

# ANALISE HISTOLOGICA DOS EFEITOS DA ELETROPORAÇÃO NA PENETRAÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA LIPOSSOMADA NAS CAMADAS DA PELE: ESTUDO PILOTO

*Analysis Histological The Effects of Electroporation in the Penetration of a Substance in Liposomes on the Layers of the Skin*

*Rodrigo Marcel Valentim da Silva<sup>1</sup>, Patrícia Froes Meyer<sup>2</sup>, Maria Goretti Freire de Carvalho<sup>3</sup>.*

---

## RESUMO

---

Contextualização: A técnica de eletroporação é um processo físico que favorece o aumento temporário da permeabilidade da membrana plasmática devido à radiofrequência de baixa amperagem que facilita a entrada das substâncias. Objetivo: O objetivo desse estudo foi verificar os efeitos da eletroporação na penetração de substâncias nas camadas da pele. Método: Trata-se de uma pesquisa quasi-experimental, sendo um estudo piloto, tendo como amostra 3 ratos pesando entre 250 g e 300 g, de ambos os sexos, linhagem Wistar. Os animais foram divididos em três amostras, a primeira recebeu a aplicação do gel lipossomado misturado ao corante azul de anilina, na segunda foi aplicado com o corante violeta genciana e na terceira foi colocado o corante tinta china. Utilizou-se a eletroporação com ondas eletromagnéticas moduladas e pulsadas a 50 Hz e uma dose de 60W por cerca de 20 minutos. Resultados: A análise morfológica e histológica mostrou que não ocorreu a penetração esperada das substâncias testadas, o corante tinta china atingiu a camada córnea. Conclusão: Sendo assim a eletroporação não promoveu a penetração de uma substância lipossomada na célula adiposa.

**Palavras Chaves:** Modalidades de Fisioterapia, Eletroterapia, Pele.

---

## ABSTRACT

---

Background: The technique of electroporation is a physical process that favors the temporary increase in plasma membrane permeability due to low amperage radiofrequency which facilitates the penetration of substances. Objective: The aim of this study was to investigate the effects of electroporation on the penetration of substances into the skin layers. Method: This was a quasi-experimental research, being a pilot study, with a sample of 3 Wistar rats weighing between 250 g and 300 g, of both sexes. The animals were divided into three samples, received the first application of the gel lipossomado mixed with aniline blue dye. The second dye was applied with gentian violet was placed at the third and the dye ink china. It was used electroporation with electromagnetic waves pulsed and modulated at 50 Hz and a dose of 60W for 20 minutos. Results: morphological and histological analysis showed that there was no penetration of the tested substances expected, the china ink reached the cornea layer. Conclusion: electroporation did not promote the penetration of a lipossomada substance into the fat cell .

**Key Words:** Physical Therapy Modalities, Electrotherapy, skin.

1 Mestre em Fisioterapia pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN.

2 Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN. Docente do Curso de Fisioterapia da Universidade Potiguar, Natal/RN.

3 Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN. Docente do Curso de Medicina da Universidade Potiguar, Natal/RN.

Autor Correspondente:

Rodrigo Marcel Valentim da Silva

Endereço: Rua Nossa Senhora de Fátima, 312 b, Alecrim, Natal/RN.

CEP: 59030080

Email: marcelvalentim@hotmail.com

---

## **INTRODUÇÃO**

---

A membrana plasmática das células é formada por uma bicamada de fosfolípidios possuindo molécula de proteínas interpostas na sua estrutura. Uma característica ímpar das membranas biológicas é a propriedade da permeabilidade seletiva, onde há um mecanismo morfofisiológico responsável pelo fluxo de entrada e saída de substâncias na célula através da membrana lipoproteica<sup>1,2</sup>.

Existem duas formas básicas de transportes de substâncias através da membrana plasmática, o primeiro trata-se de um transporte ativo, que exige um gasto energético do metabolismo da célula para a transposição de substâncias através da membrana. Contudo, a segunda forma de transporte ocorre de maneira passiva, portanto sem gasto energético pela célula, podendo ocorrer pelo mecanismo de difusão simples, difusão facilitada (com ação de transportadores protéicos e específicos na membrana de célula) ou por osmose<sup>2,3</sup>.

A técnica de eletroporação é um processo físico que favorece o aumento temporário da permeabilidade da membrana plasmática, permitindo o trânsito de substâncias do meio extracelular para o intracelular, ou no sentido inverso. É uma terapia transdérmica de crescente importância no campo de estudo das ciências da saúde e biológica, onde inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas para melhor conhecer as suas potencialidades e limitações<sup>4,5</sup>.

