

LUCAS LANGONI CASSETTARI

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

Dissertação 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 Mestre

Orientador - Prof. Adjunto: César Tadeu Spadella

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2010

LUCAS LANGONI CASSETTARI

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

Dissertação 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 Mestre

Orientador - Prof. Adjunto: César Tadeu Spadella

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2010

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

Cassettari, Lucas Langoni.

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 / Lucas Langoni Cassettari. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: César Tadeu Spadella

Capes: 40102149

1. Cirurgia experimental. 2. Diabetes. 3. Circuitos elétricos - Correntes contínuas. 4. Zinco.

Palavras-chave: Corrente elétrica contínua; Diabetes Mellitus; Iontoforeses transdermal; Zinco.

"Se você conta com alguém que tem menos qualidades que você, isso levará à sua degeneração. Se você conta com alguém com qualidades iguais às suas, você permanece onde está. Somente quando conta com alguém cujas qualidades são superiores às suas é que você atinge uma condição sublime." (Dalai Lama)

DEDICATÓRIAS

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Professor Dr. César Tadeu Spadella**, pela dedicação e oportunidade de iniciar minha carreira acadêmica sob sua orientação, e pelo espírito incansável de pesquisador.

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

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

Outros agradecimentos

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

Ao aluno de iniciação científica e futuro médico **Pedro Colli Rocha Dias**, pela amizade conquistada, e incansável disposição, disponibilidade e companheirismo durante a realização deste trabalho.

À bióloga **Amanda Natália Lucchesi**, aluna do curso de Mestrado, 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.

À **Dra. Adriana Polachini do Valle**, médica responsável pelo Laboratório Clínico do HC-Unesp Botucatu, pela franquia do laboratório para a realização das dosagens bioquímicas deste trabalho.

À bióloga **Maria Salete Sartori** e às funcionárias **Maria de Fátima Aparecida Biazon e Maria Luísa dos Santos**, pela realização das dosagens bioquímicas do 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.

A Sras. **Taís Almeida e Rosemeire Aparecida Vicente**, bibliotecárias 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.

Ao **Grupo Administrativo do Campus (GAP)** pela versão do resumo da tese para a língua inglesa e pelas orientações na realização da análise estatística.

A Srta. **Luana Ferreira Amaral**, secretária da Associação dos Médicos Plantonistas do HC-Unesp Botucatu, pela digitação do texto e elaboração dos gráficos e tabelas deste trabalho.

A Sra. **Janete Aparecida Herculano, Regina Célia Spadim, Nathanael Pinheiro Salles, Lilian Cristina Nadal Bianchi Nunes e Andrea Paula Longo Devidé**, funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, 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 desta dissertação.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
1. Animais utilizados	27
2. Ambiente de experimentação, profilaxia e tratamento de infecções	27
3. Distribuição e sorteio dos animais	28
4. Grupos experimentais	28
5. Momentos de avaliação e sacrifício	29
6. Parâmetros analisados	30
7. Técnicas utilizadas	31
7.1. Anestesia e sacrifício	31
7.2. Tratamento profilático ou curativo de infecções e analgesia	31
7.3. Obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais	31
7.4. Indução do diabetes experimental	33
7.5. Indução da ferida cirúrgica	34
7.6. Posicionamento dos eletrodos e tratamento pela CEC e iontoforese	35
7.7. Exames laboratoriais	38
7.8. Estudo biomecânico	38
7.9. Dosagem da hidroxiprolina tecidual	40
7.10. Análise estatística	41
RESULTADOS	43
1. Achados clínicos e laboratoriais	43
2. Medidas da força de ruptura das cicatrizes cirúrgicas	52
3. Concentração de hidroxiprolina tecidual nas cicatrizes cirúrgicas	56
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	75
RESUMO	77
SUMMARY	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Diagrama representativo da distribuição dos animais nos seus respectivos grupos e subgrupos. **30**
- Figura 2** - Ilustração da metodologia utilizada na coleta das variáveis clínicas e laboratoriais estudadas: A) animal em gaiola metabólica para obtenção dos dados clínicos; B) processo de aquecimento dos animais para coleta de sangue da cauda; C) contenção do animal e exposição da cauda; D) coleta de sangue por secção da cauda para realização dos exames bioquímicos no seguimento. **33**
- Figura 3** - Ilustração das etapas de obtenção da ferida cirúrgica: A – animal anestesiado com demarcação da área da incisão; B – realização da incisão cirúrgica mediana; C – síntese da incisão com mononylon 4.0. **35**
- Figura 4** - Ilustração do preparo dos animais para o tratamento por meio da CEC ou iontoforese: A- Amplitude padronizada de 2 mA, duração da sessão e utilização da corrente Galvânica; B – detalhe do animal com os eletrodos fixados para o início do tratamento; C – animais durante o tratamento eletroterápico. **37**
- Figura 5** - Ilustração das etapas para obtenção das medidas da força de ruptura das cicatrizes: A – retirada do retalho de pele contendo a incisão cirúrgica; B – retalho de pele em imersão em solução fisiológica, a ser preparado para tração; C – máquina universal utilizada na realização dos ensaios biomecânicos; D – tração do seguimento de pele contendo a incisão no centro. **39**
- Figura 6** - Evolução do peso corporal, em gramas, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **44**

- Figura 7** - Evolução da ingestão hídrica, em ml/24h, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **45**
- Figura 8** - Evolução da ingestão alimentar, em g/12h, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **46**
- Figura 9** - Evolução da diurese, em ml/24h, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **47**
- Figura 10** - Evolução da glicemia de jejum, em mg/dl, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **48**
- Figura 11** - Evolução da glicose urinária, em mg/dl x 10, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **49**
- Figura 12** - Evolução do perfil eletroforético da hemoglobina glicosilada, em %, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **50**
- Figura 13** - Evolução da insulina plasmática, em $\mu\text{U}/\text{ml}$, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **51**
- Figura 14** - Ilustração dos efeitos do diabetes sobre os valores da força de ruptura de cicatrizes de animais normais e diabéticos, com e sem tratamento da incisão, durante os 4 momentos de avaliação do experimento: A - ratos sem tratamento da incisão; B - ratos com incisão tratada com CEC isolada; C - ratos tratados com CEC + Zn. **54**
- Figura 15** - Ilustração dos efeitos da CEC isolada e da CEC + Zn, administrado pela iontoforese, sobre os valores da força de ruptura de cicatrizes de animais normais, quando comparados com animais sem tratamento da incisão, nos 4 momentos de avaliação do experimento. **55**

Figura 16 – Ilustração dos efeitos da CEC isolada e da CEC + Zn, administrado pela iontoforese, sobre os valores da força de ruptura de cicatrizes de animais diabéticos, quando comparados com animais sem tratamento da incisão, nos 4 momentos de avaliação do experimento. **55**

Figura 17 - Variação dos valores da força de ruptura (gf) de cicatrizes realizadas na pele de ratos, dos 6 grupos experimentais, sacrificados nos 4 momentos do experimento. **56**

Figura 18 - Variação dos valores da concentração de hidroxiprolina tecidual ($\mu\text{g/ml}$ de tecido seco) de cicatrizes realizadas na pele de ratos, dos 6 grupos experimentais, sacrificados nos 4 momentos do experimento. **57**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Médias \pm SD dos valores do peso corporal (g), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **44**
- Tabela 2** - Médias \pm SD dos valores da ingestão hídrica (ml/24h), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento **45**
- Tabela 3** - Médias \pm SD dos valores da ingestão alimentar (g/12h), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **46**
- Tabela 4** - Médias \pm SD dos valores da diurese (ml/24h), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **47**
- Tabela 5** - Médias \pm SD dos valores da glicemia de jejum (mg/dl), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **48**
- Tabela 6** - Médias \pm SD dos valores da glicose urinária (mg/dl) nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **49**
- Tabela 7** - Médias \pm SD dos valores da hemoglobina glicosilada (%), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **50**
- Tabela 8** - Médias \pm SD dos valores da insulina plasmática (μ U/ml), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. **51**
- Tabela 9** - Médias \pm 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. **53**
- Tabela 10** - Médias \pm SD dos valores da concentração de hidroxiprolina tecidual (μ g/ml de tecido seco) nas cicatrizes da pele de ratos, dos 6 grupos experimentais, sacrificados nos 4 momentos de avaliação do experimento. **57**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DM - diabetes mellitus

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística

CEC - corrente elétrica contínua

mA - mili-ampère

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

G1 - Grupo normal sem tratamento

G2 - Grupo diabético sem tratamento

G3 - Grupo normal tratado com corrente elétrica contínua (CEC)

G4 - Grupo diabético tratado com CEC

G5 - Grupo normal tratado com CEC + zinco

G5 – Grupo diabético tratado com CEC + zinco

M₀ - realizada no 14º dia pós-indução do diabetes ou de seguimento normal

M₁ – animais sacrificados com 4 dias após a realização da agressão cirúrgica e dos tratamentos

M₂ – animais sacrificados com 7 dias após a realização da agressão cirúrgica e dos tratamentos

M₃ – animais sacrificados com 14 dias após a realização da agressão cirúrgica e dos tratamentos

M₄ – animais sacrificados com 21 dias após a realização da agressão cirúrgica e dos tratamentos

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ITD - iontoforese transdérmica ou transdermal

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é considerado um problema de saúde pública universal, com elevado ônus social e econômico, atingindo países de todos os níveis de desenvolvimento (HU et al., 2001; GENUTH et al., 2003; FAGOT-CAMPAGNA et al., 2005; NATHAN et al., 2005; DAGOGO-JACK et al., 2006; CASTELL, 2010, NARAYANAN et al., 2010, van DIEREN, 2010).

O DM configura-se, hoje, como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis, como: o sedentarismo, a dieta inadequada e a obesidade, são os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do diabetes em todo o mundo (BRASIL, 2006., 2008).

Nos Estados Unidos, a doença atinge cerca de 23,6 milhões de americanos, com mais de 1,6 milhões de novos casos diagnosticados todos os anos. Neste país, 174 bilhões de dólares foram gastos, em 2007, com o diagnóstico e tratamento da doença e suas complicações (VARAS-LORENZO et al., 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010; SAYDAH & LOCHNER, 2010).

Estudo realizado, em 2004, a partir de dados epidemiológicos sobre o diabetes, de 191 países-membros da Organização Mundial de Saúde, projetou, para 2030, uma prevalência global de diabetes, de 4,4% da população mundial, que extrapolados ao crescimento populacional atingiria um total de 366 milhões de pacientes diabéticos (WILD et al., 2004).

No Brasil, segundo o último Censo Brasileiro de Diabetes, realizado entre 1986 e 1989, a doença atingia cerca de 7,6% da população, na faixa etária dos 30 aos 69 anos. Destes, observou-se que 50% desconhecia completamente a sua condição de doente, sendo provavelmente identificados através de uma complicação da doença .

Dados do IBGE, de 2007, estimaram uma prevalência de diabetes no Brasil, para todas as idades, de 5,9% da população, o que significaria, hoje, uma estimativa de 11 milhões de pacientes diabéticos no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

Dados do Ministério da Saúde do Brasil, de levantamentos regionais e de registros de associações de pacientes diabéticos (BRASIL, 1988; FRANCO et al., 1988; SILVESTRE, 1997; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000; BRASIL, 2006) revelam que o diabetes é a 6ª causa de internação hospitalar, contribuindo de forma significativa na gênese de outras causas de internação, como: cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, insuficiência renal crônica, neuropatia periférica incapacitante, doença vascular periférica e retinopatia diabética. Estima-se que 30% dos pacientes internados em unidades coronarianas e 26% dos indivíduos que ingressam em programas de diálise no País são diabéticos (MALERBI & FRANCO, 1992; SILVESTRE, 1997; BRASIL, 2006).

O impacto negativo da doença sobre órgãos e sistemas também se traduz em uma piora acentuada na qualidade de vida dos pacientes diabéticos, os quais podem ter uma redução na expectativa de vida em 10 anos, quando afetados pela macro e microangiopatia periférica (LERÁRIO, 1998; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998; 2010).

Mundialmente, os custos diretos para o atendimento ao diabetes variam de 2,5% a 15% dos gastos em saúde, dependendo da prevalência local de diabetes e da complexidade do tratamento disponível. O diabetes também representa carga adicional à sociedade, em decorrência da perda de produtividade no trabalho, aposentadoria precoce e mortalidade prematura (BRASIL, 2006).

O diabetes também é considerado um dos mais importantes fatores ligados aos defeitos da cicatrização tecidual, pois é capaz de alterar as propriedades biomecânicas e o metabolismo do colágeno das feridas cirúrgicas, predispondo às hérnias, deiscências, fistulas e infecções no pós-operatório (ROSENBERG, 1990; ORTOLAN et al.,

2008). Sabe-se que o diabetes retarda o fechamento e a contração da ferida cirúrgica, atua negativamente sobre os granulócitos, sobre a quimiotaxia dos leucócitos e macrófagos e interfere na função das células vermelhas do sangue e no processo de remodelação do colágeno das cicatrizes (EKMEKTZOGLOU & ZOGRAFOS, 2006).

Segundo TAZIMA et al. (2008), o DM prejudica o processo de reparação tecidual em todos os estágios da cicatrização. Este dano é agravado pela prevalência associada de neuropatia periférica, aterosclerose, isquemia tecidual e infecção.

A cicatrização dos tecidos é um processo complexo que envolve três fases: a fase inflamatória, onde ocorre a migração celular de leucócitos e plaquetas; a fase proliferativa, com aumento de fibroblastos e mastócitos; e a fase de remodelação tecidual, onde ocorre o processo de reestruturação da matriz extracelular e do depósito de colágeno. Entretanto, a dificuldade da reparação tecidual no diabetes ocorre, principalmente, nos estágios iniciais do processo de cicatrização, onde se observa aumento do edema, diminuição da proliferação vascular e redução significativa dos elementos celulares envolvidos na cicatrização, tais como: leucócitos, macrófagos e fibroblastos (CARVALHO et al., 2006), e também na fase de remodelação da ferida cirúrgica, onde ocorre o processo de organização do colágeno depositado na cicatriz (ORTOLAN et al., 2008). O colágeno, por sua vez, pode ser avaliado indiretamente pelo conteúdo de hidroxiprolina presente nas cicatrizes. Este composto é um aminoácido constituinte do colágeno e da matriz óssea, oriunda da hidroxilação da prolina, durante os estágios iniciais da biossíntese do colágeno (STRYER, 1992). Segundo ORTOLAN et al. (2004), este aminoácido é o componente estrutural quase que exclusivo do colágeno, tendo baixas concentrações na elastina, motivo pelo qual a dosagem de sua concentração tem sido amplamente utilizada para expressar indiretamente a quantidade de colágeno tecidual presente nas cicatrizes.

Em que pese, porém, a importância do diabetes nos índices de morbidade e mortalidade mundiais, não há consenso na literatura

sobre os mecanismos primariamente responsáveis pela injúria celular desta doença, ao nível dos vasos, coração, rins, retina e nervos do paciente diabético (NERUP et al., 1994; ALLEN et al., 2005), o mesmo ocorrendo com os defeitos da cicatrização (BRAIMAN-WIKSMAN et al., 2007). Este fato vem explicar a existência, ainda hoje, de lacunas no conhecimento da fisiopatologia destas alterações, e particularmente de como se comporta a cicatrização de feridas em portadores de diabetes, frente ao tratamento tópico das incisões cirúrgicas.

Sabe-se, porem, que as alterações observadas no processo de cicatrização de indivíduos diabéticos parece não ser uma consequência primária da doença sobre os tecidos, mas sim, uma alteração que se segue à injúria celular, muito possivelmente associada à colagenogênese imperfeita dos tecidos (ORTOLAN et al., 2004). Assim, em que pese o mito arraigado na cultura médica e popular de que o portador de diabetes primariamente “cicatrizava mal suas feridas”, evidências extraídas de estudos realizados em ratos, no nosso laboratório experimental (ORTOLAN et al., 2008) dão conta de que é possível investir em tratamentos que modifiquem os erros metabólicos observados no paciente diabético, como também na evolução anormal do processo fisiológico de reparação dos seus tecidos.

Neste sentido, tem respaldo amplo na literatura científica iniciativas terapêuticas que visam ao controle eficaz da hiperglicemia e das co-morbidades associadas ao diabetes, tais como a obesidade, a hipertensão arterial e a hipercolesterolemia, que, ao lado da mudança do estilo de vida e do combate ao sedentarismo, podem mudar o curso das complicações diabéticas crônicas, dando maior expectativa de vida aos pacientes (CAHILL et al., 1976; SIPERSTEIN, 1983; BLAIR & CONNELLY, 1996; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2002).

Infere-se, portanto, que o controle da hiperglicemia e dos fatores associados ao diabetes também sejam capazes de melhorar as alterações do processo de cicatrização tecidual nos pacientes diabéticos. Ao lado disso, tem ganhado ênfase a aplicação de recursos terapêuticos capazes de incrementar a circulação sanguínea no

território lesado, especificamente na pele (WANG et al., 2005; NANDA et al., 2006). Dentre estes recursos, a estimulação dos tecidos com corrente elétrica contínua (CEC), isolada ou associada à administração de íons (iontoforese) vem sendo muito utilizada na prática clínica e em estudos experimentais, com diversas finalidades (MAO et al., 1995; DIXIT et al., 2007).

A CEC tem sido usada no fortalecimento muscular, na analgesia, na redução do edema e, principalmente, como referido, no incremento do fluxo vascular aos tecidos lesados (GUIRRO & GUIRRO, 2002). Os efeitos benéficos da CEC no sistema vascular, segundo LOW & REED (2001), estão ligados a sua capacidade de induzir a contração rítmica do tecido muscular e promover o relaxamento dos nervos motores, os quais levam ao aumento do bombeamento do fluxo sanguíneo local, com redução do edema e melhor perfusão dos tecidos, o que, pelo menos em tese, favoreceria o processo de reparação tecidual.

Um importante recurso associado à CEC é a iontoforese, a qual vem sendo usada como intervenção clínica há quase um século. A iontoforese é definida como a introdução, por meio da corrente elétrica, de íons de sais solúveis para dentro dos tecidos do corpo, muitas vezes com finalidades terapêuticas, a semelhança da eletroosmose. Caracteriza-se por ser uma técnica de aplicação transdermal, podendo gerar seus efeitos terapêuticos locais, sem a presença de alterações sistêmicas indesejáveis (JUNIOR et al, 2004; COSTELLO & JESKE, 1995).

A iontoforese transdermal (ITD) é uma técnica não invasiva que usa um potencial de corrente elétrica menor que 5 volts, com intensidades de corrente oscilando entre 0,1 a 1 mA/cm²). Tem a finalidade de facilitar a transferência, de maneira controlada, de uma variedade de substâncias, através da camada córnea da pele.

A ITD foi primeiro descrita por PIVATI, em 1747, porém, seu uso na administração de drogas e substâncias só se tornou popular no início do século XX, quando Le Duc introduziu o termo iontotopia, tendo formulado algumas hipóteses sobre esse processo. Segundo este

pesquisador, os íons eram transferidos para a pele pela ação da corrente elétrica contínua; postulou também que essa transferência era pólo orientada, ou seja, dependia da polaridade do íon e do eletrodo sob o qual era colocado. Desde então, muitos estudos têm sido conduzidos para identificar quais substâncias medicamentosas são viáveis para esse processo de transferência; o mesmo ocorrendo para nos estudos que procuram definir quais são os níveis de penetração, distribuição e efetividade da técnica em condições clínicas (OLIVEIRA et al., 2005).

Segundo OLIVEIRA et al. (2005), são três os mecanismos envolvidos na transferência transdermal por iontoforese: a eletrorrepulsão, criada pela interação droga-campo elétrico, que provê força adicional para direcionar íons de polaridade semelhante ao do eletrodo, sob o qual estes íons são colocados; a eletroosmose, que é o movimento transdermal de parte do solvente, juntamente com os componentes neutros e iônicos nele diluídos; e o aumento da permeabilidade intrínseca da pele, pela aplicação do fluxo elétrico.

