

# ANÁLISE HISTOLÓGICA DE TECIDO TEGUMENTAR EXPOSTO À RADIOFREQUÊNCIA – ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR

## HISTOLOGIC ANALYSIS OF TISSUE INTEGUMENTARY EXPOSED TO RADIOFREQUENCY - EXPERIMENTAL STUDY IN WISTAR RATS

<sup>1</sup>Jones Eduardo Agne;

<sup>2</sup>Liliane de Freitas Bauermann;

<sup>3</sup>Juliana Biermann Krusche;

<sup>3</sup>Luísa Streck;

<sup>3</sup>Marcele Bueno Desconsi;

<sup>4</sup>Mariana Saibt.

1 Fisioterapeuta, Doutor em Psicologia pela USC, docente da Universidade Federal de Santa Maria.

2 Bióloga, Doutorado em Ciências Biológicas (fisiologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, docente da Universidade Federal de Santa Maria.

3 Acadêmicas do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal de Santa Maria.

4 Acadêmica do Curso de Física Bacharelado da Universidade Federal de Santa Maria.

### **Endereço para Correspondência:**

Juliana Biermann Krusche. Rua Diamante, 601, Parque Residencial Santa Lúcia, Bairro Camobi, Santa Maria, RS. Telefone (55) 3307-3929. [juliana.krusche@gmail.com](mailto:juliana.krusche@gmail.com)

### RESUMO

A Radiofrequência (RF) é uma técnica capaz de induzir formação de novas fibras colágenas através da geração de energia térmica no tecido. Este estudo avaliou a resposta tecidual do colágeno, através de análise histológica de tecido tegumentar abdominal de ratos Wistar expostos à Radiofrequência. A amostra de 40 animais foi dividida em três grupos experimentais A, B e C, submetidos a temperaturas de 33°C, 35°C e 41°C respectivamente; e grupo controle, submetido à aplicação com o aparelho desligado, todos por tempo de dois minutos. As amostras teciduais foram coletadas após um mês e coradas com *Picrus Sirius*. O tecido foi avaliado com microscópio óptico de luz refletida polarizada com câmera acoplada.

A quantificação foi realizada com sistema de cruces e contagem de pontos. A análise histológica evidenciou aumento da porcentagem de fibras colágenas tipo I nos grupos A e B em relação ao grupo controle. O resultado das análises de colágeno tipo III demonstrou redução significativa da porcentagem de colágeno do grupo A e relação ao controle. Concluiu-se que uma aplicação de RF com temperaturas de 33°C e 35°C, na pele abdominal de ratos Wistar, apresentou aumento estatisticamente significativo na proporção de fibras colágenas tipo I em relação ao grupo controle.

- **Palavras-chave:** Fisioterapia; Colágeno; Ratos Wistar

#### ABSTRACT

The radiofrequency is a technique capable of inducing formation of new collagen fibers by the generation of thermal energy in tissue. This study evaluated the response of collagen tissue by histological analysis of abdominal cutaneous tissue of rats exposed to radiofrequency. The sample of 40 animals was divided into three experimental groups A, B and C, subjected to temperatures of 32°C, 35°C and 41°C respectively, and the control group, submitted the application with the unit off, all the time by two minutes. The tissue samples were collected after a month and stained with *Picrus Sirius*. The tissue was evaluated with an optical microscope with polarized light reflected camera attached. Quantification was performed with system crosses and count points. Histological analysis showed increased percentage of type I collagen fibers in groups A and B in the control group. The result of the analysis of collagen type III showed significant reduction in the percentage of collagen in group A and the control. It is an application of RF with temperatures of 32°C and 35°C, abdominal skin of rats, showed statistically significant increase in the proportion of type I collagen fibers in the control group.

- **Key-words:** Physical Therapy; Collagen; Rats, Wistar

## INTRODUÇÃO

A Radiofrequência (RF) não ablativa é uma técnica utilizada na Fisioterapia Dermatofuncional para o tratamento de distúrbios dérmicos causados especialmente pelo envelhecimento. Este é responsável por alterações degenerativas na pele [1] como rugas, hiperpigmentação, pele seca, perda de luminosidade e ptose tissular [2].

As fibras colágenas são as principais e mais abundantes fibras do tecido conjuntivo denso, constituinte da derme [1]. A coloração por *Sirius Red*, quando combinada com acentuada birrefringência dessas fibras, pode ser considerada específica para o colágeno [3, 4]. Além disso, ao microscópico de polarização, apresentam diferentes cores: o colágeno tipo I apresenta cor amarela, laranja ou vermelha e o colágeno tipo III aparece em verde [5].

A RF é capaz de estimular mudanças na conformação do colágeno e induzir a formação de novas fibras através da geração de energia térmica, de forma segura, dentro das camadas profundas de tecido [6,24]. A inicial desnaturação de colágeno, dentro destes tecidos modificados termicamente, é o que se pensa ser o mecanismo para imediata modificação do tecido [7].