A eletroporação ocorre pela passagem de corrente elétrica ao longo da membrana, promovendo o surgimento de poros e permitindo o fluxo de moléculas maiores para dentro ou fora da célula. A análise por microscópio eletrônico tem demonstrado que através dos pulsos eletromagnéticos ocorre a abertura e o fechamento de poros na célula. Desse modo, há uma veiculação transdérmica de diversos princípios ativos, iônicos ou não, de diversos tamanhos ou peso moleculares, hidrossolúvel ou lipossolúvel. Nesta técnica, a exposição das células a pulsos de correntes de alta voltagem torna a membrana plasmática 400 vezes mais permeável, uma vez que poros temporários são formados, aumentando, conseqüentemente, o fluxo de substâncias através das células<sup>6,7</sup>.

A eletroporação seria um método eficiente para potencializar a entrada de RNA, proteínas, corantes, hormônios e drogas tanto em células animais quanto em vegetais por via transdérmicas. As aplicações práticas variam desde transferência genética para plantas, bactérias, leveduras até transporte de quimioterápicos. Existem várias vantagens na utilização da eletroporação, entre elas a ação localizada da droga, com conseqüente ausência de efeitos colaterais decorrentes de ações sistêmicas. As ondas eletromagnéticas são ionizantes e atômicas, não há contato elétrico com o paciente, o que evita a possibilidade de queimaduras, fasciculações musculares, dor e processo inflamatório<sup>5,6</sup>.

Assim surgiu o interesse de experimentar a aplicação da técnica de eletroporação utilizando um gel lipossomada de fotodilcolina com um aparelho nacional com o objetivo de observar a possível penetração destas substâncias na pele. Portanto, este estudo buscou investigar os efeitos da transdermoterapia por eletroporação na administração de substâncias na pele, através da penetração dos corantes nas camadas da epiderme, derme e hipoderme ao utilizar uma substância lipossomada.

---

## **MÉTODOS**

---

Trata-se de uma pesquisa quase-experimental, sendo um estudo piloto. A população pesquisada foi constituída de ratos Wistar (Rattos norvegicos albinus) de ambos os sexos. A amostra do proposto estudo foi composta de 03 ratos pesando entre 250 g e 300 g procedentes do biotério da Universidade Potiguar. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética e pesquisa com animais com o parecer número 052/2008.

Foram utilizados os seguintes instrumentos para coleta: aparelho de eletroporação (Dermoporation KS 5000 da marca Kroman), gel lipossomado (Farmácia Lidherma, Argentina), microscópio óptico e câmara digital (marca Olympus).

O procedimento foi iniciado com a limpeza da aérea a ser tratada e utilização de álcool etílico, após a tricotomia dos pêlos dessa região. Em seguida foi aplicada a substância lipossomada com o cabeçote estacionário no dorso do animal, com emissão de onda eletromagnética de alta frequência durante vinte minutos.

Os animais foram divididos em três grupos, o primeiro recebeu a aplicação do gel lipossomado misturado ao corante azul de anilina, no segundo foi aplicado o mesmo gel lipossomado com o corante violeta genciana e o terceiro recebeu corante tinta china misturado ao gel lipossomado. Foram realizadas 5 aplicações de ondas moduladas e pulsadas a 50 Hz, com uma dose de 60W.

Após a série de aplicações, os animais foram sacrificados e foi coletado, mediante bisturi, um fragmento dos tecidos de todos os animais na área correspondente a aplicação. Em seguida, os fragmentos foram colocados em frascos apropriados e devidamente identificados, contendo 20 ml de solução de formol a 10%. Após 24 horas de fixação, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de patologia para processamento histológico de rotina e análise visual morfológica. O material foi emblocado em parafina, cortado em micrótomo rotativo, com 4 micrometros e corado pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE)<sup>11</sup>. Finalizada a confecção das lâminas, as mesmas foram examinadas por uma patologista de maneira cega, em microscópio óptico. Microfotografias foram realizadas com câmara digital Olympus acoplada ao microscópio.