COSTELLO & JESKE (1995), ressaltaram que a iontoforese é um método eletroquímico que aumenta o transporte de moléculas pela criação de um gradiente de potencial através da pele, a partir da aplicação de corrente elétrica (Voltagem). Em campos elétricos, a geração do potencial induz ao aumento da migração de fármacos iônicos, por repulsão eletrostática do eletrodo ativo (definido como um eletrodo com a mesma carga iônica do fármaco utilizado, isto é, ânodo (+) para fármacos carregados positivamente e cátodo (-) para fármacos carregados negativamente).

A ITD é um método efetivo e indolor (não invasivo) para administração de medicamentos em uma área localizada do tecido. Na prática clínica, usualmente é utilizada a corrente elétrica na forma galvânica, com dose superior a 1 mili-ampère (mA), utilizando-se eletrodos embebidos em uma solução contendo os fármacos.

Segundo LOW & REED (2001), se uma voltagem é aplicada a um eletrólito, uma corrente de convecção passa a fluir. Esta corrente consiste em íons com cargas positivas que se movem em direção ao

pólo negativo. Se uma droga se encontra na forma iônica, ou seja, tem uma carga, pode-se fazer com que ela percorra qualquer direção, dependendo da polaridade aplicada. Os átomos e moléculas de eletrólito estão constantemente ganhando ou perdendo elétrons para se tornarem íons, e depois se reverterem à sua forma não ionizada. Ocorre, também, um movimento aleatório considerável de partículas. Quando uma carga elétrica é aplicada, ela promove um redirecionamento apropriado dos íons na direção dos pólos que se atraem. Assim, se o eletrólito está separado por membranas, como acontece nos seres vivos, muito mais íons serão conduzidos através dos tecidos, quando as partículas estiverem direcionadas, do que quando estiverem em movimento aleatório.

Essa é uma situação que ocorre quando se aplica a iontoforese. Os tecidos e a solução da compressa ou esponja úmida que contém a droga ionizada são efetivamente um eletrólito contínuo. Os íons com cargas positivas podem se desviar do pólo com carga positiva em direção ao pólo negativo e passar, através da pele, para dentro dos tecidos, e vice-versa, para os íons com carga negativa. Parte dos íons, porém, perderão a sua carga no tecido, ficando quimicamente ativos, podendo, assim, exercerem o seu poder terapêutico (CARVALHO & GONÇALVES 2003).

Os fármacos aplicados pela ITD devem ser hidrossolúveis, positivamente ou negativamente carregados e terem peso molecular relativamente pequeno (CARVALHO & GONÇALVES 2003).

Dentre as vantagens da técnica destacam-se a redução do risco de infecção, a possibilidade de administração do fármaco diretamente no local afetado - minimizando os efeitos adversos sistêmicos da droga, e o fato de ser uma forma alternativa à via injetável, indolor e menos traumática.

Entre as suas principais indicações, a ITD tem sido utilizada no tratamento das seguintes afecções: depósitos localizados de cálcio, tendinites e tenossinovites, hiperhidrose, miopatia, mioespaço, articulações imóveis, cicatrizes, adesões, quelóides, artrite reumatóide,

infecção fúngica, bursite, artrite, doença de Peyronie, analgesia, dessensibilização dos dentes, osteocondrite, esclerodermia, linfedema, herpes simples, cicatrização de feridas entre outras (CARVALHO & GONÇALVES 2003).

Entre as principais substâncias ionizáveis utilizadas estão: ácido acético, adrenalina, alfaquimotripsina, alfamucase, betnesol, bicloridrato de histamina, carbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, água corrente, hialuronidase, iodeto de potássio, cetoprofeno, nitrato de aconitina, novocaína, lidocaína, salicilato de lítio, salicilato de sódio, succinato de presdnniolona, sulfato de atropina, calcitonina, diclofenaco, sulfato de zinco e insulina.

O zinco é uma ortomolécula constituinte de diversas enzimas e com particular interesse no tratamento do DM, haja vista ser parte integrante da insulina, atuar no metabolismo glicídico e do colágeno e estar, portanto, intrinsecamente relacionado ao processo de reparação tecidual (AGREN, 1991; 1993; FAURE et al, 1991; LANSDOWN, 1996).

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 conseqüentemente prejuízo da reparação tecidual (AGREN & FRANZEN, 1990; FRANZEN & GHASSEMIFAR, 1992; MORAES, 2002). O mesmo pode ocorrer na deficiência de cromo e outros oligoelementos, em diversas moléstias (PINO et al., 1992).

Não há relatos, porém, de estudos clínicos e experimentais realizados no intuito de avaliar os efeitos da ITD, com a administração de zinco, sobre a cicatrização de feridas cirúrgicas praticadas em primeira intenção, em hospedeiros diabéticos.

Neste sentido, cresce em importância a utilização de modelos experimentais de DM capazes de reproduzir as alterações clínicas, laboratoriais e histopatológicas do diabetes humano (LERCO et al., 2003), de modo a permitir avaliação do real potencial dessa terapêutica sobre o curso natural da cicatrização da pele, em animais normais e diabéticos não-tratados.

Assim, este estudo avaliou, inicialmente, os efeitos da técnica eletroterápica isolada, ou em adjuvância à suplementação de zinco, sobre a resistência mecânica e o conteúdo de hidroxiprolina tecidual de cicatrizes realizadas na pele de ratos diabéticos não-tratados, para em projeto futuro estabelecer uma possível correlação entre as alterações encontradas e os achados histopatológicos e ultraestruturais destas cicatrizes. Esperamos ter contribuído para melhor compreensão dos fenômenos que acompanham a cicatrização no diabetes, com a proposição de uma terapêutica capaz de atenuar os defeitos que acompanham as diversas fases da reparação tecidual nos indivíduos diabéticos.

OBJETIVO

OBJETIVO

O presente projeto de pesquisa teve o seguinte objetivo:

Avaliar os efeitos da corrente elétrica contínua, isolada ou em associação ao zinco, administrado por meio da iontoforese transdermal, sobre a resistência mecânica e o conteúdo de hidroxiprolina de cicatrizes realizadas da pele de ratos diabéticos aloxânicos, tendo como referência ratos normais não-diabéticos submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos e terapêuticos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais utilizados

Foram utilizados 240 ratos adultos, de ambos os sexos, da linhagem Wistar (*norvegicus albinus*), pesando em torno de 250g, com aproximadamente três meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Campus da Unesp de Botucatu. Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido protocolado sob nº 688, na Comissão de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, cuja aprovação data de 25 de setembro de 2008.

2. Ambiente de experimentação, profilaxia e tratamento de infecções

Durante o experimento os animais foram alojados no biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, tendo sido mantidos em gaiolas de poliuretano, forradas com palha autoclavada, em grupos de 4 animais/caixa, colocadas em “containers”, com temperatura, exaustão e iluminação controladas, sendo alimentados com ração balanceada padrão para roedores, recebendo água *ad libidum*. O controle de insetos foi feito utilizando dispositivos foto-eletrônicos.

Na semana que antecedeu a indução do diabetes experimental (período de adaptação) os animais foram vermifugados com mebendazol (Abbott – Cifarma, São Paulo – SP), administrado por via oral e adicionado à água de beber, e tratados profilaticamente de pediculose com fipronil/metoprene (Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia – SP), colocado na superfície da pele.

3. Distribuição e sorteio dos animais

Do lote inicial de animais oriundos do biotério foram sorteados dois grupos de ratos; o primeiro, destinado aos animais que permaneceram como controles (normais não-diabéticos) e o segundo, aos animais que foram submetidos à indução do diabetes experimental (animais diabéticos). Decorridos 14 dias após a indução do diabetes ou de seguimento normal, os animais foram distribuídos em 6 grupos experimentais, com 40 animais cada um, assim designados:

4. Grupos experimentais

G1 - Grupo normal sem tratamento: constituído de ratos normais, não diabéticos, submetidos à incisão cirúrgica na região anterior do abdome, sem qualquer tratamento da cicatriz;

G2 - Grupo diabético sem tratamento: constituído de ratos diabéticos, sem qualquer tratamento da doença, submetidos à incisão cirúrgica na região anterior do abdome, sem qualquer tratamento da cicatriz;

G3 - Grupo normal tratado com corrente elétrica contínua (CEC): constituído de ratos normais, não diabéticos, submetidos à incisão cirúrgica na região anterior do abdome, com cicatriz tratada com corrente elétrica contínua isolada;

G4 - Grupo diabético tratado com CEC: constituído de ratos diabéticos, sem qualquer tratamento da doença, submetidos à incisão cirúrgica na região anterior do abdome, com cicatriz tratada com corrente elétrica contínua isolada;

G5 - Grupo normal tratado com CEC + zinco: constituído de ratos normais, não diabéticos, submetidos à incisão cirúrgica na região

anterior do abdome, com cicatriz tratada com corrente elétrica contínua associada ao zinco solubilizado, por meio da iontoforese transdermal;

G6 – Grupo diabético tratado com CEC + zinco: constituído de ratos diabéticos, sem qualquer tratamento da doença, submetidos à incisão cirúrgica na região anterior do abdome, com cicatriz tratada com corrente elétrica contínua associada ao zinco solubilizado, por meio da iontoforese transdermal;

Animais que evoluíram para o óbito no período pós-indução do diabetes e no seguimento foram repostos, de modo a não comprometer o número final de ratos de cada grupo experimental do estudo.

5. Momentos de avaliação e sacrifício

Cada um dos grupos experimentais anteriormente discriminados foi dividido em 4 subgrupos de ratos, com 10 animais cada um, para serem avaliados e sacrificados, respectivamente, em 4 momentos do experimento, a saber:

M₁ – animais sacrificados com 4 dias após a realização da agressão cirúrgica e dos tratamentos;

M₂ – animais sacrificados com 7 dias após a realização da agressão cirúrgica e dos tratamentos;

M₃ – animais sacrificados com 14 dias após a realização da agressão cirúrgica e dos tratamentos;

M₄ – animais sacrificados com 21 dias após a realização da agressão cirúrgica e dos tratamentos;

Todos os animais do estudo também tiveram uma avaliação inicial (M₀), realizada no 14º dia pós-indução do diabetes ou de seguimento normal, para obtenção apenas de parâmetros clínicos e laboratoriais. A Fig. 1 mostra o diagrama representativo da distribuição

dos animais do experimento, nos seus respectivos grupos experimentais e subgrupos de estudo,

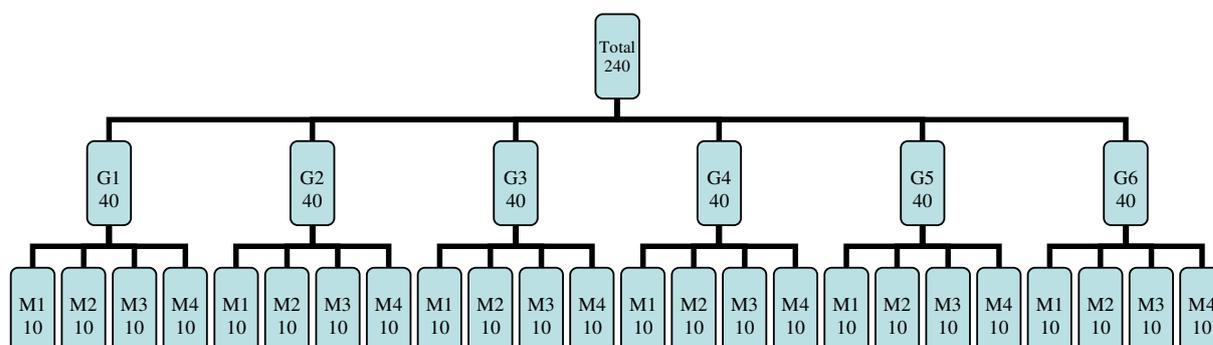


Figura 1 - Diagrama representativo da distribuição dos animais nos seus respectivos grupos e subgrupos.

6. Parâmetros analisados

No presente estudo foram avaliados os seguintes parâmetros:

Clínicos: estado geral, atividade física, e controles do peso corporal (g), ingestão hídrica (ml/24h), ingestão alimentar (g/12h) e diurese (ml/24h);

Laboratoriais: dosagens de glicose sangüínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada, insulina plasmática e hidroxiprolina tecidual;

Estudo biomecânico: medida da força de ruptura das cicatrizes cirúrgicas;

Anatomopatológico macroscópico: autópsia de todos os animais, com ênfase à incisão cirúrgica e à infecção de órgãos torácicos e abdominais.

7. Técnicas utilizadas

7.1. Anestesia e sacrifício

Todos os procedimentos invasivos realizados, incluindo a diérese e síntese da incisão cirúrgica, a implantação dos eletrodos, o tratamento pela iontoforese, a secção da cauda para a coleta de sangue para as dosagens bioquímicas, no 15º dia e no sacrifício, e a necropsia foram realizados sob o efeito de anestesia geral com ketamina (1ml/kg de peso) + xilazina (0,5m/kg de peso), administrados por via intramuscular. Ambas as drogas são fabricadas pela Rhobifarma Ind. Farmacêutica Ltda, Hortolândia – SP. A eutanásia foi feita por hipovolemia e secção da veia cava infradiafragmática.

7.2. Tratamento profilático ou curativo de infecções e analgesia

Na vigência de infecção de pele (piodermite) os animais foram tratados com cuidados locais, drenagem eventual de microabscessos e higiene das feridas com solução anti-séptica de povidine. Na suspeita clínica de pneumonia em ratos diabéticos (anorexia, apatia, febre e taquipnéia) os mesmos foram tratados com tetraciclina adicionada na água de beber, na dose de 100mg/kg de peso corporal, durante 7 dias.

No intra-operatório da realização da incisão cirúrgica foi utilizada antibioticoterapia profilática, em dose única, por via intramuscular, utilizando-se cefazolidina, na dose de 50mg/kg de peso corporal. A analgesia pós-operatória foi feita utilizando-se dipirona, administrada por via intramuscular, na dose de 100 mg/kg de peso corporal, 2 vezes ao dia, durante os dois primeiros dias após a cirurgia.

7.3. Obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais

No início do experimento (14º dia após a indução do diabetes ou de seguimento nos animais normais) e, no dia anterior, a cada um dos momentos definidos para o sacrifício (4, 7, 14 e 21 dias), os animais de

todos os grupos experimentais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, durante um período de 24 horas, sendo oferecida, ao final da tarde, quantidade padronizada de ração e água. Ao término de um período noturno de 12 horas a ração consumida foi registrada (ingestão alimentar em g/12h) e ao término de 24 horas, foram registrados: o volume de água ingerido (ingestão hídrica em ml/24h), a quantidade de urina coletada (diurese em ml/24h) e o peso corporal (g). Um volume de 10 ml da urina coletada foi armazenado para a dosagem de glicose urinária de 24h.

Para obtenção dos parâmetros laboratoriais iniciais, os animais ficaram de jejum por 12h noturnas, sendo o sangue coletado por secção da cauda. Para tanto, os mesmos foram colocados em uma caixa com luzes incandescentes, por um período de 10 minutos, visando aquecê-los e promover a vasodilatação da cauda. A seguir, a cauda foi seccionada em sua extremidade distal, sendo obtidos, por gotejamento, 1,5 ml de sangue para as dosagens bioquímicas. A seguir, a extremidade da cauda seccionada foi amarrada com fio de algodão 2-0, com finalidade hemostática. A coleta de sangue nos demais momentos de avaliação do experimento foi feita durante o sacrifício dos animais, por punção cardíaca, com o tórax aberto. Controles da glicose sanguínea e da glicosúria, realizados no 7º dia após a indução do diabetes ou seguimento normal foram realizados, respectivamente, por venopunctura da cauda para o monitoramento digital da glicose (Accur - Check - Roche) e através de fitas reagentes (Gluketur Test). A Fig. 2 ilustra as etapas dos procedimentos de obtenção de parâmetros clínicos e metabólicos em animais normais e diabéticos no seguimento.

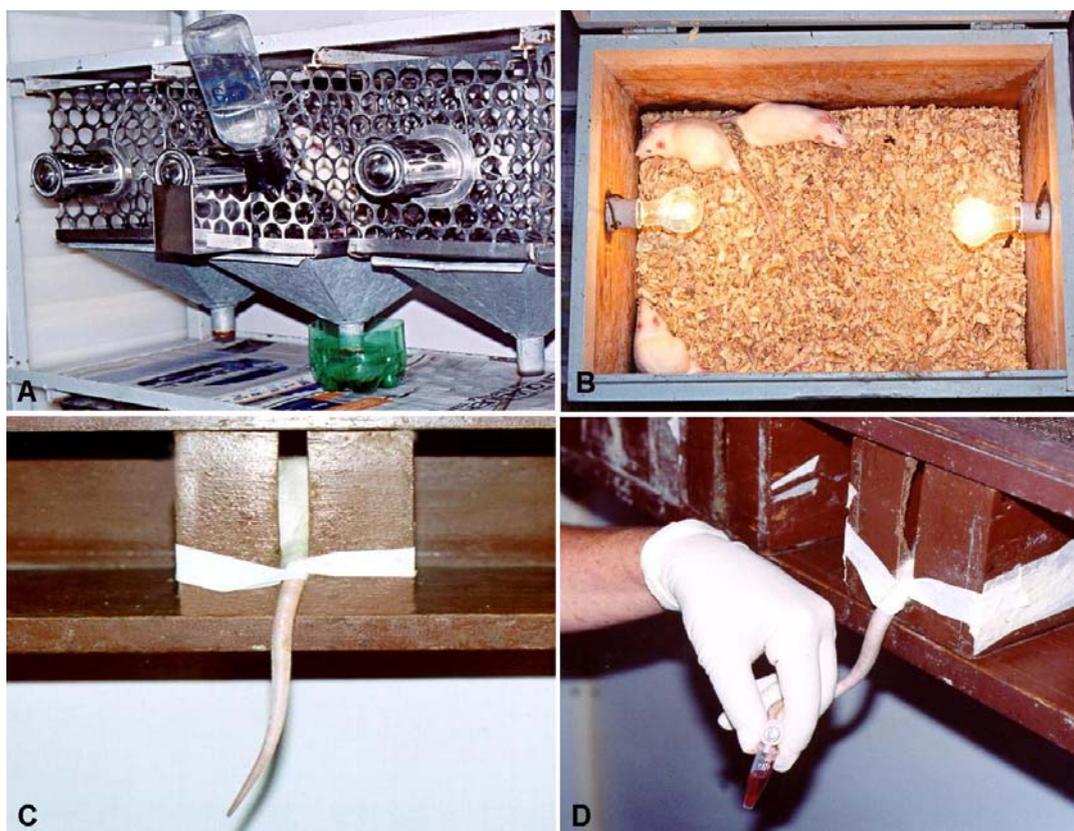


Figura 2 - Ilustração da metodologia utilizada na coleta das variáveis clínicas e laboratoriais estudadas: A) animal em gaiola metabólica para obtenção dos dados clínicos; B) processo de aquecimento dos animais para coleta de sangue da cauda; C) contenção do animal e exposição da cauda; D) coleta de sangue por secção da cauda para realização dos exames bioquímicos no seguimento.

7.4. Indução do diabetes experimental

O diabetes foi induzido pela administração de uma solução aquosa de aloxana a 2% (5,6 dioxiuracil monohidrato – Sigma Co, USA), injetada por via endovenosa, em dose única de 42mg/kg de peso corporal, utilizando-se uma das veias da cauda do animal.

No presente estudo somente foram utilizados animais com sinais clínicos de diabetes grave, glicemia de jejum > 250mg/dL e glicose urinária \geq 3000mg/dL, em duas determinações sucessivas (7 e 14 dias

após a indução). Animais diabéticos cujos critérios descritos não foram preenchidos foram excluídos do experimento.

