

# Efeito da estimulação elétrica de alta voltagem e insulina tópica em lesão cutânea experimental

*Effect of high-voltage electrical stimulation and topical insulin on experimental cutaneous lesions*

*Resultados de la estimulación eléctrica por alta voltaje e insulina tópica en lesión cutánea experimental*

Rafaela Ferreira<sup>1</sup>, Elaine Caldeira de Oliveira Guirro<sup>2</sup>, Carlos Alberto da Silva<sup>3</sup>, Maria Luiza Ozores Polacow<sup>3</sup>

**RESUMO** | O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) catódica, associada à insulina tópica, em lesão tegumentar de ratos. Para isso, foram utilizados 42 ratos Wistar (240±30 g), submetidos a retirada cirúrgica de 1 cm<sup>2</sup> de pele do dorso em seis grupos (n=7), tratados por sete dias consecutivos: controle (C), estimulação elétrica placebo (EP), estimulação elétrica catódica (EE), insulina tópica (IT), insulina placebo (IP) e EEAV associada a insulina tópica (EE+I). A EEAV foi administrada 24 horas após a cirurgia, 30 minutos por dia, com frequência de 100 Hz e voltagem média de 60 V, mantida no limiar motor. Áreas das lesões foram registradas macroscopicamente no primeiro, quarto e oitavo dia, sendo submetidas a tratamento histológico para inclusão em paraplax<sup>®</sup> e coloração em hematoxilina e eosina. A epitelização e o perfil numérico das células foram obtidos por análises histométricas. Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk e ANOVA one-way seguida de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Observou-se redução significativa na área da lesão no oitavo dia de tratamento, nos grupos EE e EE+I em relação aos demais grupos. A reepitelização não diferiu entre os grupos, mas a distância entre as bordas da lesão foi menor nos grupos EE e EE+I. Nesses grupos houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número de fibroblastos e diminuição de leucócitos. Pode-se concluir que a EEAV catódica acelerou o processo de reparação da lesão, não demonstrando efeito adicional com a aplicação da insulina tópica.

**Descritores** | Estimulação Elétrica; Insulina; Ratos Wistar/lesões.

**ABSTRACT** | This study aims to evaluate the effect of cathodic high voltage electrical stimulation (HVES), associated with topical insulin, on rat integumentary lesions. For this purpose, 42 Wistar rats (240±30 g) were submitted to surgical removal of 1 cm<sup>2</sup> of dorsal skin and divided into six groups (n=7), treated for seven consecutive days: Control (C), placebo electrical stimulation (PES), cathodic electrical stimulation (ES), topical insulin (TI), placebo insulin (PI) and HVES associated with topical insulin (ES+I). HVES was administered 24 hours after surgery, 30 minutes per day, with a frequency of 100 Hz and a mean voltage of 60 V, maintained at the motor threshold. Lesion areas were recorded macroscopically on the first, fourth and eighth day, submitted to histological treatment for inclusion in paraplax<sup>®</sup> and staining in Hematoxylin and Eosin. Epithelialization and the numerical profile of the cells were obtained by histometric analysis. The Shapiro-Wilk and Anova oneway test was followed by the Bonferroni ( $p < 0.05$ ). There was a significant reduction in the area of the lesion by the eighth day of treatment, both in the ES and ES+I groups, when compared with other groups. Reepithelialization did not differ between groups, but the distance between the edges of the lesion was lower in the ES and ES+I groups. These same groups showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the number of fibroblasts and a decrease in leukocytes. Thus, we can conclude that cathodic HVES accelerated the lesion repair process, with the topical application of insulin showing no additional effect.

**Keywords** | Electric Stimulation; Insulin; Rats Wistar/injuries.

<sup>1</sup>Mestrado em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba (Unimep) – Piracicaba (SP), Brasil.

<sup>2</sup>Professor doutor de Fisioterapia, Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

<sup>3</sup>Professor doutor do Programa de Pós-Graduação da Universidade Metodista de Piracicaba (Unimep) – Piracicaba (SP), Brasil.