---

## **RESULTADOS**

---

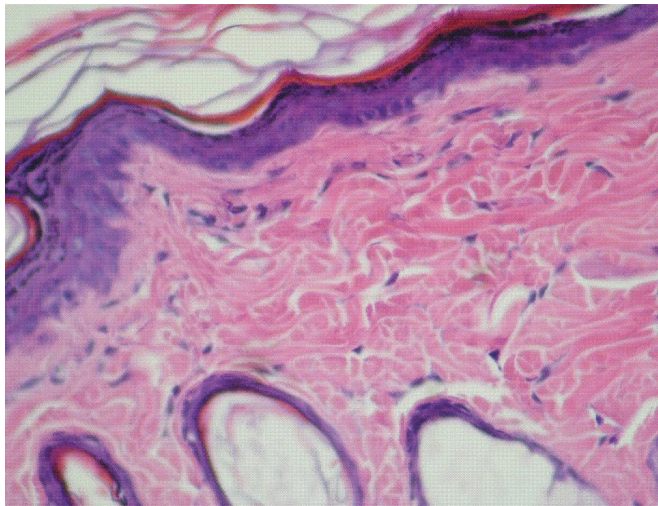
A figura 01 representa a lâmina do primeiro animal, que recebeu a aplicação de corante azul de anilina. Observa-se que não houve a penetração da substância ao nível de derme, de modo que o corante azul de anilina permaneceu restrito a parte externa da pele. Na análise morfológica foi possível visualizar uma alteração da coloração da pele do animal para azul, mas apenas externamente.

A figura 02 representa a lâmina da pele do segundo rato submetido a aplicação do corante violeta genciana associada ao gel lipossomado. Foi observado que não houve penetração da substância nas camadas da pele quando analisado pela microscopia óptica, o mesmo aconteceu na análise morfológica que demonstrou a substância retida na parte externa da pele (figura 03).

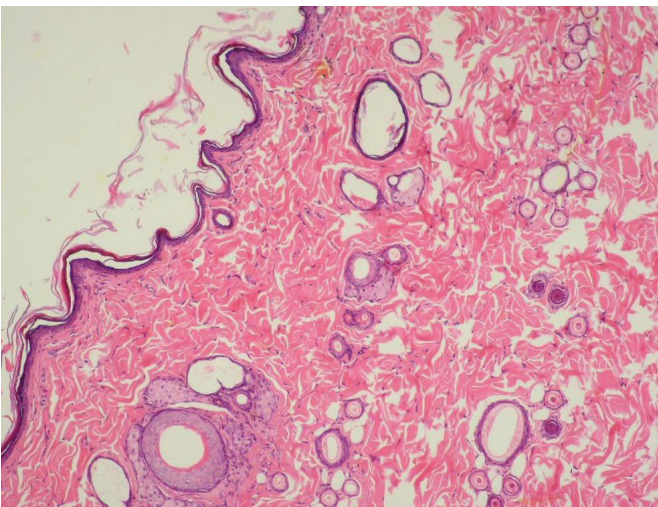
Na figura 03 foi observada a lâmina referente ao animal submetido à aplicação com o corante tinta china associada ao gel lipossomado. A análise morfológica do tecido coletado dos animais mostrou que apenas a substância lipossomada associada

ao corante tinta china penetrou na parte interna do fragmento de pele, não ficando apenas restrita a parte externa. Na análise histológica percebe-se a presença do corante ao nível da camada córnea, melhor visualizado do que na análise do corante azul de anilina.

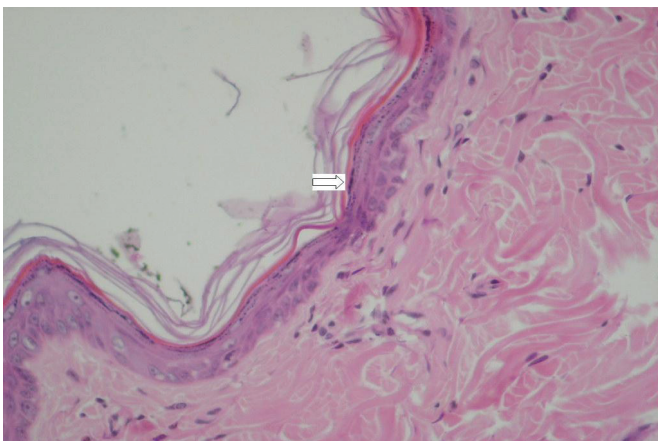
**Figura 1:** Aplicação do corante azul de anilina associado ao gel lipossomado utilizando a técnica da eletroporação.



**Figura 02:** Aplicação do corante violeta genciana associado ao gel lipossomado utilizando a técnica da eletroporação.



**Figura 03:** Aplicação do corante tinta china associado ao gel lipossomado utilizando a técnica da eletroporação. Presença do corante tinta china na camada córnea.