7.5. Indução da ferida cirúrgica

A ferida cirúrgica foi obtida no 15º dia de seguimento normal ou de indução do diabetes, com os animais em jejum de 12h. Após anestesia geral e tricotomia da região anterior do abdome, os ratos foram posicionados em superfície plana, com extensão dos membros, sendo realizada anti-sepsia do abdome com álcool iodado a 2%. Foi feita uma incisão mediana, médio-umbilical, de 4 cm de extensão, interessando pele e subcutâneo. Imediatamente após a realização da incisão foi realizada a sua hemostasia por compressão, seguida da síntese da mesma, em plano único, com fio monofilamentar de nylon 4-0, com agulha curva, 3/8 de círculo, com 1,5cm de comprimento (Ethicon Inc.,USA). Foram utilizados pontos simples separados, passados a cada 8 mm de distância, um do outro. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições limpas, não-estéreis. A Fig.3 ilustra a demarcação, a diérese e a síntese das incisões.

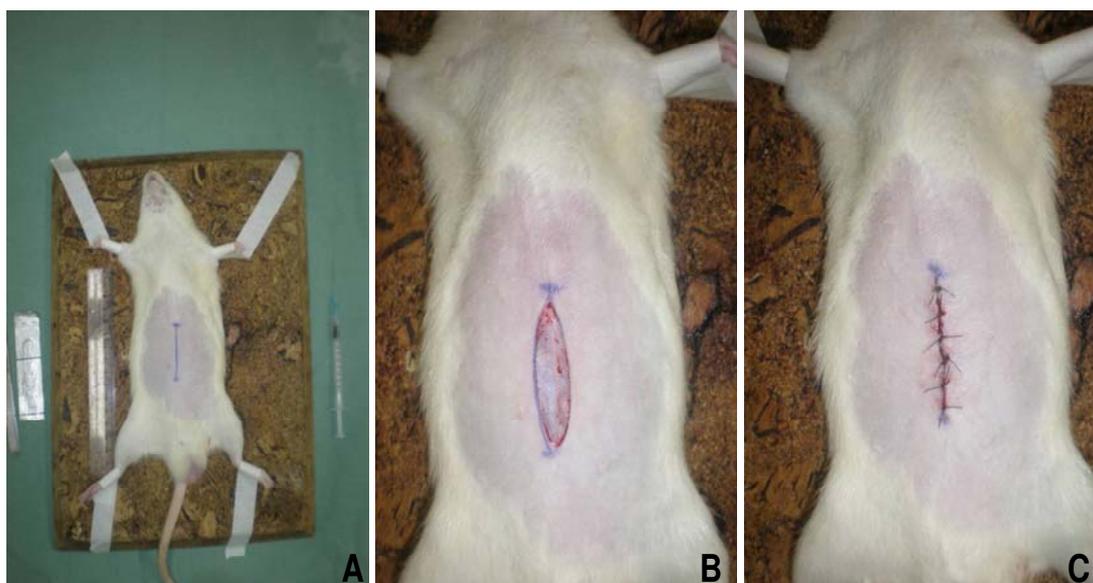


Figura 3 - Ilustração das etapas de obtenção da ferida cirúrgica: A) animal anestesiado com demarcação da área da incisão; B) realização da incisão cirúrgica mediana; C) síntese da incisão com mononylon 4.0

7.6. Posicionamento dos eletrodos e tratamento pela CEC e iontoforese

Para a realização do tratamento das cicatrizes com CEC e a iontoforese transdermal, dois eletrodos foram posicionados temporariamente na pele de cada animal, sendo o primeiro colocado próximo ao ângulo inferior da incisão abdominal e o segundo na região dorsal interescapular. Ambos eletrodos foram conectados a um eletroestimulador de corrente contínua (IBRAMED), sendo que o eletrodo abdominal foi conectado ao ânodo (positivo) e o da região dorsal ao cátodo (negativo). A corrente elétrica emitida teve amplitude padronizada de 2mA, com sessões de tratamento com duração de 10 minutos. Cada sessão foi realizada em quatro momentos distintos do pós-operatório, sendo o primeiro imediatamente após a realização da incisão cirúrgica (PO imediato) e os demais, nos três dias subsequentes (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 interposta uma pequena almofada de gaze umedecida com 4 ml de água destilada (animais do G₃ e G₄) ou com igual quantidade de zinco solubilizado, na concentração de 100mg/kg de peso corporal (animais do G₅ e G₆). A Fig. 4 ilustra o aparato necessário para o tratamento das incisões cirúrgicas com a CEC e a iontoforese transdermal.

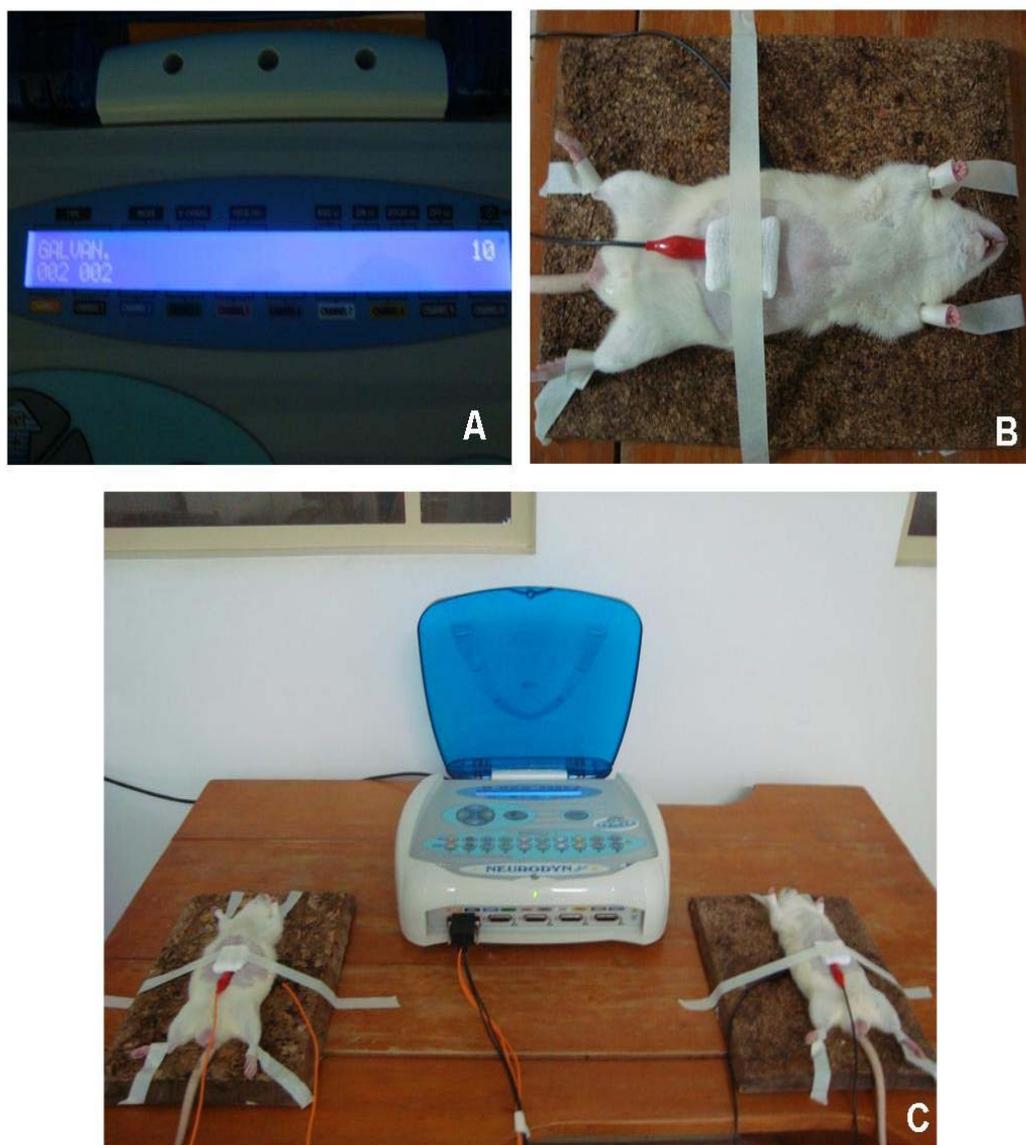


Figura 4: Ilustração do preparo dos animais para o tratamento por meio da CEC ou iontoforese: A) Amplitude padronizada de 2 mA, duração da sessão e utilização da corrente Galvânica; B) detalhe do animal com os eletrodos fixados para o início do tratamento; C) animais durante o tratamento eletroterápico.

7.7. Exames laboratoriais

As dosagens de glicose sanguínea e urinária foram realizadas pelo método da glicose oxidase com utilização do equipamento Vitro da Johnson & Johnson. As dosagens de insulina plasmática foram feitas por radioimunoensaio, em fase sólida (DPC-Medlab – São Paulo), e a hemoglobina glicosilada por eletroforese, em sangue total, utilizando “kits” da marca Sebia.

7.8. Estudo biomecânico

Para a realização do estudo biomecânico, um segmento retangular de pele, medindo 1,5cm de comprimento por 0,8cm de largura, contendo no seu centro a incisão cirúrgica, foi retirado perpendicularmente à linha medial do abdome, de cada animal do estudo. Este segmento foi imediatamente imerso em soro fisiológico a 37°C, contendo cloridrato de papaverina (250mg/ml), durante um período de 30 minutos, em banho-maria. A seguir, cada segmento de pele, contendo a incisão cirúrgica no seu centro, foi preso em ambas as extremidades, por duas garras de preensão, deixando-se um espaço de 0,5cm entre as mesmas. A seguir, o segmento de pele foi tracionado até a ruptura (força tênsil ou de ruptura) por um sistema de tração, acoplado a um transdutor de força, de uma máquina universal de ensaios biomecânicos (EMIC, modelo DL 10.000) que opera com precisão aproximada de $0,018 + F/3700$ KN, apurada dentro das especificações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), sendo sua aferição realizada periodicamente pelo fabricante. Esta máquina trabalha em conjunto com um microcomputador com sistema operacional “Windows”, utilizando o “software” Mtest versão 1.0, que permite a realização de ensaios segundo método pré-definido pelo próprio usuário. Neste estudo foram definidos os seguintes parâmetros: célula de carga: 5 kg; sentido: tração; velocidade de aplicação da carga: 30mm/min; escalas: grama-força por milímetros (gf/mm). A Fig. 5

ilustra as etapas executadas para a obtenção das medidas da força de ruptura das cicatrizes.

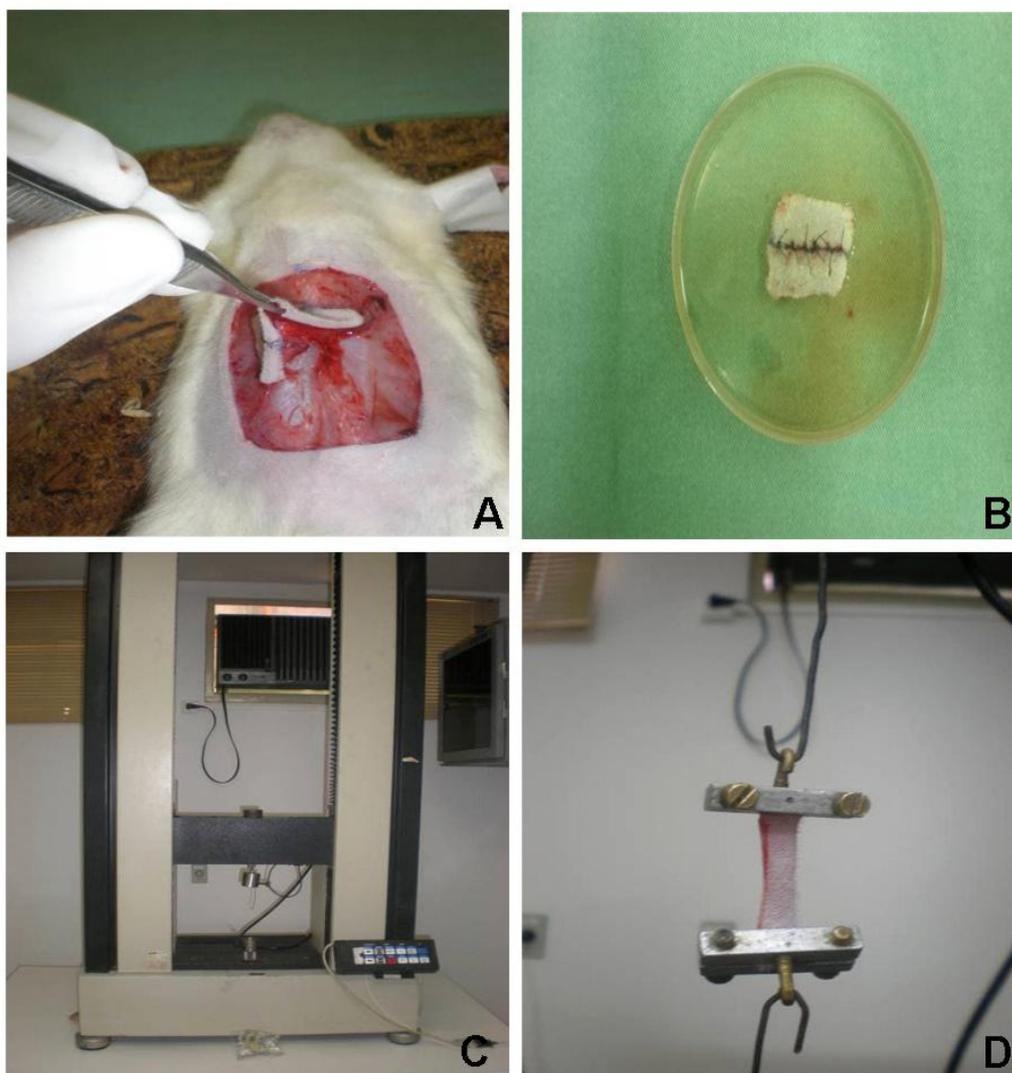


Figura 5 – Ilustração das etapas para obtenção das medidas da força de ruptura das cicatrizes: A) retirada do retalho de pele contendo a incisão cirúrgica; B) retalho de pele em imersão em solução fisiológica, a ser preparado para tração; C) máquina universal utilizada na realização dos ensaios biomecânicos; D) tração do seguimento de pele contendo a incisão no centro.

7.9. Dosagem da hidroxiprolina tecidual

Para a dosagem da hidroxiprolina tecidual um segmento semelhante ao utilizado no ensaio biomecânico foi retirado, pesado em balança Modelo JS-110, capacidade 110 gramas (YMC Co Ltda.) e em seguida, armazenado em super *freezer* a -80°C . A dosagem foi feita conforme o método descrito por SWITZER e col., (1991).

O tecido retirado foi seco por um período de quatro horas no SpeedVac Concentrator SC -100, preso a um sifão condensador refrigerado TR 100 e a uma bomba a vácuo VP 100 (Savant Instruments, Farmingdale, NY). O tecido seco foi pesado e as amostras hidrolisadas durante a noite a 80°C com HCl 6N (1ml/10mg de tecido seco). Uma alíquota de 50 μl do hidrolisado foi transferida para um tubo de Eppendorf e seco novamente no Speed Vac Concentrator. Um mililitro de água deionizada foi adicionado à amostra. Após, foi acrescentado 1 mililitro de borato de potássio (pH 8,7) a fim de se manter o pH estável e ,então, a amostra foi oxidada com 0,3 ml de solução de cloramina T por 20 minutos. A oxidação foi interrompida pela adição de 1 mililitro de tiosulfato de sódio 3,6M. A solução foi saturada com 1,5 gramas de cloreto de potássio e deixada em banho-maria a 90°C por 20 minutos. A seguir, os tubos foram resfriados, seguidos de adição de 2,5 ml de tolueno. Os tubos, então, foram centrifugados a baixa velocidade e 1 mililitro dessa solução foi transferido para um tubo de ensaio, seguida da adição de 0,6 ml de solução de Ehrlich, por 30 minutos. A determinação da concentração de hidroxiprolina tecidual foi, então, realizada por leitura em espectrofotométrica (Ultospec 3000, Pharmacia Modelo 802105-20) tendo como controle um contra *blanck*.

7.10. Análise estatística

O estudo das variáveis clínicas (peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese), laboratoriais (glicose sangüínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada, insulina plasmática e hidroxiprolina tecidual) e biomecânicas (força de ruptura das cicatrizes), segundo os 6 grupos experimentais e os 4 momentos de sacrifício, foi realizado através da análise de variância para o esquema fatorial 6x4, no delineamento inteiramente casualizado, complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey para variáveis homogêneas ou paramétricas (MONTGOMERY, 1991), ou pela análise não-paramétrica de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, para as variáveis que tiverem resultados com distribuição heterogênea.

Todas as discussões estatísticas do estudo foram realizadas no nível de significância de 5% ou $P < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Achados clínicos e laboratoriais

Ratos controles não-diabéticos (G1, G3 e G5) apresentaram parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com os observados em animais de mesma linhagem, em todos os períodos de avaliação do experimento. Em contraste, ratos diabéticos (G2, G4, G6), sem qualquer tratamento da doença, evoluíram com perda acentuada de peso corporal e aumento significativo ($P < 0,01$) da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, quando comparados com animais normais, não-diabéticos (Tabs. 1 a 4 e Figs. 6 a 9). Os níveis de glicose sanguínea, glicose urinária e de hemoglobina glicosilada também foram elevados em ratos diabéticos de todos os grupos estudados, sendo os valores plasmáticos da insulina significativamente baixos ($P < 0,001$). Os resultados bioquímicos são apresentados nas Tabs. numeradas de 5 a 8 e ilustrados nas Figs. numeradas de 10 a 13.

Aproximadamente 32% 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, 8 animais apresentaram infecção/deiscência da incisão cirúrgica; 14 animais morreram no pós-operatório imediato da cirurgia de obtenção da ferida cirúrgica em decorrência do trauma anestésico - cirúrgico; 6 animais morreram no seguimento tardio, até 21 dias, em decorrência de pneumonia. Não houve complicações ou óbitos nos animais dos grupos controles não-diabéticos.