**RESUMEN** | El propósito de este estudio fue evaluar el resultado de la estimulación eléctrica por alta voltaje (EEAV) catódica, asociada a la insulina tópica, en lesión cutánea de ratas. Para ello, se utilizaron 42 ratas Wistar (240±30 g), les sometieron a cirugía de retirada de 1 cm<sup>2</sup> de piel del dorso en 6 grupos (n=7), y les trataron por siete días consecutivos: control (C), estimulación eléctrica placebo (EP), estimulación eléctrica catódica (EE), insulina tópica (IT), insulina placebo (IP) y EEAV asociada a la insulina tópica (EE+I). Se aplicó la EEAV 24 horas después de la cirugía, 30 minutos por día, con frecuencia de 100 Hz y voltaje de media tensión de 60 V, y la mantuvo en el umbral motor. Se registraron las áreas de las lesiones macroscópicamente en el primer, cuarto y octavo día, y las sometieron al tratamiento histológico para inclusión en paraplást® y tinción

hematoxilina-eosina. Se obtuvo la epitelización y el perfil numérico de las células por análisis histométricos. Se empleó la prueba Shapiro-Wilk y ANOVA one way de Bonferroni ( $p<0,05$ ). Se redujo significativamente el área de la lesión en el octavo día del tratamiento en los grupos EE y EE+I comparados a los demás grupos. La reepitalización no fue distinta entre los grupos, sin embargo, la distancia entre los bordes de la lesión fue menor en los grupos EE y EE+I. También en estos grupos aumentó significativamente ( $p<0,05$ ) el número de fibroblastos y disminuyeron los leucocitos. Se concluye que la EEAV catódica aceleró el proceso de reparación de la lesión, pero no ocurrió resultado con la aplicación de la insulina tópica.

**Palabras clave** | Estimulación Eléctrica; Insulina; Ratas Wistar/ lesiones.

## INTRODUÇÃO

A reparação de lesões é um processo que integra complexos eventos biológicos e moleculares, com forte interferência entre células e o microambiente ao redor. Compreende várias fases, coagulação, inflamação, migração, proliferação e remodelação, que se sobrepõem no tempo e no espaço<sup>1</sup>. Esses eventos são caracterizados por alterações na composição e organização da matriz extracelular e pela expressão local de vários fatores de crescimento<sup>2</sup>.

Fundamentada por evidências científicas, a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) vem se destacando na regeneração de lesões, tanto na pesquisa quanto na área clínica<sup>3-5</sup>. Diversos estudos evidenciam a utilização da EEAV na cicatrização de úlceras crônicas, porém há escassez de estudos que avaliem os efeitos desse recurso em lesões agudas<sup>3,6-9</sup>.

O uso da insulina também tem sido relatado há muitas décadas, e vários estudos apontam sucesso no tratamento de lesões crônicas em humanos diabéticos<sup>1,10,11</sup>, bem como em coelhos<sup>12</sup>. Liu et al.<sup>1</sup> mostraram que insulina aplicada topicamente acelerou a reepitelização e a maturação da reparação de lesões, por estimular a migração e diferenciação de queratinócitos.

O tratamento ideal de uma lesão cutânea consiste na instituição de medidas profiláticas, porém, uma vez instalada, deve-se intervir precocemente, objetivando evitar ou minimizar os riscos recorrentes, bem como facilitar o processo de cicatrização.

A utilização clínica de recursos que aceleram a regeneração de lesões como a EEAV, bem como a que insulina apresenta resultados celulares positivos em casos de lesões cutâneas mesmo quando aplicado em condição não diabética<sup>13</sup>, aventa-se a hipótese de que a estimulação elétrica aliada ao recurso farmacológico insulina tópica possa incrementar os efeitos inerentes de ambos os recursos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos tratamentos com estimulação elétrica de alta voltagem catódica, aplicação de insulina tópica, e a associação de ambas intervenções terapêuticas na regeneração tegumentar de ratos.

## METODOLOGIA

Foram utilizados 42 ratos Wistar, entre 3 e 4 meses (240-±-30 g), divididos de forma aleatória em seis grupos (n=7): 1) controle (C) – lesão sem nenhum tratamento; 2) EE placebo (EEP) – lesão e simulação de tratamento com EEAV; 3) EE (EE) – lesão e tratamento com EEAV catódica; 4) insulina (I) – lesão e tratamento com insulina tópica; 5) insulina placebo (IP) – lesão e tratamento com creme dermatológico sem princípio ativo e 6) EE + insulina (EE+I) – lesão e tratamento com EEAV catódica + insulina tópica.

A intervenção terapêutica foi efetuada por sete dias consecutivos, sendo os animais mantidos no biotério, em gaiolas individuais, com ração e água *ad libitum*, expostos a ciclo de claro/escuro de 12 horas.