## DISCUSSÃO

A análise morfológica mostrou apenas a penetração da substância lipossomada associada à tinta china. Nos resultados histológicos foi constatado que a utilização dos três corantes não permitiu a visualização da penetração da substância lipossomada ao nível da derme, apenas na epiderme. De acordo com os resultados divulgados pela análise histológica, provavelmente não ocorreu uma união suficiente entre a substância lipossomada e o corante violeta genciana, fato este que impediu a visualização da penetração desta substância de maneira mais profunda na pele.

Verificou-se também que a utilização do corante azul de anilina com o gel lipossomado provocou o acúmulo da mistura no estrato córneo. Existe a possibilidade do peso molecular do azul de anilina, mais alto que o dos demais corantes utilizados (319,85 unidades atômicas)<sup>7</sup> tenha sido responsável por esta dificuldade de penetração destas substâncias, pois mesmo utilizando-se a técnica de eletroporação não foi possível observar a chegada do corante na epiderme abaixo da camada córnea.

Na utilização do corante tinta china associado ao gel lipossomado foi observado a penetração deste composto em maior quantidade no estrato córneo. Esse resultado corrobora com outros estudos<sup>8</sup>, que perceberam que a penetração deste corante no estrato córneo da epiderme. Esta pesquisa difere do estudo citado porque não foi utilizado o microscópio eletrônico na análise histológica, recurso que permitiu a visualização histológica de concentrações de substância também na derme, folículo piloso e principalmente ao redor de vasos sanguíneos.

Apesar da promissora eficácia disposta sobre a aplicação da técnica de eletroporação, poucos estudos demonstram a eficiência da penetração de substâncias através da pele, devido a dificuldades na realização de experimentos, bem como a propriedade de semi-permeabilidade da membrana plasmática, que restringe a entrada de substâncias no meio intracelular. A penetração de tinta china nas porções do estrato córneo e epiderme localizada ao redor dos vasos sanguíneos, quando utilizada à microscopia óptica, no entanto ao utilizar microscopia eletrônica foi verificada a presença do corante na camada da derme, de forma individualizada e também em fibras colágenas e músculos<sup>8</sup>.

A técnica de eletroporação é um processo físico promissor que favorece o aumento temporário da permeabilidade da membrana plasmática, permitindo o trânsito de substâncias, conforme mostram muitos estudos. É uma terapia transdérmica de crescente importância no campo de estudo das ciências da saúde e biológica<sup>9,10</sup>. Desde modo, esta pesquisa ficou limitada a análise da microscopia óptica, sugerindo-se a realização de novos estudos com uma amostra maior de animais e com a análise através da microscopia óptica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albert B. et al. Fundamentos da Biologia: uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed, 1998.
2. Barbosa AM, SILVA RTS. Transdermoterapia por eletroporação na promoção da lipólise abdominal. Monografia do curso de Fisioterapia. Universidade Potiguar: Natal, 2006.
3. Animale, Ma; Gatti, CJ. Introducción a las Técnicas Histológicas. Disponível em: <http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona=modtecni>. Acesso em 22 de out. 2008
4. Fukushima S, Kishimoto S, Miyawaki K, Kamiyabu S, Kamata Y, Yamaoka T. Transdermal drug delivery by electro-

poration applied on the stratum corneum rat using stamp-type electrode and frog-type electrode in vitro. 2001 Pharmaceutical Society of Japan, 2001; 24(4): 91027 .

5. Iorio FF, DI Stasi CA, Borges FS. Eletroporação: Uma revisão. Revista Fisioterapia Ser.2007,2(2):\_\_.

6. Medi BM, Singh J. Electronically facilitated transdermal delivery of human parathyroid hormone. International Journal of Pharmaceutics. 2003, 26(1):25-33.

7. Pécora JD, Costa WF, Roselino R B. Estudo da instabilidade dimensional de dois materiais seladores provisórios usados em Endodontia. RBO. 1986: 17(2):51-56.

8. Ortega VV, Martínez AF, Gascon MJY, Bãnos MA., Sãnches JC, Benavente-garcia O, Bolarin VJ. Administración transdérmica de tinta china con tdes. International Journal of Cosmetic Medicine and Surgery.2005;7(3):\_\_.

9. Ramos A. et. al. Numerical Simulation of Electroporation in Spherical Cells. Artificial Organs,2004;28(4):357-361.

10. Roghanizad N, Jones JJ. Evaluation of coronal microleakage after endodontic treatment. Am Assoc Endo. 1996;22(9):471-473.