaneous Lesions in Rabbits. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38(3): 237-243, 2010.
- 45/32. Beheregaray WK, Gianotti GC, Leal JS, Garcez T, Contesini EA. Electrical stimulation in experimental wound healing in rabbits. *Ciência Rural*. 44(5): 878-883, 2014.
- 46/33. Onodera H, Ikeuchi D, Nagayama S, Imamura M. Weakness of anastomotic site in diabetic rats is caused by changes in the integrity of newly formed collagen. *Dig Surg*; 21: 146-151, 2004.
47. Baker LL, Chambers R, DeMuth SK, Villar F. Effects of electrical stimulation on wound healing in patients with diabetic ulcers. *Diabetes Care*; 20(3): 405-412, 1997.
48. Reed BV. Effect of high voltage pulsed electrical stimulation on microvascular permeability to plasma proteins: a possible mechanism in minimizing edema. *Phy Ther*; 68: 491-495, 1988.

49. Thornton R, Mendel F, Fish D. Effects of electrical stimulation on edema formation in different strains of rats. *Phy Ther*; 78(4): 386-394, 1998.
50. Brown M, Gogia P. Effects of high voltage stimulation on cutaneous wound healing in rabbits. *Phy Ther*; 67: 662-667, 1987.
51. Brown M, McDonnell M, Menton D. Electrical stimulation effects on cutaneous wound healing in rabbits. *Phy Ther*; 68: 955-960, 1988.
52. Dunn MG, Doillon CJ, Berg RA, Olson RM, Silver FH. Wound healing using a collagen matrix: effect of DC electrical stimulation. *J Biomed Mater Res*; 22 (A2 Suppl): 191-206, 1988.
53. Cruz NI, Bayrón FE, Suárez AJ. Accelerated healing of full-thickness burn by the use of high-voltage pulsed galvanic stimulation in the pig. *Ann Plast Surg*; 23(1): 49-55, 1989.
54. Bach S, Bilgrav K, Gottrup F, Jorgensen TE. The effect of electrical current on healing skin incision. An experimental study. *Eur J Surg*; 157(3): 171-174, 1991.
55. Taskan I, Ozyazgan I, Tercan M, Kardas HY, Balkanli S, Saraymen R, Zorlu U, Ozügül Y. A comparative study of the effect of ultrasound and electrostimulation on wound healing in rats. *Plast Reconstr Surg*; 100(4): 966-972, 1997.
56. Thawer Ha, Houghton PE. Effects of electrical stimulation on the histological properties of wounds in diabetic mice. *Wound Repair Regen*; March-Apr (2): 107-115, 2001.
- 57/34. Batheja P, Thakur R, Michniak B. Transdermal iontophoresis. *Expert Opin Drug Deliv*; 3: 127-138, 2006.
58. Semalty A, Semalty M, Singh R, Saraf SK, Saraf S. Iontophoretic drug delivery system: a review. *Technol Health Care*; 15(4): 237-245, 2007.
59. Mao XM, Liang BW, Yao YO, Fang SZ, Li Q. Effect of pulse current iontophoretic transdermal delivery of insulin on blood glucose in diabetic rats. *Yao Xue Xue Bao*; 30(12): 881-885, 1995.
60. Zakzewski CA, Wasilewski J, Cawley P, Ford W. Transdermal delivery of regular insulin to chronic diabetic rats: effect of skin preparation and electrical enhancement. *J Control Release*; 50 (1-3): 267-272, 1988.
- 61/35. Lee PY, Chesnov S, Huang L. Electroporatic delivery of TGF-beta1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic healing in db/db mice. *J Invest Dermatol*; 123(4): 791-798, 2004.

- 62/37. Agren MS, Chvapil M, Franzén L. Enhancement of re-epithelialization with topical zinc oxide in porcine partial-thickness wounds. *J Surg Res*; 50(2): 101-105, 1991.
- 63/38. Agren MS. Studies on zinc in wound healing. *Acta Derm Venereol Supp* (Stockh); 154: 1-36, 1990.
- 64/39. Norman JN, Assadulah R, Smith G. Effect of supplements of zinc salts on the healing of granulating wounds in the rat and guinea pig. *J Nutr*; 105(7): 815-821, 1975.
65. Norman JN, Rahmat A, Smith G. Effect of supplements of zinc salts on the healing of incised wounds in the rat and guinea pig. *J Nutr*; 105(7): 822-826, 1975.
- 66/40. Cornwall MW. Zinc iontophoresis to treat ischemic skin ulcers. *Physical Therapy*; 61: 359-360, 1981.
- 67/41. Esen F, Güleç S, Esen H. Exogenous zinc improves blood fluidity but has no effect on the mechanisms of vascular response to acetylcholine iontophoresis in humans. *Biol Trace Elem Res*; 113: 139-153, 2006.