Para a intervenção cirúrgica, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intramuscular de Dopalen (cloridrato de ketamina) e Rompun (cloridrato de xilazina) na proporção de 2:1, na dose de 0,09mL/100g e 0,06mL/100g, e tiveram os pelos da região dorsal removidos manualmente. Nessa região, foi retirado 1 cm<sup>2</sup> de pele, incluindo a hipoderme, com auxílio de um gabarito vazado milimetrado de plástico e bisturi de lâmina 11.

O início da intervenção terapêutica ocorreu um dia após a cirurgia, sendo que a aplicação da EEAV teve duração de 30 minutos, em sete dias consecutivos, sob indução anestésica semelhante a aplicada na intervenção cirúrgica. A frequência utilizada foi de 100 Hz, e a tensão variou de 20 a 100 V, tendo como parâmetro o limiar motor de cada rato. A tensão foi aumentada durante todo o tempo de aplicação para evitar a acomodação da corrente.

Sobre a lesão foi acoplado um eletrodo ativo de silicone-carbono, medindo 2 cm<sup>2</sup>, sobre gaze estéril umedecida com soro fisiológico, e na região abdominal foi colocado o eletrodo dispersivo, medindo 4 cm<sup>2</sup>, untado com gel estéril. O equipamento utilizado foi *Neurodyn High Volt* – ANVISA 10360310008 (IBRAMED®), sendo que o grupo EEP foi exposto aos mesmos procedimentos, porém, com equipamento desligado.

Para o tratamento com insulina tópica e insulina placebo foi aplicada quantidade suficiente para cobrir a área da lesão (0,7 gramas de creme). A insulina tópica (0,5 U/g) utilizada foi fornecida pela farmácia do Hospital Universitário da Unicamp, com a patente: PI 0705370-3 UNICAMP. No grupo EE+I a aplicação da insulina foi realizada após a estimulação elétrica.

O registro fotográfico padronizado da lesão cutânea foi efetuado com uma câmera digital (Sony Cybershot 8.1), posicionada a 40 cm da superfície da lesão de forma perpendicular. No mesmo plano da lesão foi posicionada uma régua milimetrada. Esses registros foram feitos no primeiro dia, logo após a cirurgia, no quarto e oitavo dia. A área da lesão foi mensurada no software Image Pro plus 6.2 (Media Cybernects). Cada imagem foi calibrada tendo como base a régua contida na foto, as margens foram selecionadas automaticamente, sendo o valor da área calculado automaticamente e expresso em cm<sup>2</sup>.

As medidas lineares da reepitelização foram obtidas a partir da borda da lesão até a extremidade do epitélio em regeneração somando-se as duas extremidades. As medidas do centro da lesão foram mensuradas entre

as extremidades do epitélio regenerado, ambas em 15 cortes não seriados por animal, utilizando-se uma ocular milimetrada Carl Zeiss com objetiva de 4x. Essas medidas foram ajustadas pelo coeficiente micrométrico segundo Mandarin-de-Lacerda et al.<sup>14</sup>.

Para a quantificação das células, fibroblastos e leucócitos, a coloração das amostras foi feita com hematoxilina-eosina, e utilizou-se um microscópio de luz com objetiva de 100x, adaptado com uma ocular reticulada (Carl Zeiss, KF 10x/18) em 15 áreas de 1000 μm<sup>2</sup>.

Para a análise da área da lesão foi utilizado ANOVA com medidas repetidas, seguida de *post-hoc* de Bonferroni ou teste de Tamhane ( $p < 0,05$ ). Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para normalidade dos dados da epitelização e perfil numérico das células e ANOVA one-way seguida de *post-hoc* de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Observa-se pela Tabela 1, que todos os grupos experimentais apresentaram redução da área da lesão entre o primeiro e o dia. Já na análise intergrupos, o grupo EE apresentou porcentagem de redução significativamente maior da área da lesão, quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), exceto o grupo EE+I.

Tabela 1. Média ± desvio-padrão (em cm<sup>2</sup>) da área das lesões nos diferentes dias (primeiro, quarto e oitavo dia) e porcentagem de redução da área da lesão dos grupos: controle - C; estimulação elétrica placebo - EEP; estimulação elétrica - EE; insulina - I; insulina placebo - IP; estimulação elétrica + insulina - EE+I

Grupos	1º dia	4º dia	8º dia	% de redução
Controle	1,16±0,15	0,83±0,12	0,46±0,16*	60,3%
Estimulação elétrica placebo	1,34±0,18	0,90±0,17	0,58±0,17*	56,7%
Estimulação elétrica	1,28±0,17	0,71±0,09	0,27±0,10	78,9%
Insulina	1,11±0,08	0,91±0,17	0,41±0,12*	63%
Insulina placebo	1,31±0,17	1,19±0,30	0,48±0,08*	63,3%
Estimulação elétrica + insulina	1,11±0,08	0,79±0,05	0,33±0,08	70,3%