Tabela 1 – Médias \pm SD dos valores do peso corporal (g), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento				
	Início	4º dia	7º dia	14º dia	21º dia
G1-N s/tto.	260,8 \pm 12,5	262,3 \pm 8,8	270,2 \pm 9,0	300,8 \pm 8,5	320,6 \pm 12,3
G2-D s/tto.	270,3 \pm 10,4 ^{ns}	260,2 \pm 8,4 ^{ns}	240,2 \pm 8,6*	225,4 \pm 7,6*	206,4 \pm 7,8*
G3-N+CEC	265,8 \pm 11,2	270,3 \pm 10,4	280,3 \pm 8,0	298,7 \pm 10,3	325,8 \pm 11,5
G4-D+CEC	260,5 \pm 10,0 ^{ns}	250,5 \pm 8,0 ^{ns}	225,6 \pm 7,5*	202,4 \pm 8,0*	196,8 \pm 6,8*
G5-N+CEC+Zn	270,4 \pm 9,6	265,5 \pm 8,6	278,6 \pm 8,8	300,5 \pm 8,4	328,6 \pm 10,4
G6-D+CEC+Zn	268,5 \pm 10,2 ^{ns}	258,0 \pm 9,3 ^{ns}	230,5 \pm 9,2*	200,6 \pm 7,5*	190,4 \pm 8,0*

^{ns} G1=G2=G3=G4=G5=G6 para $P > 0,05$ no início e no 4º dia de seguimento

* G2=G4=G6 < G1=G3=G5 para $P < 0,01$ no 7º, 14º e 21º dia de seguimento

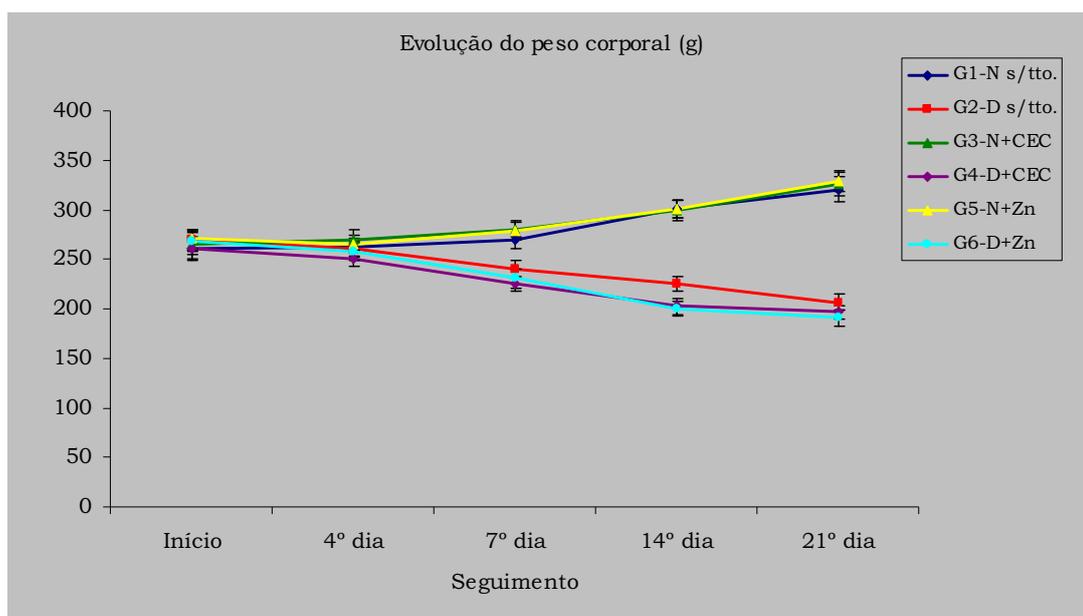


Figura 6 – Evolução do peso corporal, em gramas, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Tabela 2 – Médias \pm SD dos valores da ingestão hídrica (ml/24h), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento

Grupos	Seguimento				
	Início	4° dia	7° dia	14° dia	21° dia
G1-N s/tto.	30,6 \pm 4,8	16,6 \pm 3,5	19,0 \pm 4,0	20,6 \pm 4,5	25,2 \pm 7,5
G2-D s/tto.	82,5 \pm 20,2*	98,4 \pm 25,4*	100,6 \pm 27,5*	100,5 \pm 25,8*	120,4 \pm 30,0*
G3-N+CEC	19,0 \pm 3,5	22,6 \pm 4,5	18,0 \pm 3,5	20,0 \pm 5,6	22,8 \pm 4,6
G4-D+CEC	101,0 \pm 20,0*	100,5 \pm 28,4*	112,6 \pm 30,5*	114,4 \pm 30,2*	100,4 \pm 26,4
G5-N+CEC+Zn	25,0 \pm 4,5	30,0 \pm 5,6	21,2 \pm 4,2	25,4 \pm 8,4	28,4 \pm 6,5
G6-D+CEC+Zn	100,8 \pm 25,6*	120,5 \pm 28,8*	110,4 \pm 28,8	113,5 \pm 30,2	105,5 \pm 25,0*

* G2=G4=G6 > G1=G3=G5 para P < 0,01 no início e no 7°, 14° e 21° dia de seguimento

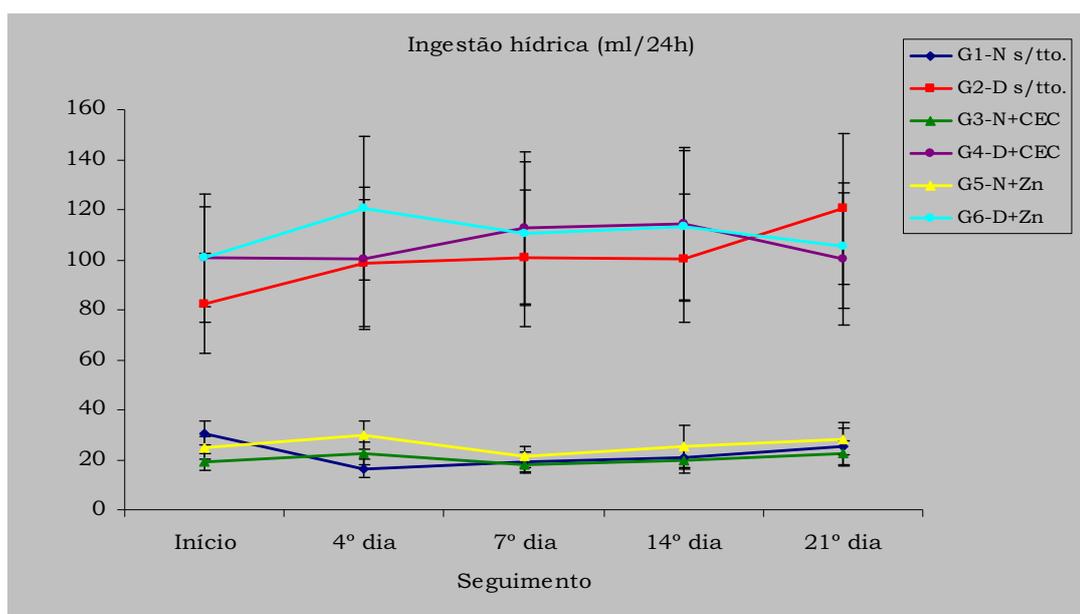


Figura 7 – Evolução da ingestão hídrica, em ml/24h, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Tabela 3 – Médias \pm SD dos valores da ingestão alimentar (g/12h), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento				
	Início	4º dia	7º dia	14º dia	21º dia
G1-N s/tto.	15,6 \pm 4,0	20,0 \pm 5,2	20,5 \pm 4,5	18,4 \pm 4,0	17,5 \pm 3,5
G2-D s/tto.	35,0 \pm 6,5*	33,4 \pm 6,0*	38,4 \pm 5,5*	30,0 \pm 6,1*	28,8 \pm 4,6*
G3-N+CEC	16,0 \pm 3,5	15,5 \pm 3,8	18,4 \pm 3,6	18,0 \pm 4,2	15,6 \pm 3,5
G4-D+CEC	30,8 \pm 6,4*	32,6 \pm 6,0*	33,4 \pm 6,4*	35,0 \pm 5,5*	30,2 \pm 5,6*
G5-N+CEC+Zn	16,8 \pm 4,0	16,4 \pm 3,5	18,0 \pm 4,2	20,6 \pm 4,2	18,4 \pm 4,0
G6-D+CEC+Zn	35,3 \pm 7,2*	33,8 \pm 7,3*	28,8 \pm 6,0*	32,8 \pm 6,7*	30,0 \pm 6,4*

* G2=G4=G6 > G1=G3=G5 para P < 0,05 no início e no 7º, 14º e 21º dia de seguimento

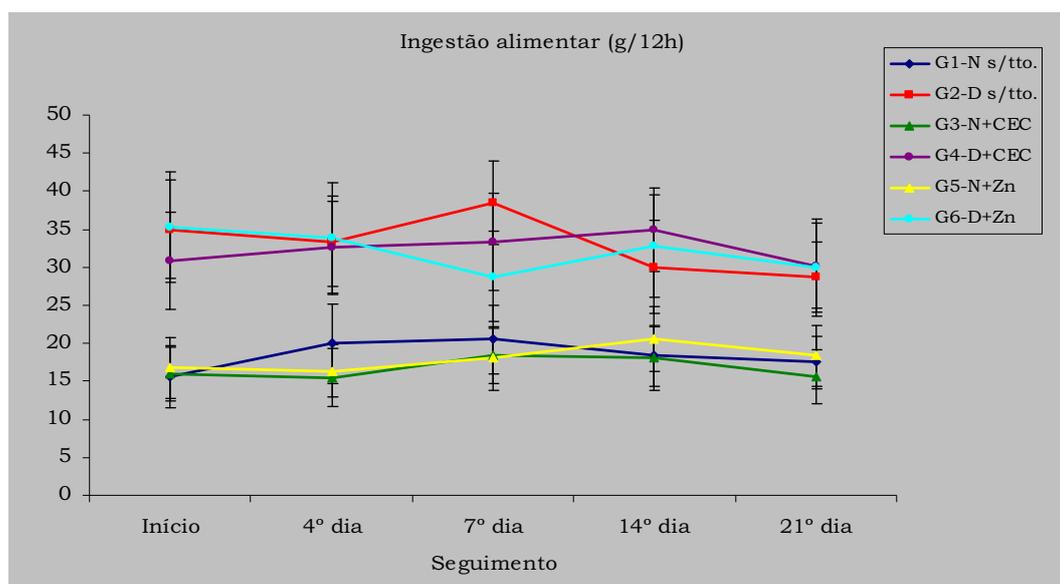


Figura 8 – Evolução da ingestão alimentar, em g/12h, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Tabela 4 – Médias \pm SD dos valores da diurese (ml/24h), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento				
	Início	4º dia	7º dia	14º dia	21º dia
G1-N s/tto.	6,5 \pm 1,2	8,5 \pm 2,0	6,2 \pm 1,8	9,6 \pm 2,5	8,0 \pm 2,0
G2-D s/tto.	47,0 \pm 8,4*	43,0 \pm 10,2*	55,0 \pm 8,0*	62,3 \pm 6,8*	48,0 \pm 6,5*
G3-N+CEC	8,8 \pm 2,4	10,0 \pm 2,6	10,6 \pm 2,4	8,6 \pm 2,9	12,0 \pm 3,0
G4-D+CEC	44,0 \pm 8,2*	56,0 \pm 7,6*	54,6 \pm 8,4*	55,0 \pm 6,5*	58,4 \pm 7,2*
G5-N+CEC+Zn	10,5 \pm 2,6	10,4 \pm 1,8	8,8 \pm 2,2	12,4 \pm 2,0	10,5 \pm 2,2
G6-D+CEC+Zn	50,2 \pm 7,5*	55,0 \pm 8,0*	58,0 \pm 8,2*	46,4 \pm 6,5*	56,4 \pm 7,8*

* G2=G4=G6 > G1=G3=G5 para P < 0,01 no início e no 7º, 14º e 21º dia de seguimento

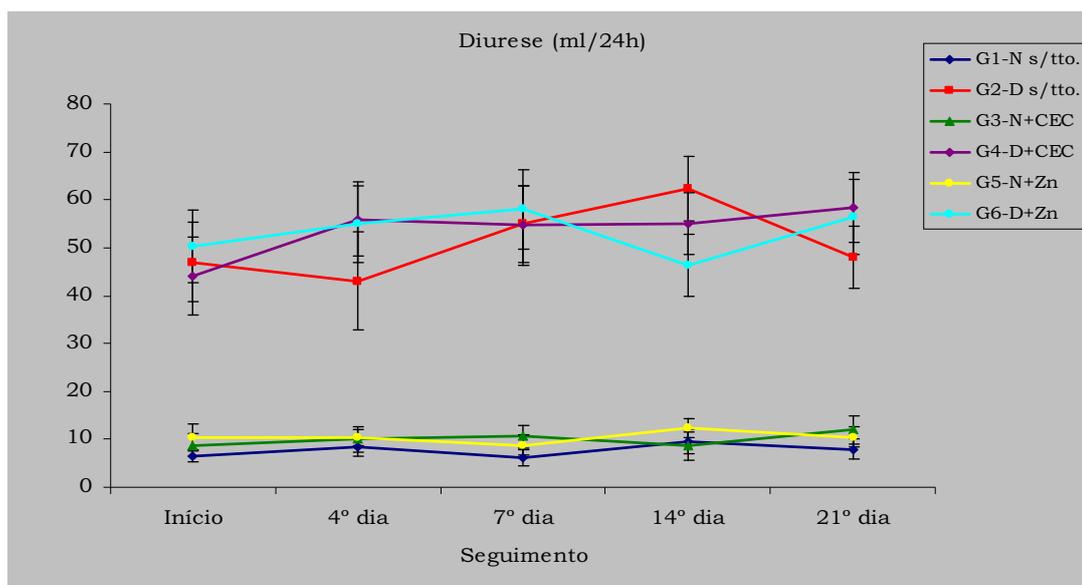


Figura 9 – Evolução da diurese, em ml/24h, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Tabela 5 – Médias \pm SD dos valores da glicemia de jejum (mg/dl), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento				
	Início	4º dia	7º dia	14º dia	21º dia
G1-N s/tto.	122,8 \pm 10,4	118,0 \pm 9,5	106,4 \pm 8,8	114,0 \pm 9,6	110,6 \pm 10,0
G2-D s/tto.	350,4 \pm 38,5*	367,2 \pm 28,9*	336,0 \pm 32,5*	388,4 \pm 32,0	405,0 \pm 38,5*
G3-N+CEC	115,0 \pm 10,0	108,0 \pm 8,6	100,4 \pm 7,5	115,0 \pm 8,5	100,6 \pm 10,2
G4-D+CEC	390,6 \pm 42,0*	396,4 \pm 36,8*	412,0 \pm 38,4*	359,0 \pm 38,5*	400,0 \pm 40,5*
G5-N+CEC+Zn	110,8 \pm 12,4	100,8 \pm 11,5	116,0 \pm 12,0	105,0 \pm 9,8	100,3 \pm 10,6
G6-D+CEC+Zn	360,6 \pm 40,2*	388,0 \pm 42,4	376,5 \pm 38,4*	368,7 \pm 36,7*	394,6 \pm 38,7*

* G2=G4=G6 > G1=G3=G5 para P < 0,01 no início e no 7º, 14º e 21º dia de seguimento

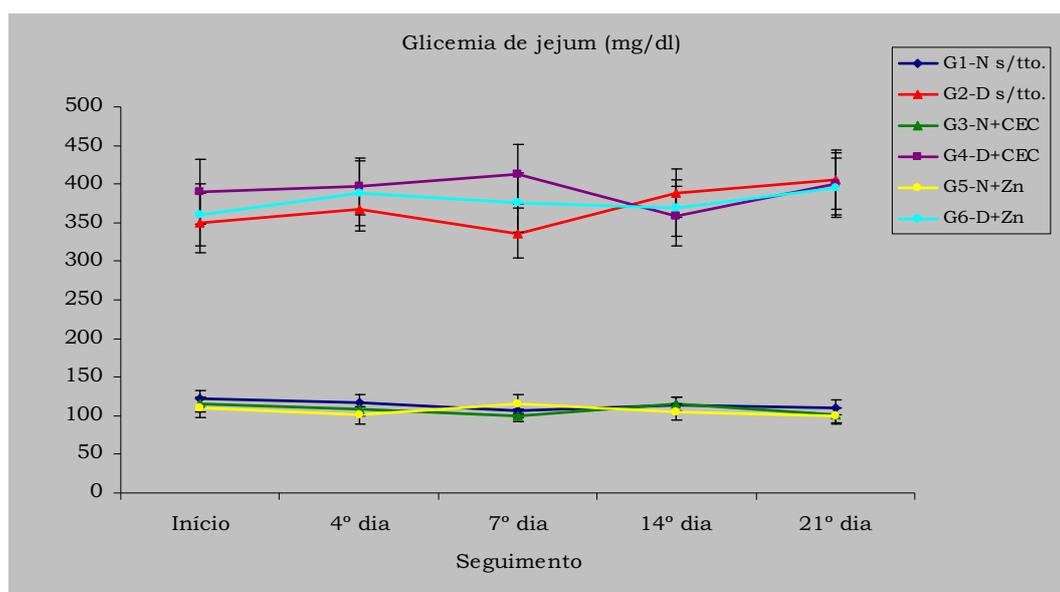


Figura 10 – Evolução da glicemia de jejum, em mg/dl, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Tabela 6 – Médias \pm SD dos valores da glicose urinária (mg/dl) nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento									
	Início		4º dia		7º dia		14º dia		21º dia	
G1 – N s/tto.	8,4 \pm 3,4		10,6 \pm 4,2		10,2 \pm 4,5		4,2 \pm 3,4		7,8 \pm 3,7	
G2 – D s/tto.	4756,4 \pm 976,0		4120,6 \pm 986,4*		4456,4 \pm 1005,4*		5125,4 \pm 1110,4*		4218,3 \pm 950,4*	
G3 – N+CEC	10,8 \pm 4,3		12,4 \pm 5,2		8,6 \pm 4,6		12,6 \pm 4,5		10,0 \pm 4,8	
G4 – D+CEC	3960,6 \pm 756,4*		4506,4 \pm 890,4*		4200,4 \pm 900,6*		4760,0 \pm 931,0*		4005,6 \pm 927,6*	
G5 – N+CEC+Zn	6,4 \pm 4,0		8,4 \pm 4,7		10,2 \pm 4,8		10,6 \pm 5,2		13,5 \pm 4,9	
G6 – D+CEC+Zn	5210,5 \pm 1005,6*		4634,4 \pm 948,6*		4842,0 \pm 862,0*		4912,8 \pm 828,4*		4212,4 \pm 850,0*	

*G2=G4=G6 > G1=G3=G5 para P<0,001 no 7º, 14º e 21º dia de seguimento.

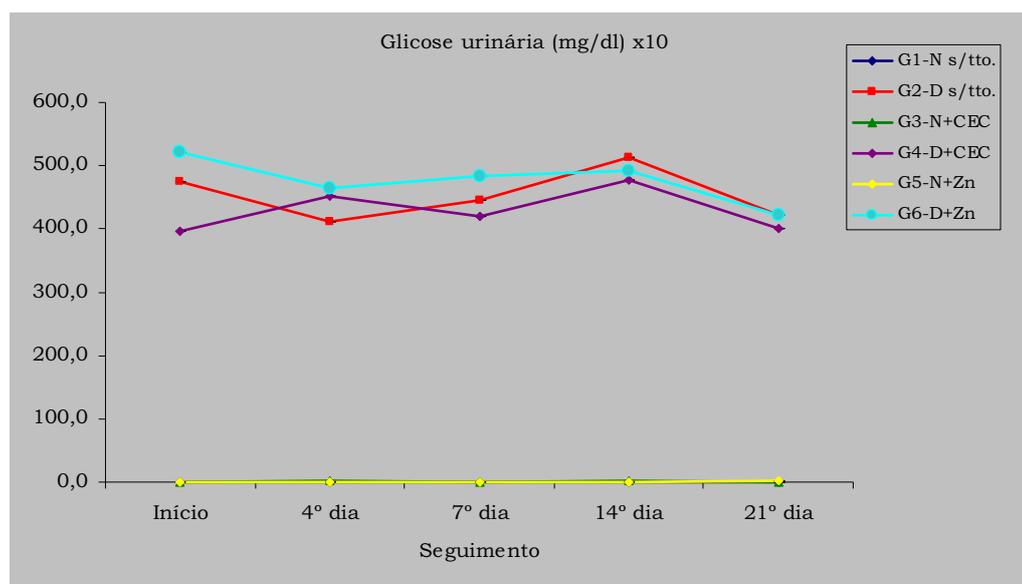


Figura 11 – Evolução da glicose urinária, em mg/dl x 10, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Tabela 7 - Médias \pm SD dos valores da hemoglobina glicosilada (%), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento				
	Início	4º dia	7º dia	14º dia	21º dia
G1 - N s/tto.	4,2 \pm 0,4	4,7 \pm 0,3	4,0 \pm 0,5	4,6 \pm 0,2	4,5 \pm 0,4
G2 - D s/tto.	12,4 \pm 1,0*	11,8 \pm 1,2*	10,8 \pm 0,9*	11,5 \pm 1,2*	11,0 \pm 1,2*
G3 - N+CEC	3,8 \pm 0,3	3,8 \pm 0,5	4,2 \pm 0,6	4,0 \pm 0,5	4,3 \pm 0,2
G4 - D+CEC	10,5 \pm 0,9*	10,8 \pm 1,0*	11,4 \pm 1,1*	10,6 \pm 1,2*	12,4 \pm 1,2*
G5 - N+CEC+Zn	4,5 \pm 0,4	4,2 \pm 0,3	4,4 \pm 0,4	4,5 \pm 0,4	4,7 \pm 0,3
G6 - D+CEC+Zn	11,6 \pm 1,2*	12,0 \pm 1,0*	11,5 \pm 0,9*	10,8 \pm 0,9*	11,0 \pm 1,1*

*G2=G4=G6 > G1=G3=G5 para P<0,001 no 7º, 14º e 21º dia de seguimento.