Devido à dificuldade de estudar a pele humana, o modelo experimental surge como boa opção para pesquisa. Dessa maneira, o rato da linhagem Wistar por ser um animal de pequeno porte, com maior facilidade de manipulação experimental, pequena morbidade e mortalidade torna-se mais adequado para pesquisa [8].

Neste sentido, o estudo se propôs a avaliar a resposta tecidual do colágeno, por meio de análise histológica de tecido tegumentar, frente à aplicação de Radiofrequência na região abdominal de ratos Wistar.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental quantitativo laboratorial, realizada no Laboratório de Fisiologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da

Universidade Federal de Santa Maria após aprovação do Comitê de Ética e Bem Estar Animal da mesma instituição (número do processo 23081.010331/2008-66).

A amostra foi constituída por 40 ratas Wistar, com peso aproximado de 300g, proveniente do Biotério Central da UFSM, a qual foi mantida isolada em gaiolas plásticas apropriadas. Receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidas no Biotério do Departamento de Fisiologia da UFSM, em ciclo claro/escuro, umidade e temperatura padrão do ambiente.

Os estudos publicados na literatura científica não especificam uma temperatura ideal utilizada em modelo experimental animal com RF, o que tornou necessário investigar temperaturas distintas para que a técnica pudesse ser testada em ratos Wistar. Estudo de Abraham e Mashkevich [9] refere que o tratamento de RF com temperaturas, na epiderme, entre 20°C e 35°C estabelece alteração térmica condizente a temperaturas acima de 55°C na derme. Além disso, outra pesquisa [10] mostrou que temperaturas entre 65 e 75°C na derme são críticas para a desnaturação do colágeno. Embasado nesses estudos foram testadas três temperaturas cutâneas externas na região abdominal dos animais: 33°C, 35°C e 41°C.

O controle da temperatura cutânea foi realizado através de um termômetro com medição por infravermelho, sem contato, sobre a pele com gel condutor a base de água. As temperaturas medidas em todos os animais, antes de iniciar o tratamento, variaram entre 27 e 28°C considerando a temperatura do ambiente em torno de 24°C.

Os animais foram divididos ao acaso em quatro grupos sendo um grupo experimental A (GA) submetido à RF com temperatura externa mantida em 33°C; o grupo experimental B (GB), com temperatura mantida em 35°C; grupo experimental C (GC), com temperatura mantida em 41°C e o grupo controle (GD), submetido ao aparelho de RF desligado.

Todos os animais foram inicialmente pesados e anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de solução composta por Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Quetamina (0,1 ml da solução para cada 100g). Após foi realizada tricotomia de 20cm<sup>2</sup> na região abdominal e dorsal de cada animal.

Para a aplicação da técnica utilizou-se o aparelho de RF Spectra®, com frequência de 0,65MHz. A geração de RF por esse equipamento requer uma placa de acoplamento, a qual

foi colocada na região dorsal das cobaias e uma manopla de tratamento colocada sobre a região abdominal previamente marcada e com gel neutro como base de acoplamento.

O tempo de aplicação foi determinado pelo tamanho da manopla e da área tratada [11]. Em uma área de 20 cm<sup>2</sup> de tratamento, foi necessário um tempo de aplicação de dois minutos, mantendo-se a temperatura previamente estabelecida para cada grupo.

Neste estudo as amostras teciduais foram coletadas após um mês da aplicação da técnica [12, 13]. Os fragmentos de pele foram fixados em formol 10% tamponado e tratados convenientemente para coloração por *Picrus Sirius* 1% [3].

Para avaliação das fibras colágenas, utilizou-se microscópio óptico de luz refletida e de polarização. Após a confecção das lâminas, foram capturados quatro campos, ao acaso, de cada lâmina. [14-16]. Estas secções foram digitalizadas com câmera digital acoplada ao microscópio. As imagens foram capturadas com padronização de objetiva de aumento de 20 vezes [16-18], intensidade máxima de luz do microscópio e polarização em plano de 90°. As imagens digitalizadas com tamanho de 2048 x 1536 pixels, correspondem a um campo de 0,415mm x 0,311mm, conforme calibração obtida pelo uso de uma escala padrão. Em cada campo capturado foi sobreposta uma grade de 100 pontos para quantificação do percentual de área ocupado pelas fibras avermelhadas (colágeno I), esverdeadas (colágeno III) através da contagem manual de pontos utilizando o *software Image Tool* [19, 20]. Para o cálculo de área total de colágeno foi descontada a área de outras estruturas/fundo.