\* $p < 0,05$  versus EE

As medidas lineares da reepitelização, isto é, a extensão da epiderme a partir das margens até a borda livre no centro da lesão, podem ser observadas na Tabela 2, onde se verificam valores semelhantes nos vários grupos experimentais. Na mesma tabela, observa-se também a distância central da lesão, isto é, entre os epitélios em crescimento de ambas as bordas. Nota-se

na Tabela 2, que a melhor taxa de fechamento da lesão ocorreu nos grupos tratados com EEAV (EE e EE+I), os quais diferiram do grupo I ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2. Média  $\pm$  desvio-padrão (em  $\mu\text{m}$ ) da reepitelização (crescimento do epitélio) e da distância entre as bordas da lesão (fechamento da lesão) dos grupos: controle - C; estimulação elétrica placebo - EEP; estimulação elétrica - EE; insulina - I; insulina placebo - IP; estimulação elétrica + insulina - EE+I

Grupos	Reepitelização	Distância entre as bordas
Controle	1615,93 $\pm$ 1345,62	2159,51 $\pm$ 809,51
Estimulação elétrica placebo	1504,04 $\pm$ 1436,76	2156,60 $\pm$ 7470,80
Estimulação elétrica	1437,70 $\pm$ 506,81	1120,40 $\pm$ 840,43*
Insulina	1443,75 $\pm$ 228,82	3202,46 $\pm$ 1417,73
Insulina placebo	1845,30 $\pm$ 692,77	2683,02 $\pm$ 1162,61
Estimulação elétrica + insulina	1936,76 $\pm$ 437,80	1108,38 $\pm$ 780,69*

\* $p < 0,05$  versus I

A Tabela 3 mostra os valores do número de fibroblastos e leucócitos no leito da lesão. Pode-se observar média maior de fibroblastos nos grupos tratados com EEAV, tanto no grupo isolado (EE) como associado à insulina tópica (EE+I), que não diferem entre si. Nesses grupos, o número de leucócitos foi menor. O grupo EE apresentou redução significativa em relação a todos os grupos, exceto EE+I ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Média  $\pm$  desvio-padrão do número de fibroblastos e leucócitos em 1000  $\mu\text{m}^2$  na derme em regeneração dos grupos: controle - C; estimulação elétrica placebo - EEP; estimulação elétrica - EE; insulina - I; insulina placebo - IP; estimulação elétrica + insulina - EE+I

Grupos	Fibroblastos	Leucócitos
Controle	40,56 $\pm$ 7,4*\$	11,80 $\pm$ 5,47*
Estimulação elétrica placebo	39,8 $\pm$ 3,5*\$	10,37 $\pm$ 2,3*#
Estimulação elétrica	53,3 $\pm$ 5,21	5,00 $\pm$ 1,69#
Insulina	46,9 $\pm$ 3,9*\$	10,46 $\pm$ 1,9*#
Insulina placebo	43,18 $\pm$ 4,9*\$	17,18 $\pm$ 3,33*
Estimulação elétrica + insulina	55,71 $\pm$ 9,5	6,86 $\pm$ 2,01#

\* $p < 0,05$  versus EE; \$  $p < 0,05$  versus EE+I; # $p < 0,05$  versus IP

## DISCUSSÃO

Há fatores que interferem na cicatrização, classificados em influências locais (infecção, perfusão tecidual local, tipo de tecido lesado) e sistêmicas (idade, nutrição, tensão tecidual de oxigênio, diabetes, condição imunológica, doenças associadas)<sup>15</sup>. Para que os resultados fossem mais fidedignos, essas influências foram eliminadas deste estudo, já que foram utilizados

ratos da mesma idade e raça, mesmo mecanismo de lesão, mesma dieta e foram mantidos em ambiente controlado. Além disso, o nível de estresse também foi considerado, com a utilização de um grupo de animais placebo, que passaram por cirurgia, manuseio e anestesia diariamente, e não diferiram do controle.