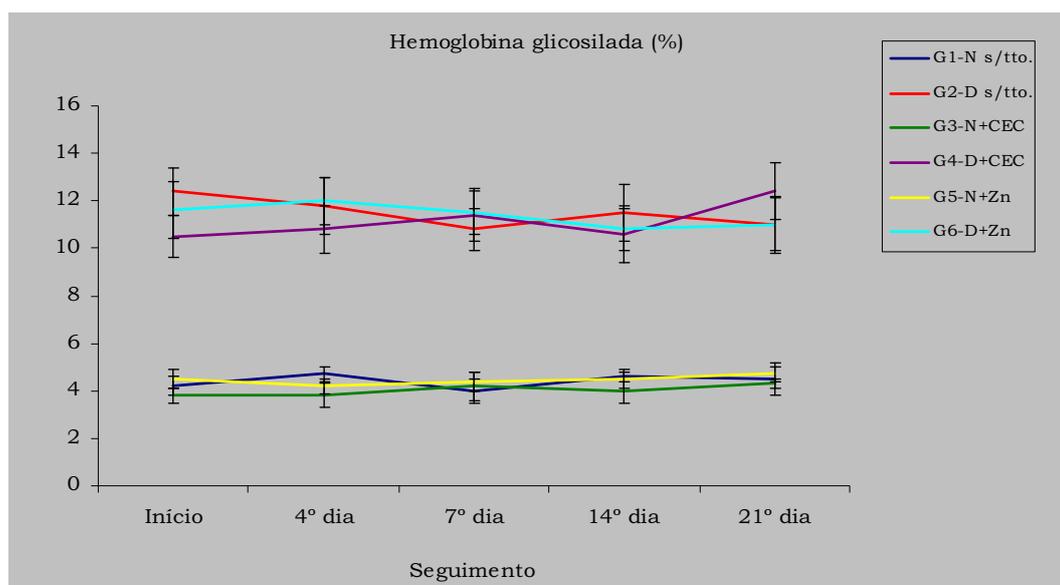


Figura 12 – Evolução do perfil eletroforético da hemoglobina glicosilada, em %, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Tabela 8 – Médias \pm SD dos valores da insulina plasmática (μ U/ml), nos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento				
	Início	4º dia	7º dia	14º dia	21º dia
G1 – N s/tto.	44,6 \pm 4,0	40,6 \pm 4,2	42,5 \pm 4,3	43,5 \pm 3,8	45,4 \pm 4,0
G2 – D s/tto.	20,4 \pm 3,5*	22,4 \pm 3,2*	20,0 \pm 3,0*	24,6 \pm 4,1*	23,8 \pm 3,6*
G3 – N+CEC	40,2 \pm 4,4	41,6 \pm 3,9	40,4 \pm 3,8	44,6 \pm 4,0	40,8 \pm 4,3
G4 – D+CEC	26,0 \pm 3,5*	24,5 \pm 3,5*	20,8 \pm 4,0	24,0 \pm 3,8*	22,8 \pm 4,3*
G5 – N+CEC+Zn	43,8 \pm 4,5	46,5 \pm 4,4	40,2 \pm 4,2	46,5 \pm 4,2	44,5 \pm 4,1
G6 – D+CEC+Zn	20,9 \pm 4,0*	22,0 \pm 3,5*	22,0 \pm 3,8*	24,4 \pm 4,4*	23,8 \pm 4,0*

*G1=G3=G5 > G2=G4=G6 para P<0,001 no 7º, 14º e 21º dia de seguimento

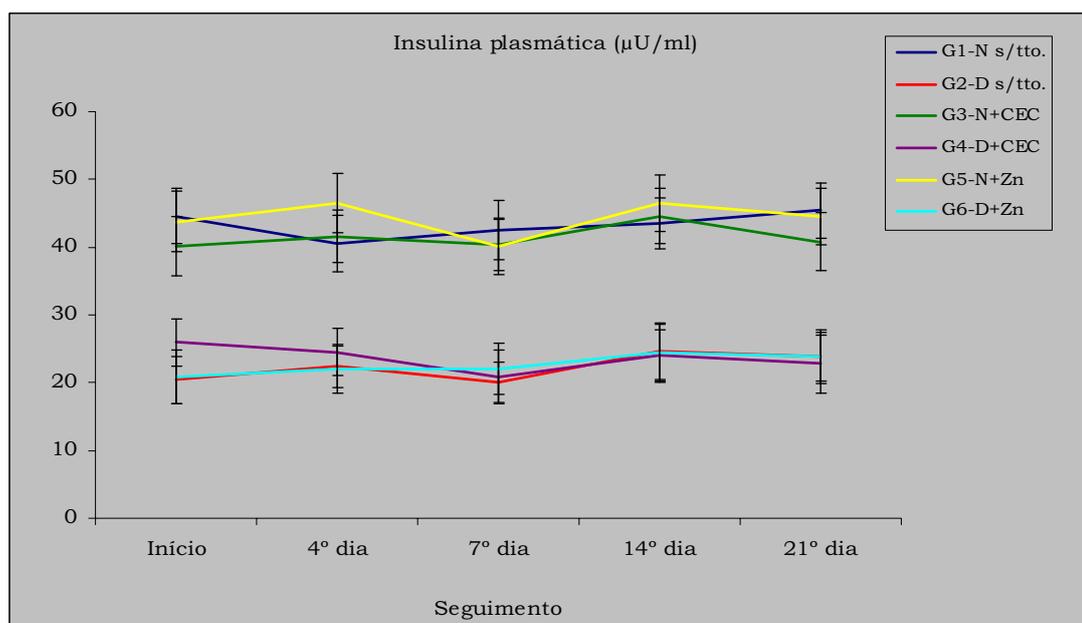


Figura 13 – Evolução da insulina plasmática, em μ U/ml, em animais dos 6 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

2. Medidas da força de ruptura das cicatrizes cirúrgicas

A força de ruptura de cicatrizes praticadas na pele de ratos normais e diabéticos, com ou sem tratamento da incisão cirúrgica, com CEC isolada ou associada ao zinco, não apresentou diferenças estatisticamente significantes, no 4º dia de pós-operatório ($G1=G2=G3=G4=G5=G6$ para $P>0,05$).

Ratos diabéticos, porém, com ou sem tratamento da incisão cirúrgica, com CEC isolada ou associada ao zinco, apresentaram valores da força de ruptura significativamente menores que os observados em ratos controles normais, submetidos às mesmas condições experimentais, em todos os períodos de avaliação ($G2<G1$ para $P<0,05$ no 7º e 14º P.O. e para $P<0,01$ no 21º P.O.; $G4<G3$ para $P<0,01$ no 7º e 14º P.O. e para $P<0,001$ no 21º P.O.; $G6<G5$ para $P<0,001$ no 7º, 14º e 21º P.O.).

A CEC isolada ou associada ao zinco, por sua vez, teve efeito positivo sobre a força de ruptura de cicatrizes cirúrgicas efetuadas na pele de ratos normais controles, quando comparada com ratos normais controles sem qualquer tratamento da incisão, no 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório ($G3>G1$ para $P<0,05$ no 7º e 14º P.O. e para $P<0,001$ no 21º P.O.).

Por outro lado, o tratamento da incisão cirúrgica com CEC isolada não teve efeito benéfico sobre a força de ruptura de cicatrizes da pele de ratos diabéticos, no 7º, 14º e 21º dia de P.O ($G2=G4$ para $P>0,05$).

Em contraste, o tratamento da incisão cirúrgica com CEC associada ao zinco teve efeito benéfico sobre a força de ruptura de cicatrizes da pele de ratos diabéticos em todos os períodos de seguimento do experimento ($G6>G4$ para $P<0,01$). A Tab. 9 e as Figs. numeradas de 14 a 17 demonstram os achados da força de ruptura observada nos animais dos 6 grupos experimentais, nos 4 períodos de avaliação.

Tabela 9 – Médias \pm 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.

Grupos	Seguimento			
	4º dia	7º dia	14º dia	21º dia
G1 – N s/tto.	5,96 \pm 2,93	176,98 \pm 5,62	304,16 \pm 5,38	656,92 \pm 22,12
G2 – D s/tto.	4,34 \pm 2,16 ^{ns}	35,60 \pm 2,57*	95,52 \pm 2,23*	256,25 \pm 10,84*
G3 – N+CEC	6,14 \pm 2,84	312,78 \pm 37,32	533,58 \pm 96,55	1412,80 \pm 125,82
G4 – D+CEC	5,20 \pm 2,44 ^{ns}	127,75 \pm 21,62*	205,57 \pm 36,79*	655,60 \pm 98,25*
G5 – N+CEC+Zn	6,36 \pm 2,40	414,78 \pm 55,35	682,30 \pm 67,42	1678,40 \pm 151,12
G6 – D+CEC+Zn	4,90 \pm 2,36 ^{ns}	189,41 \pm 22,65*	342,61 \pm 95,74*	805,26 \pm 62,35*

^{ns} G1=G2=G3=G4=G5=G6 no 4º dia de pós-operatório (P>0,05).

* G2<G1 no 7º e 14º dia (P<0,05) e no 21º dia de pós-operatório (P<0,01); G4<G3 no 7º e 14º dia (P<0,01) e no 21º dia de pós-operatório (P<0,001); G6<G5 no 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório (P<0,001)

Efeitos dos tratamentos: G3=G5>G1 no 7º e 14º dia (P<0,05) e no 21º dia de pós-operatório (P<0,001); G2=G4 no 7º e 14º dia (P>0,05) e G4>G2 no 21º dia de pós-operatório (P<0,05); G6>G4=G2 no 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório (P<0,01).

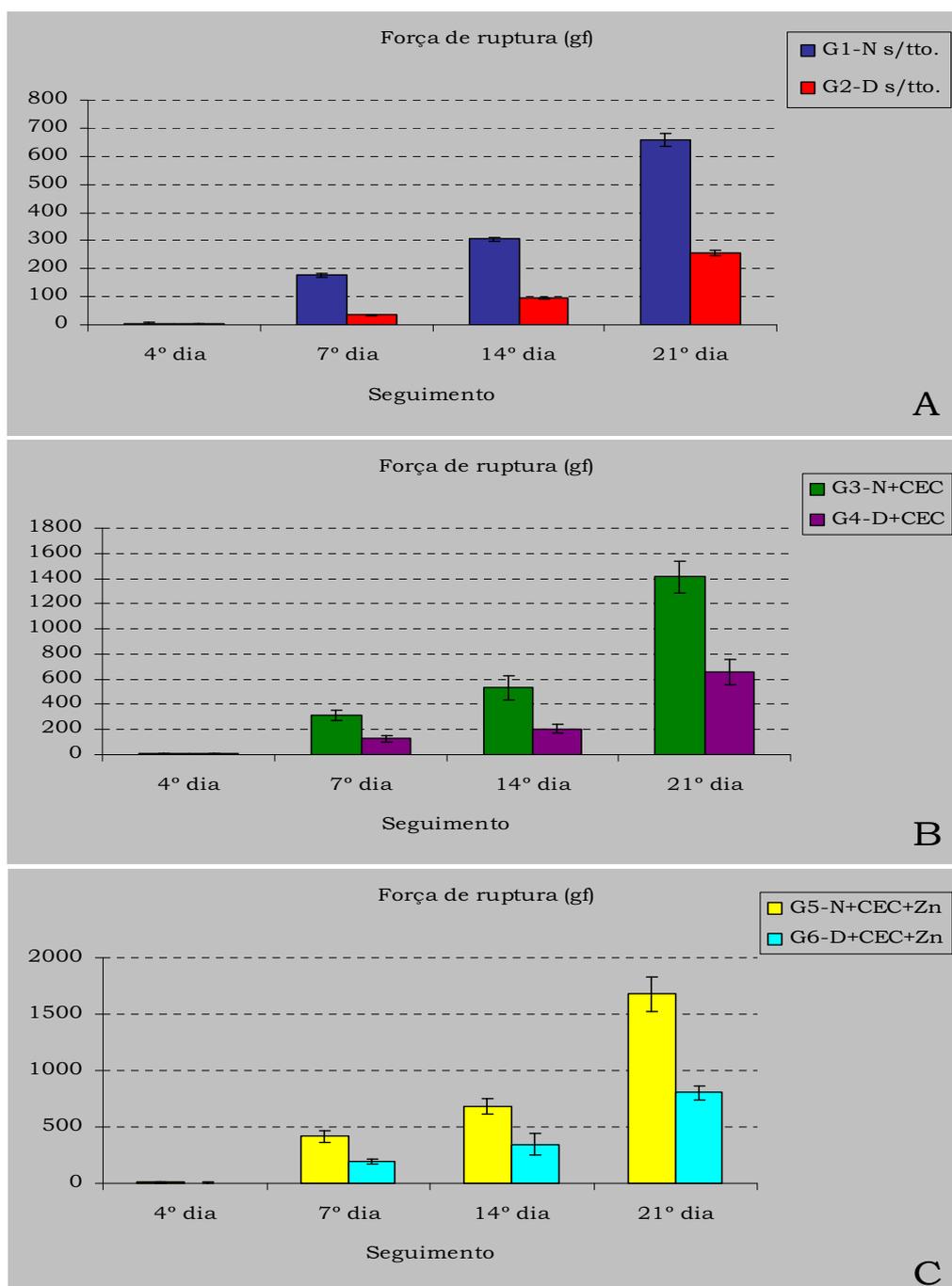


Figura 14 – Ilustração dos efeitos do diabetes sobre os valores da força de ruptura de cicatrizes de animais normais e diabéticos, com e sem tratamento da incisão, durante os 4 momentos de avaliação do experimento: A – ratos sem tratamento da incisão; B – ratos com incisão tratada com CEC isolada; C – ratos tratados com CEC + Zn.

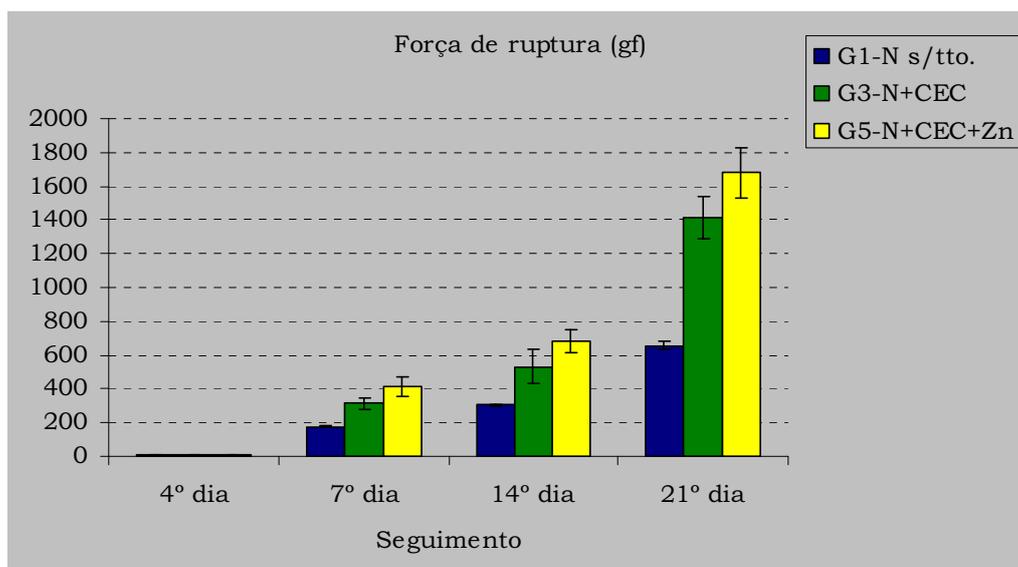


Figura 15 – Ilustração dos efeitos da CEC isolada e da CEC + Zn, administrado pela iontoforese, sobre os valores da força de ruptura de cicatrizes de animais normais, quando comparados com animais sem tratamento da incisão, nos 4 momentos de avaliação do experimento.

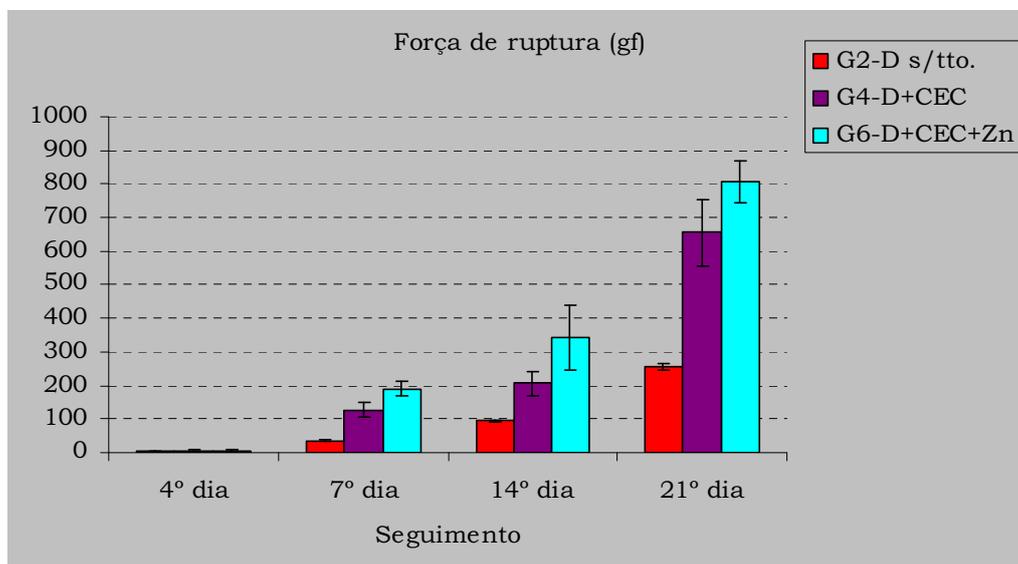


Figura 16 – Ilustração dos efeitos da CEC isolada e da CEC + Zn, administrado pela iontoforese, sobre os valores da força de ruptura de cicatrizes de animais diabéticos, quando comparados com animais sem tratamento da incisão, nos 4 momentos de avaliação do experimento.

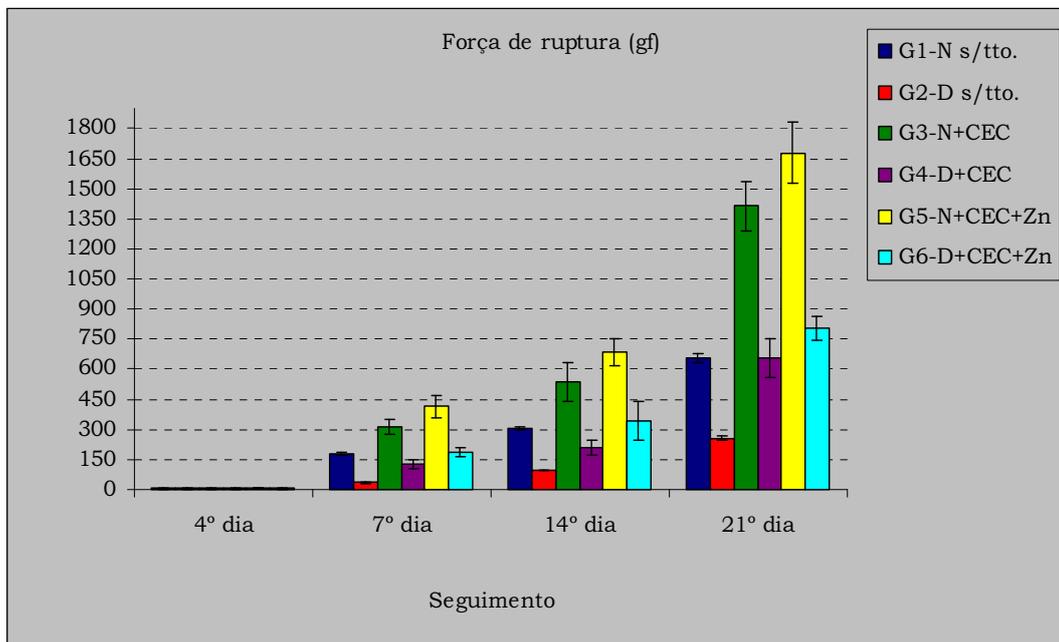


Figura 17 - Variação dos valores da força de ruptura (gf) de cicatrizes realizadas na pele de ratos, dos 6 grupos experimentais, sacrificados nos 4 momentos do experimento.