Após a determinação de todos os parâmetros experimentais citados anteriormente, foram calculadas as médias e desvio padrão das médias de cada grupo. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan quando apropriado. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## RESULTADOS

Neste trabalho, foram verificadas as concentrações de fibras colágenas tipo I e tipo III na derme de 40 ratas Wistar submetidas à técnica de RF não ablativa com diferentes temperaturas e com o aparelho desligado.

Quanto à contagem histológica das fibras colágenas tipo I (avermelhadas), observou-se que os grupos GA e GB apresentaram porcentagens superiores em relação ao grupo GD com  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente. A comparação do grupo GC com o grupo GD revelou aumento de fibras colágenas tipo I, no entanto, sem haver diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

O resultado das análises de colágeno tipo III (esverdeado) demonstrou redução significativa da porcentagem de colágeno do grupo GA em relação ao grupo GD ( $p < 0,01$ ). Quando comparados os resultados dos grupos GB e GC ao grupo GD, não se observou redução significativa na porcentagem de fibras colágenas ( $p > 0,05$ ). Os valores obtidos estão representados na tabela abaixo:

Tabela I – Média e desvio padrão da porcentagem de colágeno tipo I e tipo III por grupo.

|                                | <i>GA (%)</i> | <i>GB (%)</i> | <i>GC (%)</i> | <i>GD (%)</i> |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Colágeno tipo I (avermelhado)  | 86,06 ± 1,44  | 79,08 ± 9,38  | 71,45 ± 9,2   | 69,4 ± 7,63   |
| Colágeno tipo III (esverdeado) | 16,33 ± 1,44  | 28 ± 8,49     | 28,55 ± 9,2   | 30,6 ± 10,79  |

## DISCUSSÃO

Estudos preliminares demonstraram resultados indicativos de que o procedimento de RF não ablativa produz alterações nas fibras de colágeno e que estas irão produzir alterações visíveis na pele, como redução de rugas e flacidez cutânea [7, 12, 13, 21,24]. No entanto, nenhum destes estudos utilizou modelo experimental animal para comprovar estes efeitos.

Por isso, utilizou-se um modelo experimental animal para avaliar os mecanismos de ação da RF sobre o colágeno. Atendendo aos objetivos propostos, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa na proporção de fibras colágenas tipo I nos grupos GA e GB em

relação ao grupo GD. Estes resultados apontam que, para a amostra estudada, o procedimento de radiofrequência não ablativa contribuiu para a formação de novas fibras colágenas tipo I, corroborando com estudo preliminar de Fritz, Counters e Zelickson [12] que demonstra aumento na quantidade de colágeno tipo I após a aplicação de RF, e com os achados da bibliografia revisada, que sugerem que a aplicação de RF suscita em neocolagenização [6-8, 12,13]. Além disso, estudo de Hantash e col. [22] concluiu que houve um aumento das fibras colágenas tipo I e III após 28 dias de aplicação de RF em pele humana.

Lehto, Sims e Bailey [23] realizaram estudo no qual induziram lesão no músculo gastrocnêmio de ratos e observaram que, uma semana após a lesão, houve aumento na proporção de colágeno tipo I, resultando em uma diminuição da proporção do colágeno tipo III / I em relação ao controle. Em nosso estudo também houve aumento na proporção de colágeno tipo I e diminuição de colágeno tipo III um mês após a aplicação de RF. Isso pode ser explicado pelo fato de que a aplicação de RF promove uma reação inflamatória, pelo aumento da temperatura tecidual, o que provoca uma neocolagenização [8].

Neste estudo foi realizada uma única aplicação de RF não ablativa e as amostras teciduais foram coletadas no período de um mês após a aplicação da técnica com resultados estatísticos significativos, o que confirma os achados de Fitzpatrick e col. [7] que demonstram resultados satisfatoriamente visíveis em humanos com uma única aplicação. Além disso, estudos referem que resultados satisfatórios aparecem em um período de uma semana a quatro meses após a aplicação de RF [12,13].

Segundo os resultados encontrados utilizando a metodologia proposta, houve diferença significativa nas concentrações teciduais de colágeno entre os grupos estudados. Entretanto, mais estudos são necessários para que os resultados obtidos neste trabalho possam ser comparados, subsidiando a aplicação prática da radiofrequência não ablativa.