Acredita-se que a eletroestimulação acelera o processo de reparação da lesão, por imitar a corrente elétrica que ocorre na pele, quando ela é lesada<sup>16</sup>. Os resultados apresentados mostraram que houve redução da área das lesões cutâneas na fase aguda, em todos os grupos, inclusive nos animais dos grupos controle e placebo. Quando submetidos à associação dos tratamentos (EE+I), apresentaram alta taxa de fechamento (70%). Porém, foi no grupo EE que se deu a melhor porcentagem de redução (78,9%), diferindo estatisticamente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

A aplicação de diferentes polaridades pode interferir na resposta tecidual, uma vez que as diversas células presentes na cicatrização podem migrar em função da carga, fato apontado por Kloth e McCulloch<sup>17</sup>, que observaram atração pelo polo negativo de células como neutrófilos e macrófagos, ocorrendo então uma autólise para solubilizar a necrose.

Neste trabalho, utilizando-se o polo negativo, não se observou aumento da reepitelização, ou seja, no crescimento do epitélio. No entanto, a distância entre as bordas epitelizadas, que representam o fechamento da lesão e sua contração, foi significativamente melhor nos grupos tratados com EEAV, tanto isoladamente (EE) como associada à insulina tópica (EE+I), assim como a porcentagem de redução da área da lesão também foi significativamente maior no grupo EE. Esses resultados ratificam os efeitos da EEAV catódica na cicatrização de lesões cutâneas.

Quanto às células da derme, ocorreu expressiva diminuição do número de leucócitos nos grupos tratados com EE e aumento significativo de fibroblastos nos grupos EE e EE+I, evidenciando os benefícios da EEAV catódica, pois esses resultados não foram encontrados em nenhum outro grupo. Ainda pode-se observar que no grupo tratado com insulina placebo houve um aumento significativo no número de leucócitos, refletindo a exacerbação do processo inflamatório, uma vez que a lesão não foi tratada com nenhum recurso terapêutico ativo, como a estimulação elétrica ou a insulina tópica.

A diferença entre as medidas de reepitelização e da distância entre as bordas da lesão, que ocorreu neste estudo, pode-se justificar pela ação dos miofibroblastos,

que são células responsáveis pela contração da lesão. Essas células alinham-se e ligam-se às fibras de colágeno mais espessas, tracionando em direção a elas. Assim contribuem enormemente com o processo de cicatrização<sup>18,19</sup>.

Os resultados do número de fibroblastos confirmam dados de estudos que apontam que a estimulação elétrica melhora a regeneração de lesões, pois promove a migração celular, estimula fibroblastos e aumenta a síntese protéica<sup>17,20</sup>.

Não se observou diferença significativa com a aplicação isolada de insulina tópica, em todas as variáveis analisadas, porém sabe-se que a insulina estimula o crescimento e o desenvolvimento de diferentes tipos de célula<sup>21</sup>, sendo importante no processo de reepitelização, que envolve a proliferação, migração e diferenciação de queratinócitos a partir da margem da lesão<sup>22</sup>.

Utilizando insulina tópica com a mesma formulação e procedência da utilizada neste trabalho, Lima et al.<sup>23</sup> observaram aceleração da cicatrização de lesões cutâneas em ratos diabéticos. No entanto, neste trabalho não foram utilizados ratos diabéticos, e as lesões eram agudas, razão pela qual os resultados apresentaram-se diferentes. A distância entre as bordas da lesão no grupo tratado com insulina tópica não diferiu dos grupos controle e placebo, ficando evidente que os grupos tratados com estimulação elétrica foram os que apresentaram melhor fechamento da lesão.

Apikoglu-Rabus et al.<sup>21</sup> estudaram o efeito da aplicação tópica de insulina na reparação de lesões agudas em ratos diabéticos e não diabéticos e mostraram que em ambas as situações acelerou o processo de reparo. Em ratos não diabéticos, utilizados neste trabalho, não foi encontrado esse resultado, o que pode estar relacionado ao protocolo experimental, que foi diferente do adotado neste trabalho, pois a insulina foi aplicada duas vezes ao dia.

Corroborando com Sekhejane, Hourold e Abrahamse<sup>24</sup>, este trabalho mostra que a insulina tópica é benéfica no tratamento de lesões mesmo em condição não diabética, evidenciando seu papel na redução da reação inflamatória.

Este estudo abre perspectivas para futuras pesquisas, como a utilização da associação da estimulação elétrica de alta voltagem e insulina tópica em modelo experimental de animais diabéticos, que apresentam fatores de crescimento reduzidos, proliferação e migração celular<sup>25</sup>.

## CONCLUSÃO

A EEAV catódica acelerou o processo de reparação da lesão, não demonstrando efeito adicional com a aplicação da insulina tópica.