3. Concentração de hidroxiprolina tecidual nas cicatrizes cirúrgicas

Em que as variações observadas na força de ruptura de cicatrizes de ratos normais e diabéticos, com ou sem tratamento da incisão cirúrgica, com CEC isolada ao associada ao zinco, no presente estudo não observamos quaisquer variações estatisticamente significantes na concentração de hidroxiprolina tecidual destas cicatrizes, independentemente do período de cicatrização avaliado. A Tab. 10 e a Fig. 18 demonstram os valores encontrados.

Tabela 10 – Médias \pm SD dos valores da concentração de hidroxiprolina tecidual ($\mu\text{g/ml}$ de tecido seco) nas cicatrizes da pele de ratos, dos 6 grupos experimentais, sacrificados nos 4 momentos de avaliação do experimento.

Grupos	Seguimento			
	4º dia	7º dia	14º dia	21º dia
G1 – N s/tto	29,86 \pm 7,90	29,74 \pm 6,59	32,12 \pm 4,12	28,62 \pm 5,61
G2 – D s/tto	35,91 \pm 1,68	34,99 \pm 2,24	33,65 \pm 3,36	36,83 \pm 2,02
G3 – N+CEC	25,57 \pm 3,34 ^{ns}	29,92 \pm 2,60 ^{ns}	35,12 \pm 7,69 ^{ns}	33,63 \pm 7,86 ^{ns}
G4 – D+CEC	34,38 \pm 4,78 ^{ns}	38,40 \pm 1,99 ^{ns}	35,89 \pm 5,19 ^{ns}	32,54 \pm 6,79 ^{ns}
G5 – N+CEC+Zn	25,19 \pm 3,03 ^{ns}	33,85 \pm 5,26 ^{ns}	28,08 \pm 4,50 ^{ns}	28,32 \pm 3,68 ^{ns}
G+ - D+CEC+Zn	35,54 \pm 3,88 ^{ns}	38,46 \pm 7,64 ^{ns}	36,69 \pm 3,66 ^{ns}	41,39 \pm 3,13 ^{ns}

^{ns} G1 = G3 = G5; G2 = G4 = G6 para $P > 0,05$ com 4, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório

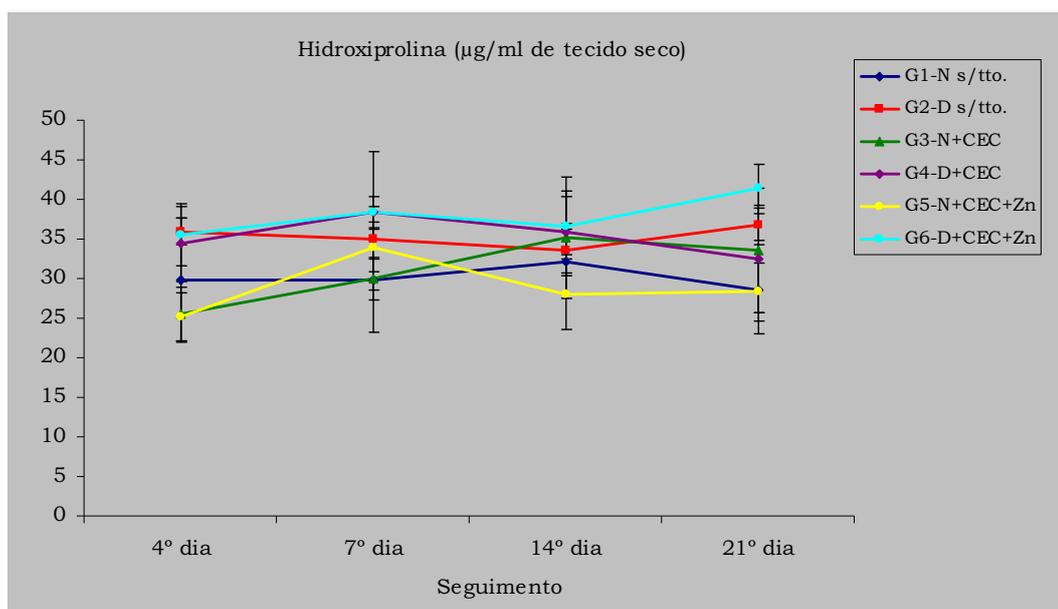


Figura 18 - Variação dos valores da concentração de hidroxiprolina tecidual ($\mu\text{g/ml}$ de tecido seco) de cicatrizes realizadas na pele de ratos, dos 6 grupos experimentais, sacrificados nos 4 momentos do experimento.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O uso de modelos experimentais é amplamente utilizado em estudos que visam a avaliar os efeitos de diversas terapias sobre as complicações crônicas do DM. Isto ocorre porque os modelos-animais possibilitam a realização de estudos controlados, com utilização de amostras homogêneas e pareadas de animais, sem incorrer nas limitações éticas envolvendo a pesquisa em seres humanos (SPADELLA et al., 2005).

Todavia, de acordo com PEREIRA et al. (1998), a escolha do animal de experimentação deve recair sobre a espécie mais utilizada para o propósito a ser alcançado, devendo seus indivíduos ser usados na quantidade mínima para obtenção de resultados válidos, sem a imposição de dor, privação ou sofrimento.

No presente estudo utilizamos o rato como animal de experimentação, que tem por característica ser de fácil obtenção, acomodação, manuseio e manutenção (ELLIS & MCCAFFREY, 1984). Por ser um animal de pequeno porte, o rato também é particularmente útil na realização de procedimentos cirúrgicos, por facilitar o manuseio e ser resistente à infecção.

O rato também é o animal classicamente utilizado na obtenção de modelos clássicos de indução do DM, por supressão química da função endócrina do pâncreas, como os que utilizam a aloxana e a estreptozotocina.

Neste estudo, a aloxana foi a droga de escolha para a indução do DM, pelo fato de ser um modelo de fácil obtenção, produzir diabetes insulino-dependente grave, em porcentagem expressiva de animais, estando o método inteiramente padronizado em nosso laboratório experimental.

O uso da aloxana, administrada por via endovenosa, foi capaz de induzir diabetes persistente no rato, caracterizado por sinais clínicos evidentes de diabetes grave, associados a um estado de hiperglicemia e hipoinsulinemia crônicos, com altas taxas de hemoglobina glicosilada.

Esses achados, porém, são bem documentados na literatura, sendo a poliúria, polidipsia, polifagia e o aumento do volume de diurese os principais sintomas clínicos observados nestes animais, similarmemente àqueles descritos no diabetes humano, juntamente com a perda de peso e a astenia (DOUGLAS, 1994; GUYTON, 1999)

Devido ao excesso de glicose circulante, maior quantidade de glicose é eliminada pelos rins, e, conseqüentemente, maior perda de líquido pela urina é observada (poliúria). Essa perda de urina em excesso leva a necessidade de maior consumo de água (polidipsia compensatória). Como o indivíduo diabético não é capaz de armazenar a glicose, ele consome sua reserva (perda de peso), além de sentir muita fome (polifagia).

De acordo com OLIVEIRA et al. (2002), a elevada taxa de glicose, comum no DM não-tratado, pode levar à desidratação das células teciduais, o que pode resultar em aumento relativo da taxa de leucócitos. Isto ocorre, em parte, porque a pressão osmótica aumentada nos líquidos extracelulares causa a transferência de água para fora das células. Este efeito, somado à desidratação celular e à perda de glicose através da urina, causa o aumento da diurese. A perda de peso decorre, também, da eliminação excessiva de água, fazendo com que o organismo fique com um percentual de água abaixo da faixa considerada normal.

O aumento da hemoglobina glicosilada é outro achado bioquímico bem documentado em indivíduos diabéticos, tendo papel relevante no controle do estado diabético crônico. Segundo SUMITA & ANDRIOLO (2006), a hemoglobina glicosilada, embora seja utilizada desde 1958, como uma ferramenta eficaz na avaliação do controle glicêmico, passou a ser cada vez mais empregada e aceita pela comunidade científica após 1993, após ter sido validada por estudos clínicos, sobre a avaliação do impacto do controle glicêmico sobre as complicações crônicas do diabetes. Essas pesquisas demonstraram que a manutenção do nível de hemoglobina glicosilada abaixo de 7%, no paciente diabético, reduz

significativamente o risco de desenvolvimento de complicações típicas dessa doença.

Os valores da insulina plasmática também foram diminuídos em nossos animais, o que é compatível com a fisiopatologia da doença, e inerente à ação da aloxana que apresenta citotoxicidade específica para as células β pancreáticas, preservando quase que a totalidade da função exócrina do órgão (LUKENS, 1948).

A despeito de suas inúmeras vantagens, o uso da aloxana acompanha-se de uma alta taxa de mortalidade relativa, cujos óbitos ocorrem em decorrência dos efeitos tóxicos da droga, principalmente nas primeiras duas semanas após a indução do diabetes.

LUKENS (1948), em uma extensa revisão da literatura a respeito da ação da aloxana, em animais de várias espécies, incluindo o rato, o cão, o coelho, o macaco e o gato, relatou índices de mortalidade que oscilaram entre 33% e 100% na mesma espécie. Atribuiu este fato a existência de múltiplos fatores capazes de mudar os efeitos da droga, envolvendo desde a sensibilidade do hospedeiro, até o estado de hidratação da droga, a velocidade de infusão, a via de administração, a dieta, o tempo de jejum, o peso do animal e a utilização concomitante de algumas substâncias capazes de influenciar o seu mecanismo de ação, tais como os barbitúricos, o ácido nicotínico e os aminobenzenos.

Em que pesem as vantagens e desvantagens do modelo, a aloxana é uma droga consagrada nos estudos experimentais do diabetes porque reproduz, com fidelidade, todas as alterações anatomopatológicas do DM, especialmente sobre os vasos, rins, olhos e nervos do hospedeiro diabético (SCHELLINI et al., 1995; MACHADO et al., 2000; LERCO et al., 2006; MACEDO et al., 2007; SPADELLA et al., 2008). Acresce-se a isto, que animais diabéticos aloxânicos apresentam a maioria das características histopatológicas observadas no processo de cicatrização humano, incluindo a reação inflamatória e a fibrogênese, etapas que se seguem à agressão cirúrgica, e intimamente relacionadas à cicatrização tecidual (ODLAND, 1968).

A cicatrização, de uma forma geral, é uma resposta tecidual a um processo lesivo, podendo ser de etiologia traumática, inflamatória ou mesmo necrótica. Essa resposta tecidual normalmente é dividida em 3 fases distintas, que se sobrepõem: fase inflamatória, que inicia horas após a injúria tecidual e estende-se por uma média de 4 dias; fase proliferativa, que se inicia em torno do 2º dia e estende-se até o 14º dia; e fase de remodelação, que tem seu início próximo ao 7º dia após a lesão, e estende-se por mais de 2 semanas.

Durante a fase inflamatória da cicatrização, uma série de fatores quimiotáticos, como as frações C3b e C5a do complemento, antígenos bacterianos, produtos de degradação da fibrina e outros, atraem polimorfonucleares, monócitos e linfócitos para o tecido lesado. Esse recrutamento leucocitário tem o objetivo de depurar o tecido morto, combater agentes infecciosos ou outros antígenos potencialmente lesivos, deixando pronta a área agredida para a fase de proliferação fibroblástica .

Durante a fase proliferativa, uma série de fatores de crescimento é liberada localmente. Dentre eles, o fator de crescimento beta (TGF- β) se constitui em um elemento de fundamental importância na cicatrização, pois induz a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). No entanto, somente a presença de fatores de crescimento não garante uma cicatrização adequada. Para que o processo cicatricial seja morfológico e funcionalmente adequado, é necessária a manutenção da resistência mecânica das cicatrizes principalmente nas fases mais vulneráveis das incisões às deiscências e infecções, que o colágeno produzido seja de boa qualidade, e que a deposição deste componente seja feita de forma organizada e eficaz.

Sabe-se, porém, que o processo de glicosilação protéica, observado em indivíduos diabéticos com hiperglicemia crônica, está entre os principais fatores extrínsecos relacionados às alterações observadas na cicatrização das feridas cirúrgicas, pois interfere na quimiotaxia de leucócitos, na proliferação celular e no processo de remodelação

adequado das fibras colágenas, predispondo às deiscências, fistulas e infecções (ROBBINS & COTRAN, 2005).

Por outro lado, não há relatos na literatura de estudos que avaliam os efeitos da corrente elétrica contínua isolada (CEC), sobre o processo de reparação tecidual de cicatrizes praticadas na pele e outros tecidos, de indivíduos diabéticos. A maioria dos estudos encontrados se refere à avaliação da melhoria do fluxo sanguíneo local de territórios lesados, redução do edema, viabilidade de retalhos cutâneos e tratamento de feridas crônicas de extremidades, por causas arteriais ou venosas, não necessariamente em indivíduos diabéticos.

O uso terapêutico da CEC isolada, porém, no tratamento de diversas enfermidades, visando ao alívio de sintomas de inchaço e dor e a estimulação neuromuscular, inclusive em casos de lesões do sistema nervoso central, é prática comum há bastante tempo e seus benefícios são inquestionáveis.

Estudos realizados por WHEELER et al. (2002), evidenciaram resultados positivos com o uso da eletroterapia para a recuperação da musculatura esquelética de pacientes portadores de lesões neurológicas importantes, como o trauma da medula espinhal, tendo observado melhora da função cardiorrespiratória nestes pacientes. LAMB et al. (2002) também observaram a recuperação da musculatura esquelética de pacientes portadores de fraturas de quadril, fixadas cirurgicamente, com o uso da CEC. A melhora da força e do rendimento muscular também foi observada em indivíduos sedentários saudáveis (GUIRRO et al., 2000) e em atletas (PICHON et al., 1995).

Outro campo de aplicação da CEC isolada é nos processos de cicatrização das feridas da pele, quando tratadas com microcorrentes com estimulação anódica, onde bons resultados têm sido descritos (TALEBI et al., 2007).

A CEC se fundamenta, como definida anteriormente, no movimento de cargas elétricas que se deslocam em um único sentido (dito convencional), ou seja, do pólo positivo da fonte de tensão para o pólo negativo. Esta característica eletrostática permite que íons

carregados eletricamente também sejam capazes de se deslocar através dos tecidos da pele com fins terapêuticos. Este processo, também já definido, se constitui na iontoforese transdérmica ou transdermal (ITD).

De acordo com BATHEJA et al. (2006), a iontoforese é uma técnica utilizada para melhorar a administração transdérmica de compostos através da pele por meio da aplicação de uma pequena corrente elétrica. Através do processo de eletrosmose, a iontoforese aumenta a permeação de compostos carregados e neutros, e oferece a opção de distribuição de medicamentos programados. Combinações de iontoforese com intensificadores de química, eletroporação e sonoforese têm sido testados, a fim de aumentar a permeação transdérmica de drogas e diminuir os possíveis efeitos colaterais.

Segundo KANIKKANNAN (2002), a ITD tem sido utilizada para a administração, de forma controlada e pré-programada, de uma variedade de compostos, sendo particularmente útil para a administração de fármacos hidrofílicos produzidos por biotecnologia, como os peptídeos e oligonucleotídeos. O método tem sido usado com sucesso na administração de pequenos peptídeos, tais como os análogos do leuprolide e da calcitonina, em seres humanos. No entanto, parece que a iontoforese parece não ser um método adequado para a administração transdérmica de peptídeos maiores .

Assim, avanços tecnológicos no campo da microeletrônica e da nanotecnologia, ainda são necessários para aperfeiçoar os mecanismos de penetração, absorção e distribuição de drogas e substâncias no organismo, e também permitir a miniaturização dos dispositivos utilizados para a aplicação da iontoforese.

Neste estudo, observamos que ratos diabéticos apresentaram redução significativa da força de ruptura de cicatrizes realizadas na pele, nas fases mais vulneráveis da incisão cirúrgica, quando comparados com ratos controles normais, o que predisporia a maior incidência de deiscências, fistulas e infecções. Esta alteração, por sua vez, foi revertida com a utilização da ITD, associada à administração de

zinco, sendo que o mesmo não ocorreu com a utilização da CEC isolada.

A diminuição da resistência mecânica de incisões praticadas na pele de animais diabéticos tem sido descritas por vários autores. ANDREASSEN & OXLUND (1987), estudando as propriedades mecânicas da ferida incisional de ratos diabéticos não-tratados, após 7, 10 e 20 dias de cirurgia, observaram que ratos diabéticos não-tratados apresentaram redução da força tênsil das cicatrizes durante 20 dias após a cirurgia. Esta alteração, porém, não foi observada em animais diabéticos tratados com insulina, demonstrando que este hormônio é essencial para o adequado processo de cicatrização das feridas cirúrgicas na presença de diabetes.

SEYER-HANSEN et al. (1999), estudando a influência da idade avançada na resistência mecânica de anastomoses colônicas e de incisões realizadas na pele de ratos diabéticos observaram que o diabetes não alterou a força tênsil de cicatrizes do cólon após 0 e 7 dias. No entanto, a resistência mecânica de incisões da pele foi reduzida em 27% após 7 dias de pós-operatório.

Por outro lado, a exemplo da CEC isolada, também não temos conhecimento de estudos realizados em indivíduos diabéticos, onde os efeitos do zinco, administrado por meio da ITD, tenham sido avaliados sobre a evolução da cicatrização de feridas cirúrgicas.

O zinco é uma ortomolécula que integra a tripla-hélice das fibras colágenas. Também é parte integrante da composição das metaloproteinases, enzimas que estão associadas ao remodelamento tecidual (AGREN, 1991; 1993; FAURE et al., 1991; LANSDOWN, 1996).

Segundo LANSDOWN (2007), o zinco é um oligoelemento essencial ao corpo humano e sua importância na saúde e na doença é muito apreciada. A deficiência de zinco pode levar a alterações patológicas e retardo na cicatrização. A suplementação oral com zinco pode ser benéfica no tratamento de pacientes com úlceras de extremidades, mas o seu lugar terapêutico em pacientes cirúrgicos necessita de esclarecimentos. A administração tópica de zinco parece

ser superior à terapia oral devido a sua ação na redução de material necrótico e de infecções. Também atua no sistema avançado de defesa local do organismo, e na epitelização das feridas, por meio de sua ação colagenolítica e reparadora dos tecidos.

Diversos estudos têm sido publicados na literatura sobre os efeitos benéficos da suplementação de zinco na dieta ou utilizado topicamente. AGREN & FRANZEN (1990), estudaram o efeito da deficiência de zinco na dieta sobre a resistência à ruptura de incisões cutâneas abdominais. A força de ruptura das feridas cirúrgicas foi 75% menor no grupo de pacientes com deficiência de zinco do que a observada nos controles. A concentração de zinco no tecido da ferida tinha diminuído no grupo com deficiência de zinco, mas a concentração de hidroxiprolina da ferida foi semelhante nos dois grupos. Os resultados indicaram que o zinco é um importante elemento de traço no início de remodelação do tecido cicatricial

MORAES et al. (2000), também avaliaram a influência da suplementação dietética de óxido de zinco e cromo na reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos normais e diabéticos, tendo sido avaliados 5 grupos experimentais: no 1º, animais normais, sem qualquer suplementação mineral; no 2º, animais diabéticos não-tratados, com suplementação de zinco adicionado à água de beber; no 3º, animais diabéticos não-tratados, sem qualquer suplementação mineral; no 4º, animais diabéticos tratados com insulina, com suplementação de cromo; e no 5º, animais diabéticos tratados com insulina, com suplementação de zinco. Decorridos 7 dias de seguimento, foram retirados fragmentos de pele e subcutâneo do dorso dos animais, sendo as feridas obtidas fotografadas nos dias 0, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Essas fotografias foram transferidas para computador, onde foram calculadas as suas áreas. Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística. No 7º dia da avaliação, foi observado que não houve diferenças estatisticamente significantes na redução das áreas das feridas operatórias entre os grupos estudados. Nos momentos seguintes, ratos diabéticos não tratados (G3) também

não apresentaram diferenças significantes em relação aos normais. Contudo, animais tratados com zinco e cromo, ou com insulina, apresentaram redução significativamente maior das áreas das feridas cirúrgicas do que os animais diabéticos não-tratados, sem qualquer suplementação. Os autores concluíram que ratos diabéticos tratados com insulina e suplementação dietética de zinco têm melhor cicatrização de suas feridas cutâneas.