## CONCLUSÃO

Atendendo ao objetivo proposto, conclui-se que uma única aplicação de RF com temperaturas de 33°C e 35°C na pele abdominal de ratos Wistar, extraída e visualizada através de

microscopia um mês após a aplicação, apresentou aumento estatisticamente significativo na proporção de fibras colágenas tipo I em relação ao grupo controle.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Guimarães GN. Efeito de uma Formulação Contendo DMAE (Dimetila Minoetanol) no Sistema Tegumentar. Estudo Experimental em Suíno. 15º Congresso de Iniciação Científica, out. 2007.
- 2 Souza SLG. Recursos Fisioterapêuticos Utilizados no Tratamento do Envelhecimento Facial. Revista Fafibe On Line, n.3, ago. 2007.
- 3 3. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius Staining Plus Polarization Microscopy, A Specific Method for Collagen Detection in Tissue Sections Histochemical Journal, 1979;11, p. 447 – 455.
- 4 4. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 8ª edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1995.
- 5 5. Junqueira LCU, Cossermeli WS, Brentani RR. Differential Staining of Collagens Type I, II And III by Sirius Red and Polarization Microscopy Arch. Histol.Jap. 1978; 41, p. 267 – 274.
- 6 6. Alster TS, Lupton JR. Remodelação Cutânea Não Ablativa Utilizando Dispositivos de Radiofrequência. Clinics in Dermatology, 2007.
- 7 7. Fitzpatrick R, Geronemus R, Goldberg D, Kaminer M, Kilmer S *et al.* Multicenter Study of Noninvasive Radiofrequency for Periorbital Tissue Tightening. Lasers and Surgery and Medicine, 2003; 33(4).
- 8 8. Noronha L, Chin EWK, Kimura LY, Graf R. Estudo Morfométrico e Morfológico da Cicatrização Após uso do Laser Erbium: YAG em Tecidos Cutâneos de Ratos. Jornal Brasileiro de Patologia Médica, 2004; 40(1): p. 41-8.

- 9 9. Abraham MT, Mashkevich G. Monopolar Radiofrequency Skin Tightening. *Facial Plast Surg Clin N Am*, 2007; 15 169–177.
- 10 10. Fisher GH, Jacobson LG, Bernstein LJ, Kim KH, Geronemus RG. Nonablative Radiofrequency Treatment of Facial Laxity. *Dermatol Surg* 2005; 31(9) 1237- 41.
- 11 11. Benach JC. Tratado de la Tranferencia Electrica Capacitiva (T.E.C.). Editora Bigsa, Barcelona [19--?].
- 12 12. Fritz M, Counters JT, Zelickson BD. Radiofrequency Treatment for Middle and Lower Face Laxity. *Arch Facial Plast Surg*, 2004; 6, p:370-373.
- 13 13. Esparza JR, Gomez JB. The Medical Face Lift: A Noninvasive, Nonsurgical Approach to Tissue Tightening in Facial Skin Using Nonablative Radiofrequency. *American Society for Dermatologic Surgery* 2003, 29. 325-332.
- 14 14. Biondo-Simões MLP, Greca FH, Junior AB, Komatsu CG, Bittencourt FO *et al.* Influência da Peritonite Sobre a Síntese de Colágeno em Anastomoses do Cólon Distal Estudo Experimental em Ratos *Acta Cir. Bras.* 2000; 15 (3).
- 15 15. Greca FH, Biondo-Simões MLP, Collaço LM, Martins VDM, Tolazzi ARD *et al.* A Ação dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta na Cicatrização de Anastomoses Colônicas Estudo Experimental em Ratos *Acta Cir. Bras.* 2000 15(3) .
- 16 16. Santos LOM, Biondo-Simões MLP, Ioshii S. O Efeito dos Estrógenos Conjugados e da Medroxiprogesterona sobre a Mama: Estudo Experimental *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* . 2001; 23 (8).
- 17 17. Biondo-Simões MLP, Alcântara EM, Dallagnol JC, Yoshizumi KO, Bleggi LF, *et al.* Cicatrização de Feridas: Estudo Comparativo em Ratos Hipertensos não Tratados e Tratados com Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina *Rev. Col. Bras. Cir.* 2006; 33(2).

- 18 18. Mendonça AC, Ferreira AS, Barbieri CH, Thomazine JA, Mazzer N. Efeitos do Ultra-Som Pulsado de Baixa Intensidade Sobre a Cicatrização por Segunda Intenção de Lesões Cutâneas Totais em Ratos ACTA ORTOP BRAS 2006; 14(3).
- 19 19. Rangan GK, Tesch GH. Methods in Renal Research Quantification of renal pathology by image analysis Nephrology 2007; 12, 553–558.
- 20 20. Tenius FP, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos An Bras Dermatol. 2007;82(2):141-9.
- 21 21. Edelstein, PS. Radiofrequency Energy in Medicine. Novasys Medical, Inc. 2004; 4 (7) p. 1-3.
- 22 22. Hantash BM, Ubeid AA, Chang H, Kafi R, Renton B Bipolar fractional radiofrequency treatment induces ne elastogenesis and neocollagenesis. Lasers Surg Med. 2009 Jan;41(1):1-9.
- 23 23. Lehto M, Sims TJ, Bailey AJ. Skeletal muscle injury—molecular changes in the collagen during healing. Journal Research in Experimental Medicine. 1985, 185(2), p. 95-106.
- 24 24. Agne JE. Eu sei eletroterapia. Sociedade Vicente Pallotti, 2009.