## REFERÊNCIAS

1. Liu Y, Petreaca M, Yao M, Martins-Green M. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *BMC Cell Biol.* 2009;10(1):1-15.
2. Yoon CS, Jung HS, Kwon MJ, Lee SH, Kim CW, Kim MK, et al. Sonoporation of the minicircle-VEGF165 for wound healing of diabetic mice. *Pharm Res.* 2009;26(4):794-801.
3. Peters EJ, Lavery LA, Armstrong DG, Fleichili JG. Electric stimulation as an adjunct to heal diabetic foot ulcers: a randomized clinical trial. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001;82(6):721-5.
4. Davini R, Nunes CV, Guirro ECO, Guirro RRJ. Tratamento de úlceras cutâneas crônicas por meio da estimulação elétrica de alta voltagem. *Rev Ciênc Méd. PUCCAMP.* 2005;14(3):249-58.
5. Tsai CH, Lin BJ, Chao PH.  $\alpha 2\beta 1$  integrin and RhoA mediates electric field-induced ligament fibroblast migration directionality. *J Orthop Res.* 2013;31(2):322-7.
6. Fitzgerald GK, Newsome D. Treatment of a large infected thoracic spine wound using high voltage pulsed monophasic current. *Physical Therapy.* 1993;73(6):355-6.
7. Griffin JW, Tooms RE, Mendius RA, Clifft JK, Zwaag RV, et al. Efficacy of high voltage pulsed current for healing of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Phys Ther.* 1991;71(6):442-4.
8. Houghton PE, Kinkaid CB, Lovell M, Campbell KE, Keast DH, Woodbury MG, et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. *Phys Ther.* 2003;83(1):17-28.
9. Davini R, Nunes CV, Guirro ECO, Guirro RRJ. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. *Rev Bras Fisioter.* 2005;9(3):249-56.
10. Hanam SR, Singleton CE, Rudek W. The effect of topical insulin on infected cutaneous ulcerations in diabetic and nondiabetic mice. *J Foot Surg.* 1983;22(4):298-301.
11. Pierre EJ, Barrow RE, Hawkins HK, Nguyen TT, Sakurai YMD, Desai M, et al. Effects of insulin on wound healing. *Trauma.* 1998;44(2):342-5.
12. Zhang XJ, Wu X, Wolf SE, Hawkins HK, Chinkes DL, Wolfe RR. Local insulin-zinc injection accelerates skin donor site wound healing. *J Surg Res.* 2007;142(1):90-6.
13. Madibally SV, Solomon V, Mitchell RN, Walter LV, Yarmush ML, Toner M. Influence of insulin therapy on burn wound healing in rats. *J Surg Res.* 2003;109(2):92-100.
14. Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguilá MB. Image analysis and quantitative morphology. In: Hewitson TD, Darby JA (Editors), *Histology protocols: methods in molecular biology.* New Jersey: Humana Press; 2010:211-25.

15. Nuccitelli R, Nuccitelli P, Ramlatchan S, Sanger R, Smith PJS. Imaging the electric field associated with mouse and human skin wounds. *Wound Rep Reg.* 2008;16(3):432-41.
16. Thomaz JB, Herdy CDC, Oliveira JCP, Souza SR, Robadey RA. Fundamentos da cicatrização das feridas. *Arq Bras Med.* 1996;70(2):65-72.
17. Kloth LC, McCulloch JM. Promotion of wound healing with electrical stimulation. *Activ Wound Care.* 1996;9(5):42-5.
18. Brown M, Gogia PP. Effects of high voltage stimulation on cutaneous wound healing in rabbits. *Phys Ther.* 1987;67(5):662-7.
19. Zhao M, Bai H, Wang E, Forrester JV, McCaig CD. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 3):397-405.
20. Isaac C, Ladeira PRS, Rego FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Rev Med.* 2010;89(3/4):125-31.
21. Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, Ehrlich HP. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts and myofibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 1998;102(1):124-31.
22. Li X, Kolega J. Effects of direct current electric fields on cell migration and actin filament distribution in bovine vascular endothelial cells. *J Vasc Res.* 2002;39(5):391-404.
23. Lima MH, Caricilli AM, Abreu LL, Araújo EP, Pelegrinelli FF, et al. Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *PLoS One.* 2012;7(5):e36974.
24. Sekhejane PR, Houreld NN, Abrahamse H. Irradiation at 636 nm positively affects diabetic wounded and hypoxic cells in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(8):521-30.
25. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1219-22.