AGREN (1990), em outro estudo, verificou que a aplicação tópica de zinco pode estimular a cicatrização de úlceras de extremidades, reforçando a reepitelização e reduzindo a inflamação e o crescimento bacteriano. Segundo este autor, quando o zinco é aplicado em feridas, ele não apenas corrige o déficit local deste oligoelemento, como também atua farmacologicamente.

Entre os poucos artigos encontrados na literatura, mais propriamente relacionados aos objetivos do presente estudo, encontramos um trabalho de CORNWALL (1981), que avaliou a eficácia da ITD associada ao zinco, em um paciente de 71 anos de idade, submetido à amputação bilateral das pernas, e que evoluiu com ulcerações nos cotos. O tratamento foi feito durante 20 dias, com sessões de 20 minutos. Após esse período, foram calculadas as áreas de fechamento das feridas, as quais, em sua totalidade, obtiveram um reparo de quase 100% em relação aos achados iniciais. A validade terapêutica da proposta, porém, não pode ser comprovada em virtude da falta de estudos subseqüentes.

Em outro estudo, ESEN et al. (2006), estudando os efeitos da ITD associada ao zinco, aplicada no antebraço de indivíduos normais, observaram, ao “doppler”, que a despeito do tratamento não promover dilatação local dos vasos do antebraço, ele promovia uma maior fluidez do sangue. Esta propriedade foi atribuída a uma possível ação do zinco, que sugestivamente impediria a agregação das células vermelhas do sangue, diminuindo a viscosidade sanguínea. Este benefício, segundo concluíram os autores, poderia ser traduzir secundariamente no

aumento do fluxo sanguíneo local *in vivo*, facilitando o fechamento de feridas.

MAO et al. (1995), estudando os efeitos da administração transdérmica de insulina sobre os níveis de glicose sanguínea, em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, observaram que a extensão da redução da hiperglicemia guarda estreita relação com a intensidade, frequência e duração das ondas de pulso da corrente elétrica. Estes autores notaram que a queda da glicemia é crescente desde que a intensidade de corrente e a frequência dos pulsos elétricos não ultrapassem, respectivamente, 0,8 mA/cm² e 3000Hz.

Em nosso estudo, a intensidade de corrente utilizada esteve de acordo com a regra sugerida por OLIVEIRA et al. (2005), que estipularam doses de 0,1 a 1 mA por área do eletrodo, em centímetros quadrados (cm²); sendo a relação de 0,3 a 0,5 mA/cm² a mais descrita em estudos clínicos que utilizam a iontoforese em humanos. Todavia, como o tamanho do eletrodo deve ser compatível com a área alvo a ser tratada, eventualmente, as doses calculadas pela densidade de corrente podem atingir valores que predispõem os pacientes a riscos de irritação local da pele e queimaduras, determinadas pela estimulação das terminações nervosas livres. O eletrodo alvo utilizado em nosso trabalho possuía 4cm de altura por 2cm de largura, ou seja, área correspondente a 8cm². Se utilizarmos o método proposto, preconizando 0,3mA/cm², chegaríamos à amplitude de 2,4 mA. Em virtude da miliamperagem disponibilizada pelo equipamento, preconizamos a dose de 2 mA.

O tempo de aplicação da técnica, 10 minutos, foi padronizado em virtude da rotina de trabalho do laboratório experimental, bem como do elevado número de animais utilizados no experimento. O número de sessões de tratamento (quatro) foi baseado na data inicial da sutura e no primeiro momento de avaliação e sacrifício, ou seja, o 4° dia.

JUNIOR et al. (2004), investigando o efeito da administração do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, em retalhos cutâneos randômicos de ratos, verificaram que a porcentagem de necrose destes

retalhos, foi estatisticamente inferior nos animais tratados pela ITD, quando comparada com animais onde este método terapêutico não foi utilizado. Os autores concluíram que a administração tópica do peptídeo por iontoforese foi eficaz em aumentar a viabilidade de retalhos cutâneos, em ratos.

Em estudo similar mais recente, estes mesmos pesquisadores também avaliaram o efeito da ITD associada à histamina, para testar a viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. Para isso, utilizaram 60 ratos adultos distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, sendo o 1º controle, tratado apenas com simulação da estimulação elétrica; o 2º submetido à estimulação elétrica com corrente direta; o 3º tratado com histamina e simulação da estimulação elétrica; e o 4º tratado com ITD + histamina. Em todos os grupos os procedimentos foram realizados imediatamente após a operação e nos 2 dias subseqüentes à operação. Os autores concluíram que a administração tópica de histamina por ITD aumentou a viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos (JUNIOR et al., 2009).

GHERARDINI et al. (1998), utilizando a ITD, realizaram um estudo sobre os efeitos da administração do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e do polipeptídeo intestinal vasoativo, na cicatrização de úlceras de estase venosa de extremidades em 66 pacientes. Dois grupos aleatórios de pacientes foram comparados, um recebendo tratamento padrão, associado à ITD + peptídeo relacionado ao gene da calcitonina + polipeptídeo intestinal vasoativo, e o outro, tratamento padrão + ITD + placebo. Os tratamentos foram aplicados localmente por 20 minutos, três vezes por semana, durante 12 semanas. Para determinar os efeitos dos dois tratamentos, a área percentual de úlcera cicatrizada e o número de úlceras cicatrizadas foram comparados após 2, 4, 6, 8 e 12 semanas de tratamento. Os resultados demonstraram que houve melhora significativa do processo de cicatrização das úlceras venosas no grupo de pacientes tratado com ITD associada aos peptídeos, quando comparada com o tratamento utilizando o placebo.

JACOBSEN et al. (1993), utilizaram a ITD associada à vincristina para o tratamento da dor pós-herpética, tendo concluído que a técnica foi eficaz para o tratamento deste tipo de enfermidade.

Assim, a eficácia do tratamento com ITD associada ao zinco, sobre a resistência mecânica de cicatrizes praticadas na pele de ratos diabéticos, abre perspectivas alentadoras para o controle das alterações que acompanham o processo de reparação tecidual das feridas cirúrgicas em indivíduos diabéticos. Novas investigações, porém, são necessárias para comprovar os resultados aqui reportados.

Em nosso estudo observamos, também, que a despeito da redução da resistência mecânica das cicatrizes praticadas na pele de animais diabéticos, com ou sem tratamento da incisão, com CEC isolada ou associada ao zinco, não observamos variações estatisticamente significantes dos valores da concentração de hidroxiprolina de cicatrizes de animais dos 6 grupos experimentais, em todos os períodos de avaliação do experimento.

Os valores da hidroxiprolina dosados em cicatrizes de animais e homens diabéticos costumam ser mais baixos que os observados em indivíduos normais não-diabéticos, utilizando diferentes métodos de dosagens (MADDEN & PEACOCK, 1968; PRAKASH et al., 1973; GOTTRUP & ANDREASSEN, 1981).

SELBY et al. (2009), avaliaram a excreção de hidroxiprolina na urina de pacientes diabéticos, tendo observado que a excreção deste aminoácido foi extremamente superior em pacientes diabéticos, quando comparada com indivíduos normais, o que sugere que a concentração deste aminoácido seja menor em portadores desta patologia.

SEN et al. (2006), avaliaram a quantidade de hidroxiprolina tecidual em animais diabéticos com hipercolesterolemia e observaram diminuição da quantidade desta substância nestes animais. Os autores imputaram esta alteração, todavia, como decorrente dos elevados níveis de colesterol sérico.

CHANG et al. (2007), estudando os efeitos da utilização tópica da difenilhidantoína sódica, em feridas cirúrgicas praticadas nos

segmentos cranial e caudal do dorso de ratos diabéticos, induzidos pela estreptozotocina, observaram redução da força tênsil e do conteúdo de hidroxiprolina tecidual nestas incisões, sendo que estas alterações melhoraram significativamente com o uso da terapêutica proposta.

PEREZ et al. (2005), estudando os efeitos cicatrizantes dos estratos das folhas, flores e polpa da fruta pitiaia vermelha (*Hylocereus undatus*) em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, submetidos à incisão e excisão da pele do dorso, observaram redução da força tênsil da cicatriz, retardo da contração da ferida cutânea e diminuição da concentração de hidroxiprolina nestes tecidos. Todavia, a aplicação tópica dos produtos da *H. undatus* aumentaram o conteúdo de hidroxiprolina, a força tênsil, a quantidade total de proteínas, o conteúdo do colágeno do DNA, havendo melhor epitelização dos tecidos e, por conseqüência, melhor cicatrização.

Em consonância com nossos resultados, porém, VERHOFSTADT & HENDRIKS (1994), não observaram alterações no acúmulo de colágeno nas cicatrizes cirúrgicas praticadas no intestino de ratos, apesar de terem observado diminuição da força tênsil das anastomoses, nas fases mais precoces da cicatrização. Este achado foi corroborado por estudo realizado em nosso laboratório por MACHADO et al. (2009), onde na maioria das fases da cicatrização de anastomoses realizadas no íleo e cólon de animais diabéticos não houve alteração significativa na concentração de hidroxiprolina tecidual.

ORTOLAN et al. (2004), avaliando a força de ruptura e o conteúdo de hidroxiprolina tecidual em segmentos de intestino delgado e intestino grosso, de animais normais e diabéticos, sem agressão cirúrgica, também não observaram variações estatisticamente significantes destes parâmetros na maioria das fases da cicatrização, sugerindo que, primariamente, o diabetes parece não induzir alterações biomecânicas e metabólicas dos tecidos.

FILHO et al. (2008), também não encontraram variações na concentração de hidroxiprolina tecidual em cicatrizes de ratos diabéticos, quando avaliaram vários aspectos da cicatrização de

anastomoses colônicas, tratadas com adesivo de fibrina, em ratos normais e diabéticos.

Todavia, a aparente discrepância entre os valores baixos da força de ruptura de cicatrizes de animais diabéticos, em contraste com a não variação da quantidade de hidroxiprolina tecidual presente nestas cicatrizes, sugere que os defeitos da cicatrização observados no DM podem ser muito mais dependentes do grau de organização e maturação do colágeno depositado nas cicatrizes, do que propriamente com o seu conteúdo.

Este fato foi comprovado por ORTOLAN et al. (2008), em estudo mais recente, quando observaram que a despeito da inexistência de alterações na quantidade de hidroxiprolina presente em anastomoses do intestino de ratos diabéticos aloxânicos, o colágeno depositado nas cicatrizes apresentava-se totalmente desorganizado, pouco denso e composto por fibras colágenas imaturas, mesmo nas fases mais tardias da cicatrização. Analogamente, é possível que estas alterações também estejam presentes nas incisões praticadas na pele dos animais diabéticos deste estudo, explicando, assim, a reduzida resistência mecânica de suas cicatrizes, nas fases mais precoces da cicatrização. Estudos morfológicos e morfométricos posteriores destas cicatrizes, utilizando a microscopia ótica e a microscopia eletrônica por varredura, deverão esclarecer as hipóteses agora aqui levantadas.

ONODERA et al. (2004), tentando estabelecer uma correlação entre a síntese do colágeno com a força de ruptura de anastomoses de cólon, realizadas em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, observaram que a resistência mecânica das anastomoses foi significativamente baixa em ratos diabéticos, quando comparada com ratos controles normais, sendo a concentração de hidroxiprolina estatisticamente igual nos dois grupos. Por outro lado, embora a expressão do colágeno tipo III não diferisse entre os dois grupos, a expressão do colágeno tipo I foi significativamente baixa em animais diabéticos, quando comparada com a observada em ratos normais. Os autores concluíram que as alterações observadas na cicatrização de

ratos diabéticos, principalmente nas fases precoces da cicatrização, não são dependentes do conteúdo total de colágeno presente nas cicatrizes, e sim, do decréscimo do conteúdo do colágeno recém formado (tipo I). Pesquisas desta natureza poderão ajudar a entender melhor os mecanismos diretamente implicados na gênese das alterações observadas durante o processo de cicatrização dos pacientes diabéticos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1- A força de ruptura é menor em cicatrizes de ratos diabéticos no 7°, 14° e 21° dia de pós-operatório, quando comparada com animais controle não diabéticos independentemente do tratamento.

2- A CEC isolada melhora a força de ruptura das cicatrizes de animais normais no 7°, 14° e 21° dia de pós-operatório, porém, não teve efeito benéfico sobre este parâmetro em animais diabéticos.

3- A CEC associada ao zinco, administrado por meio da ITD, melhora a força de ruptura de animais normais e diabéticos, no 7°, 14° e 21° dia de pós-operatório.

4- A CEC isolada, ou em associação ao zinco, administrado por meio da ITD, não altera a concentração de hidroxiprolina nas cicatrizes de ratos normais e diabéticos, independentemente do tratamento.

RESUMO

RESUMO

Introdução

O diabetes mellitus é considerado um dos mais importantes fatores ligados aos defeitos da cicatrização tecidual, pois é capaz de alterar as propriedades biomecânicas e o metabolismo do colágeno das feridas cirúrgicas, predispondo às hérnias, deiscências e infecções no pós-operatório. Com objetivo de minimizar este problema, atualmente tem sido dada ênfase a aplicação de recursos terapêuticos capazes de aumentar a circulação sanguínea no território lesado, especificamente na pele. Dentre estes recursos destaca-se a iontoforese transdermal, que consiste na introdução de íons de sais solúveis para dentro dos tecidos do corpo, por meio da corrente elétrica contínua. Dentre esses sais, o zinco tem particular interesse, haja vista que é uma ortomolécula que é parte integrante da insulina, atua no metabolismo glicídico e do colágeno e, portanto, está intrinsecamente relacionado ao processo de reparação tecidual. Assim, este estudo visou a avaliar os efeitos da técnica eletroterápica isolada ou em adjuvância ao zinco, sobre a cicatrização da ferida cirúrgica realizada na pele de ratos diabéticos, tendo como parâmetro de comparação ratos normais de mesma idade e período de seguimento.

Objetivo

O presente projeto de pesquisa teve o seguinte objetivo:

Avaliar os efeitos da corrente elétrica contínua, isolada ou em associação ao zinco, administrado por meio da iontoforese transdermal, sobre a resistência mecânica e o conteúdo de hidroxiprolina de cicatrizes realizadas da pele de ratos diabéticos aloxânicos, tendo como referência ratos normais não-diabéticos submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos e terapêuticos.

Metodologia

Foram analisados 6 grupos de ratos, com 40 animais cada, submetidos à incisão cirúrgica na região anterior do abdome, assim distribuídos: G1- Grupo normal sem tto; G2 – Grupo diabético sem tto; G3 – Grupo não-diabético tratado-CEC; G4 – Grupo diabético tratado-CEC; G5 – Grupo não-diabético tratado-Zn; G6- Grupo diabético tratado-Zn. O tratamento foi realizado durante 4 dias por um eletroestimulador de corrente contínua (Ibramed), com amplitude de 2mA, em sessões de 10 minutos. O diabetes foi induzido pela aloxana, endovenosa, 42 mg/Kg de peso corporal. Foram analisados parâmetros clínicos (estado geral, atividade física, e controles do peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese; Laboratoriais (dosagens de glicose sangüínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada, insulina plasmática e hidroxiprolina tecidual; Estudo biomecânico (medida da força de ruptura das cicatrizes cirúrgicas); Anatomopatológico macroscópico (autópsia de todos os animais, com ênfase à incisão cirúrgica e à infecção de órgãos torácicos e abdominais). O tratamento e a análise dos parâmetros foram realizados em 4 momentos do experimento: 4º, 7º, 14º e 21º dia após a cirurgia. As cicatrizes foram submetidas ao ensaio biomecânico com medida da força tênsil das incisões, para tanto, foi retirado um segmento retangular de pele, medindo 1,5cm de comprimento por 0,8cm de largura, contendo em seu centro a incisão, o qual foi preso em ambas as extremidades por duas garras de preensão, e tracionado até a ruptura, utilizando uma máquina universal de ensaios biomecânicos. Outro segmento semelhante ao do ensaio biomecânico foi retirado para a dosagem de hidroxiprolina tecidual. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância em um experimento inteiramente casualizado, no nível de significância de 5 %.

Resultados

Com relação aos parâmetros analisados, ratos controles não-diabéticos (G1, G3 e G5) apresentaram parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com os observados em animais de mesma linhagem, em todos os períodos de avaliação do experimento. Em contraste, ratos diabéticos (G2, G4, G6), sem qualquer tratamento da doença, evoluíram com perda acentuada de peso corporal e aumento significativo da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, quando comparados com animais normais, não-diabéticos. Os níveis de glicose sanguínea, glicose urinária e de hemoglobina glicosilada também foram elevados em ratos diabéticos de todos os grupos estudados, sendo os valores plasmáticos da insulina significativamente baixos.

A força de ruptura de cicatrizes praticadas na pele de ratos normais e diabéticos, com ou sem tratamento da incisão cirúrgica, com CEC isolada ou associada ao zinco, não apresentou diferenças estatisticamente significantes, no 4º dia de pós-operatório.

Ratos diabéticos, porém, com ou sem tratamento da incisão cirúrgica, com CEC isolada ou associada ao zinco, apresentaram valores da força de ruptura significativamente menores que os observados em ratos controles normais.

A CEC isolada ou associada ao zinco, por sua vez, teve efeito positivo sobre a força de ruptura de cicatrizes cirúrgicas efetuadas na pele de ratos normais controles, quando comparada com ratos normais controles sem qualquer tratamento da incisão, no 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório.

Por outro lado, o tratamento da incisão cirúrgica com CEC isolada não teve efeito benéfico sobre a força de ruptura de cicatrizes da pele de ratos diabéticos, no 7º e 14º dia de P.O., considerados os períodos mais vulneráveis das cicatrizes às deiscências e infecções.

Em contraste, o tratamento da incisão cirúrgica com CEC associada ao zinco teve efeito benéfico sobre a força de ruptura de cicatrizes da pele de ratos diabéticos em todos os períodos de seguimento do experimento.

Conclusões

Nas condições experimentais da presente investigação concluimos:

- 1- A força de ruptura é menor em cicatrizes de ratos diabéticos no 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório, quando comparada com animais controle não diabéticos independentemente do tratamento.
- 2- A CEC isolada melhora a força de ruptura das cicatrizes de animais normais no 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório, porém, não teve efeito benéfico sobre este parâmetro em animais diabéticos.
- 3- A CEC associada ao zinco, administrado por meio da ITD, melhora a força de ruptura de animais normais e diabéticos, no 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório.
- 4- A CEC isolada, ou em associação ao zinco, administrado por meio da ITD, não altera a concentração de hidroxiprolina nas cicatrizes de ratos normais e diabéticos, independentemente do tratamento.

Palavras-chave: Corrente Elétrica Contínua Iontoforese, Zinco, Diabetes Mellitus.

SUMMARY

SUMMARY

Introduction

Diabetes Mellitus is considered to be one of the main factors related to tissue healing defects as it can change the biomechanical properties and metabolism of collagen in surgical wounds, thus predisposing to hernias, dehiscence and infections in the postoperative period. With the purpose to minimize such problem, emphasis has been presently given to the use of therapeutic resources that can increase blood circulation in the wounded area, specifically in the skin. Among such resources, transdermal iontophoresis stands out. It consists in the introduction of soluble salt ions into body tissues by means of continuous electric current. Of these salts, zinc is of particular interest, since it is an orthomolecule that forms insulin, participates in the metabolism of sugars and collagen, and is, therefore, intrinsically related to the tissue healing process. Hence, this study aimed at evaluating the effects of electrotherapeutic therapy, used isolatedly and adjuvantly with zinc, on the healing of surgical wounds in the skin of diabetic rats, using same-age normal rats and a similar follow-up period as comparison parameters.

Objective

This research project had the following objective:

To evaluate the effects of continuous electric current, isolated or in association with zinc, administered by means of transdermal iontophoresis, on the mechanical resistance and hydroxyproline content in healing wounds made in the skin of aloxanic diabetic rats by using non-diabetic rats submitted to similar surgical and therapeutic procedures as reference.

Methodology

Six groups of rats were analyzed. Each group consisted of 40 animals submitted to surgical incision in the anterior region of the abdomen. The animals were distributed as follows: G1- Normal group without tto; G2 – Diabetic group without tto; G3 – Treated non-diabetic group-CEC; G4 – Treated diabetic group-CEC; G5 – Treated non-diabetic group-Zn; G6- Treated diabetic group-Zn. Treatment was performed for 4 days by a continuous current electrostimulator (Ibramed), with amplitude of 2mA, in 10-minute sessions. Diabetes was induced by endovenously induced aloxan, 42 mg/Kg of body weight. The following parameters were analyzed: clinical (general condition, physical activity and control of body weight, water intake, food intake and diuresis); laboratory (dosage of blood glucose, urinary glucose, glycosylated hemoglobin (plasma insulin and tissue hydroxyproline)); biochemical study (measurement of surgical scar rupture strength); macroscopic anatomopathological (autopsy of all animals, with emphasis to surgical incision and infection of thoracic and abdominal organs). The treatment and analysis of the parameters were performed at 4 moments of the experiment: 4th, 7th, 14th and 21st days after surgery. The scars were submitted to a biochemical assay which measured the tensile strength of the incisions. To that end, a rectangular skin segment measuring 1.5 cm in length by 0.8 cm in width with the incision in its center was removed. The segment was secured at both ends by two gripping clamps and pulled to rupture by using a universal biomechanical assay machine. Another similar segment to that utilized in the biomechanical assay was removed for tissue hydroxyproline dosage. The data were statistically analyzed by one-way analysis of variance at the level of significance of 5 %.

Results

In relation to the parameters analyzed, non-diabetic control rats (G1, G3 and G5) showed clinical and laboratory parameters that were compatible with those observed in animals of the same lineage in all periods of the experimental evaluation. Contrarily, diabetic rats (G2, G4, G6) without any treatment for the disease developed with accentuated body weight loss and significantly increased water intake, food intake and diuresis as compared to normal non-diabetic rats. The levels of blood glucose, urinary glucose and glycosylated hemoglobin were also high for diabetic rats in all the studied groups. The plasma levels of insulin were significantly low.

The rupture strength of scars made in the skin of normal and diabetic rats, with or without treatment of the surgical incision with isolated CEC or in association with zinc, did not show statistically significant differences on the 4th postoperative period.

However, the diabetic rats with or without treatment of the surgical incision using CEC alone or in association with zinc showed significantly lower rupture strength values than those observed for normal control rats.

Isolated CEC or associated with zinc, in turn, had a positive effect on the rupture strength of surgical scars made in the skin of normal control rats as compared to normal control rats without any incision treatment on the 7th, 14th and 21st postoperative days.

On the other hand, the treatment of surgical incisions with CEC alone did not have any beneficial effects on the rupture strength of scars in the skin of diabetic rats on the 7th or 14th postoperative days, considering the most vulnerable periods of scars to dehiscence and infections.

In contrast, the treatment of surgical incisions with CEC in association with zinc had a beneficial effect on the rupture strength of scars in the skin of diabetic rats in all periods of experimental follow-up.

Conclusions

According to the experimental conditions of the present investigation, it was concluded that:

- 1- The breaking strength is less scarring in diabetic rats on the 7th, 14th and 21th days after surgery compared with nondiabetic control animals regardless of treatment.
- 2- CEC alone improves the breaking strength of scars from normal animals at 7th, 14th and 21th days postoperatively, however, had no beneficial effect on this parameter in diabetic rats.
- 3 - CEC associated with zinc, administered by ITD, improves the tensile strength of normal and diabetic animals at 7th, 14th and 21th days postoperatively.
- 4- CEC alone or in combination with zinc, administered by ITD, does not alter the concentration of hydroxyproline in the scars of normal and diabetic rats, regardless of treatment.

Key words: Continuous Electric Current, Iontophoresis, Zinc, Diabetes Mellitus.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGREN, M.S.; FRANZÉN, L. Influence of zinc deficiency on breaking strength of 3-week-old skin incisions in the rat. **Acta Chir. Scand.**, v. 56, p.667-670, 1990.

AGREN, M.S.; CHVAPIL, M.; FRANZÉN, L. Enhancement of re-epithelialization with topical zinc oxide in porcine partial- thickness wounds. **J. Surg. Res.**, v.50, p.101-105, 1991.

AGREN, M.S.; FRANZÉN, L.; CHVAPIL, M. Effects on wound healing of zinc oxide in a hydrocolloid dressing. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.29, p. 221-227, 1993.

AGREN, M.S. Studies on zinc in wound healing. **Acta. Derm. Venereol.**, v.154, p.1-36, 1990.

ALLEN, D.A.; YAQOOB, M.M.; HARWOOD. S.M. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. **J. Nutr. Biochem.**, v.16, p.705-713, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Manual of clinical diabetics role of cardiovascular risk factors in prevention and treatment of macrovascular disease in diabetes. **Diabetes Care**, v.12, p.573, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diabetes Statistics – data from the 2007 National Diabetes Fact Sheet (the most recent year for which data is available)**. Disponível em: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/> Acesso em: 29 sep 2010.

ANDREASSEN, T.T.; OXLUND, H. The influence of experimental diabetes and insulin treatments on the biochemical properties of rat skin incisional wounds. **Acta. Chir. Scand.**, v.153 p.405-409, 1987.

BATHEJA, P.; THAKUR, R.; MICHINIAK, B. Transdermal iontophoresis. **Expert. Opin. Drug. Deliv.**, v.3, p.127-138, 2006.

BERGMAN, I.; LOXLEY, R. The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. **Clin. Chim. Acta** ., v.27, p.347-349, 1970.

BLAIR, S.N.; CONNELLY, J.C.; How much physical activity should we do? The case for moderate amounts and intensities of physical activity. **Res. Quart. for Exerc. and Sport**, v.67, n.2, p.195-205, 1996.

BRAIMAN-WIKSMAN, L.; et al. Novel insights into wound healing sequence of events. **Toxicol. Pathol.**, v.35, p.767-779, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Documentação do Ministério da Saúde. **Doenças crônico degenerativas: evolução e tendências atuais**. Brasília- DF, 1988.

BRASIL, Ministério da saúde. Centro de documentação do Ministério da Saúde. **Doenças crônico-degenerativas: evolução e tendências atuais**. Brasília-DF, 1988.

BRASIL, Ministério da saúde. Cadernos de atenção básica. **Diabetes Mellitus**, Brasília-DF, 2006.

CAHILL JUNIOR, G.F.; ETZWILLER D.D.; FREINKEL, N. Control and diabetes. **N. Engl. J. Med.**, v.294, p.1004-1005, 1976.

CARVALHO, D.C, GONÇALVES, R.A.A. Iontoforese e seu mecanismo de ação com o tecido humano. **Lato & Sensu**, v.4, p.3-5, 2003.

CARVALHO, P.T.C. et al. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta. Cir. Bras.**, v.21, p.177-183, 2006.

CASTELL, C. Epidemiology and classification for diabetes mellitus. **Rev. Enferm.** , v.33, p.9-15, 2010.

CHAN, F.C. et al. Topical diphenylhydantoin sodium can improve healing in a diabetic incisional animal wound model. **J. Wound. Care**, v.16, p.359-363, 2007.

CORNWALL, M.W, Zinc iontophoresis to treat ischemic skin ulcers. **Physical therapy**, v.61, p.359-360, 1981.

COSTELLO, C.T.; JESKE, A.H. Iontophoresis: applications in transdermal medication delivery. **Phys. Ther.**, v.75, p.554-563, 1995.

DAGOGO-JACK S. Primary prevention of type-2 diabetes in developing countries. **J. Natl. Med. Assoc.**, v.98, p.415-419, 2006.

DIXIT, N. et al . Iontophoresis – an approach for controlled drug delivery: a review. **Curr. Drug. Deliv.**, v.4, p.1-10, 2007.

EKMEKTZOGLU, K.A. ; ZOGRAFOS G.C. A concomitant review of the effects of diabetes mellitus and hypothyroidism in wound healing. **World J. Gastroenterol.**, v.12, p.2721-2729, 2006.

ELLIOTT, J.I.; EWCHAND, H.; ALTMANN, D.M. Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking cells. **Clin. Exper. Immunology**, v.109, p.116-120, 1997.

ELLIS, J.C.; MCCAFFREY, T.V. Animal model for peripheral nerve grafting. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.92, p.546-550, 1984.

ESEN, F.; GULEK, 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.**, v.113, p.139-153, 2006.

ESTEVEZ-JUNIOR, E.J.; LYDIA, M.F.; RICHARD, E.L. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta. Cir. Bras.**, vol.19, 2004.

ESTEVEZ-JUNIOR, I.E. et al. Histamine iontophoresis on the viability of random skin flap in rats. **Acta. Cir. Bras.**, São Paulo, v.24, n. 1, 2009.

ESTEVEZ, J.I. et al. Topical administration of hydralazine hydrochloride on the viability of random skin flaps in rats. **Acta. Cir. Bras.**, v.20, n.2, 2005.

FAGOT-CAMPAGNA, A.; BOURDEL-MARCHASSON, I.; SIMON, D. Burden of diabetes in an aging population: prevalence, incidence, mortality, characteristics and quality of care. **Diabetes Metab.**, v.31, p.535-552, 2005.

FAURE, H.; et al. Parenteral supplementation with zinc in surgical patients corrects postoperative serum-zinc drop. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.30, p.35-37, 1991.

FILHO, O.R. et al. Anastomose colônica com adesivo de fibrina em ratos diabéticos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v.35, p.329-333, 2008.

FRANCO, L.J. et al. Estudo multicêntrico sobre a prevalência do diabetes mellitus no Brasil. In: Ministério da Saúde. **Censo de diabetes**. Brasília, p.1-32, 1988.

FRANZÉN, L.E.; GHASSEMIFAR, M.R. Connective tissue repair in zinc deficiency. **Eur. J. Surg.**, v.158, p.333-337, 1992.

GENUTH, S. et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.26, p.3160-3167, 2003.

GHERARDINI, G.M.D. et al. Venous Ulcers: Improved healing by iontophoretic administration of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal polypeptide. **Plast. Reconst. Surg.**, v.101 p.90-93, 1998.

GONCALVES, R.M. et al. Influência de aderências peritoneais e fio cirúrgico na tensão de ruptura da parede abdominal em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.27, p.147-152, 2000.

GOTTRUP, F.; ANDREASSEN, T.T. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum: the influence of experimental diabetes. **J. Surg. Res**, v.31, p.61-68, 1981.

GUIRRO, E.C.O.; GUIRRO, R.R.J. **Fisioterapia Dermato-Funcional**. Editora Manole, SP, p.560, 2002.

HU, F.B. et al. The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up. **Arch. Intern. Med.**, v.161, p.1717-1723, 2001.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Complicações do diabetes e educação. **Diabetes Clínica**, v.6, p.217-220, 2002.

JACOBSEN, M.T. et al. Iontophoresis of vincristine for treatment of post-herpetic neuralgia. **Arq. bras. neurocir.**, v.12, p.223-234, 1993.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KANIKKANNAN N. Iontophoresis-based transdermal delivery systems. **BioDrugs**, 16(5):339-47, 2002.

LAMB, S.E. et al. Neuromuscular stimulation of the quadriceps muscle after hip fracture: a randomized controlled trial. **Arch. Phys. Med .Rehabil.**, v.83, p.1087-1092, 2002.

LANSDOWN, A.B.G. Zinc in the healing wound. **Lancet**, v.347, p.706-707, 1996.

LERÁRIO, A.C. Diabete Mellitus: Aspectos Epidemiológicos. **Rev. Soc. Cardiol.**, v.8, p.115, 1998.

LERCO, M.M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta. Cir. Bras.** vol.18 n.2, 2003.

LERCO, M.M. et al. The number of podocytes and slit diaphragm is decreased in experimental diabetes nephropathy. **Acta. Cir. Bras.**, v.21, p.87-91, 2006.

LOPES, J.V. et al. Analysis of the tensile strength on the healing of the abdominal wall of rats treated with infliximab. **Acta. Cir. Bras.**, v.23, n.5, 2008.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia explicada: princípios e prática**. São Paulo: Ed. Manole, p.40-41, 2001.

MACEDO, C.S. et al. Reduction of podocytes in late diabetic alloxan nephropathy. Prevention by glycemic control. **Acta. Cir. Brás.**, v.22 p.337-341, 2007.

MACHADO, J.L.M. et al. Caracterização de um modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos induzidos pela aloxana. **Acta. Cir. Bras.**, v.15, p.86-93, 2000.

MACHADO, J.L.M.; ORTOLAN, E.V.P.; SPADELLA, C.T. Anastomotic healing in ileum and colon of alloxan-induced diabetic rats. **Acta. Cir. Bras.**, v.24, n.1, 2009.

MADDEN, J.W.; PEACOCK, E.E. Studies on the biology of collagen during wound healing. **Surgery**, v.64, p.288, 1968.

MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, v.15, p.1509-1516, 1992.

MAO, X.M. et al. Effects of pulse current iontophoretic transdermal delivery of insulin on blood glucose in diabetic rats. **Yao Xue Xue Bao**, v.30, p.881-885, 1995.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analyses of experiments**. 3th ed. New York: John Wiley, 1991.

MORAES, S.P. et al. Zinco e cromo na cicatrização de feridas em ratos normais e diabéticos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 27, n. 6, 2000.

NANDA, A.; NANDA, S.; GHILZAI, N.M. Current developments using emerging transdermal technologies in physical enhancement methods. **Curr. Drug. Deliv.**, v.3, p. 233-242, 2006.

NARAYANAN, M.L. et al. Diabetes prevalence, incidence, complications and mortality among Alaska Native people 1985-2006. **Int. J. Circumpolar Health**, v.69, p.236-52, 2010.

NATHAN, D.M. et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **N. Engl. J. Med.**, v.353, p. 2643-2653, 2005.

NERUP, J. et al. On the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia**, v.37, p.82-89, 1994.

OADLAND, G. Human wound repair II. Inflammatory cells, epithelial mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. **J. Cell. Biol.**, vol.39, p.152-168, 1968.

OLIVEIRA, A.S, et al. Fundamentação teórica para iontoforese. **Rev. bras. fisioter.** v.9, n.1, 1-7, (2005)

OLIVEIRA, C.A.M. et al. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.8, p.219-224, 2002.

ONODERA, H. et al. Weakness of anastomotic site in diabetic rats is caused by changes in the integrity of newly formed collagen. **Dig. Surg.** V.21, p.146-151, 2004.

ORTOLAN, E.V.P. et al.. Avaliação de parâmetros de cicatrização no cólon de ratos diabéticos sem agressão cirúrgica. **Acta. Cirúrgica. Brasileira.**, v.19, p.286-295, 2004.

ORTOLAN, E.V.P. et al. Microscopic, morphometric and ultrastructural analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.116: p.198-202, 2008.

PEREIRA, B. et al. Changes in the TBARs content superoxid dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoide organs and skeletal muscle of adrenode,edullated rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, p.827-833, 1998.

PEREZ, G.R.M.; VARGAS, S.R.; ORTIZ, H.Y.D. Wound healing properties of *Hylocereus undatus* on diabetic rats. **Phytother. Res.**, v.19, p.665-668, 2005.

PICHON, F. et al. Electrical stimulation and swimming performance. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.27, n.12, p.1671-1676, 1995.

PINO, C.G. et al. Niveles sericos de cromo, cobre y cinc en un grupo de niños obesos. **Rev. Cubana Aliment. Nutr.**, v.6, p.94-98, 1992.

PRAKASH, A.; KAPU, M.; MAINI, B.S. Wound healing in experimental diabetes: histological, histochemical and biochemical studies. **Indian J. Med. Res**, v. 61, p.1200, 1973.

ROSENBERG, C.S. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. **Nurs. Clin. North Am.**, v.25, p.247-253, 1990.

ROSSI, L.L. et al. Tensile strength study of the abdominal wall following laparotomy synthesis using three types of surgical wires in Wistar rats. **Acta. Cir. Bras.**, v. 23, n.1, 2008.

SAYDAH, S.; LOCHNER, K. Socioeconomic status and risk of diabetes-related mortality in the U.S. **Public Health Rep.**, v.125, p.377-88, 2010.

SCHELLINI, S.A. et al. Müller cells and diabetic retinopathy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.977-980, 1995.

SELBY, P.S. et al. Hydroxyproline excretion is increased in diabetes mellitus and related to the presence of microalbuminuria. **Diab. Med.**, v.12, p.240-243, 1995.

SEN, M. et al. Effect of hypercholesterolemia on experimental colonic anastomotic wound healing in rats. **World J. Gastroenterol.**, v.28, p.1225-1228, 2006.

SEYER-HANSEN, M.; ANDREASSEN, T.T.; OXLUND, H. Strength of colonic anastomoses and skin incisional wounds in old rats - influence by diabetes and growth hormone. **Growth. Horm. IGF. Res.**, v.9, p.254-61, 1999.

SILVESTRE, J.A. Hospitalizações SUS 1997. **Coordenadoria de atenção à saúde do idoso**. Brasília: Ministério da Saúde, 1997.

SIPERSTEIN, M.D. Diabetic microangiopathy and the control of blood glucose. **N. Engl. J. Med.**, v.309, p.1577-1579, 1983.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo II. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes**, São Paulo, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo II. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes**, São Paulo, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Dados sobre Diabetes Mellitus no Brasil**. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/97-estatisticas/342-dados-sobre-diabetes-mellitus-no-brasil>. Acesso 29 set. 2010.

SPADELLA, C.T. et al. Comparative study among five different treatments on the clinical and laboratory changes of the alloxan-induced diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira** . v. 20, p.46-54, 2005.

SPADELLA, C.T. et al. Pancreas transplantation prevents cellular oxidative stress in kidneys of alloxan-induced diabetic rats. *Transplantation Proceedings*, v. 40, p. 524-528, 2008.

STRYER, L. **Biochemistry**. Stanford University: Guanabara Koogan, p. 213-228, 1992.

SUMITA, N.M.; ANDRIOLO, A. Importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento do paciente portador de diabetes mellitus. **J. Brás. Patol. Med. Lab.**, v. 42, editorial, 2006.

TALEBI, G. et al. Effects of micro-amperage direct current stimulation on injury potential and its relation to wound surface area in guinea pig. **Conf. Proc. IEEE. Eng. Med. Biol.Soc.**, p. 3516-3519, 2007.

TAZIMA MFGS, et al. Wound biology and healing. **Med. (Ribeirão Preto)**, v.41, p. 259-64, 2008.

VAN DIEREN, S. et al. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. **Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.**, 7 Suppl, p.53-58, 2010.

VARAS-LORENZO, C. et al. Prevalence of glucose metabolism abnormalities and cardiovascular co-morbidity in the US elderly adult population. **Pharmacoepidemiol. Drug. Saf.**, v.15, p.317-326, 2006.

VERHOFSTADT, M.H.J.; HENDRIKS, T.H. Diabetes impairs the development of early strength, but not the accumulation of collagen, during intestinal anastomotic healing in the rat. **Br. J. Surg**, v.81, p.1040-45, 1994.

WANG, Y.; THAKUR, R.; FAN, Q.; MICHNIAK, B. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.60, p.179 – 191, 2005.

WHEELER, G.D. et al. Functional electric stimulation-assisted rowing: increasing cardiovascular fitness through functional electric stimulation rowing training in persons with spinal cord injury. **Arch. Phys. Med Rehabil.**; v.83, p.1093-99, 2002.

WILD, S.; GOJKA, R.; GREEN, A. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-1053, 2004.