

ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DO EFEITO DE FILMES BIOATIVOS
DE COLÁGENO TIPO I BOVINO RECONSTITUÍDO SOBRE O PROCESSO
DE REPARO CICATRICAL DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU EM
RATOS.

Histomorphological study of the effect of bioactive films of reconstituted
bovine type I collagen upon third degree burn healing process in rats

Ricardo Almeida Santana ¹

Breno Ferreira Barbosa ²

Juliana Cardoso Cordeiro ³

Enrik Barbosa de Almeida ⁴

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior ⁵

(1) Graduando do Curso de Odontologia da Universidade Tiradentes; estagiário do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Aracaju/SE).

(2) Graduando do Curso de Odontologia da Universidade Tiradentes; bolsista de iniciação científica PROBIC/UNIT; estagiário do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Aracaju/SE).

(3) Professora Titular I do Curso de Farmácia da Universidade Tiradentes; professora permanente do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente (UNIT/SE) e pesquisadora colaboradora do Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Aracaju/SE).

(4) Professor Assistente III do Curso de Farmácia da Universidade Tiradentes (UNIT/SE).

(5) Professor Titular III do Curso de Odontologia da Universidade Tiradentes; professor permanente do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente (UNIT/SE) e pesquisador colaborador do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Aracaju/SE).

Correspondência:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Av. Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP, Farolândia, Aracaju/SE. CEP 49032-490.

Fone: (79) 3218 2115 (ramal 2615) / Fax: (79) 3218 2190

E-mail: ricardo_luiz@unit.br

RESUMO

O colágeno tipo I bovino reconstituído tem sido amplamente utilizado como biomaterial de ocorrência natural, no âmbito da saúde, em uma vasta gama de aplicações clínicas, posto que apresenta características físico-químicas e estruturais desejáveis, além de excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade e imunogenicidade. Considerando ser o colágeno tipo I o principal componente do tecido conjuntivo fibroso cicatricial, este trabalho objetivou analisar histomorfologicamente o efeito do tratamento com biofilmes de colágeno tipo I bovino reconstituído sobre a cicatrização de queimaduras em ratos. Para tanto, foram desenvolvidos biofilmes de colágeno I obtido a partir de tendão bovino, que foram posteriormente aplicados sobre queimaduras (terceiro grau) previamente confeccionadas em dorso de 20 ratos. Os animais foram sacrificados após 14 (grupo controle C14 experimental M14) e 21 dias (grupo controle C21 experimental M21) e a área de cicatrização foi removida e analisada em microscopia óptica e de luz polarizada. A intensidade da reação inflamatória mostrou-se substancialmente reduzida em M21 quando comparado ao C21, enquanto o índice de epitelização apresentou-se mais significativo em M14 que em C14 ($p=0,026$). O quantitativo médio de vasos sanguíneos e o perímetro vascular médio foram estatisticamente maior e menor, respectivamente, em M21 que em C21 ($p=0,00030$ e $0,00035$). A fibroplasia, por sua vez, foi substancialmente mais intensa nos grupos experimentais que nos grupos controle, em ambos os tempos, sendo que o grupo M21 exibiu a maior densidade e melhor disposição estrutural-organizacional dos feixes fibrosos. Concluiu-se que a aplicação de biofilmes de colágeno tipo I bovino reconstituído beneficiou o processo de cicatrização de queimaduras em ratos.

PALAVRAS-CHAVE: cicatrização, colágeno, membrana.

ABSTRACT

Reconstituted bovine type I collagen has been successfully employed as natural biomaterial on health, in a variety of clinical conditions, once it presents some desirable physic-chemical and structural properties, as well as excellent biocompatibility and low toxicity and immunogenicity. Since collagen is the main component of the healing fibrous connective tissue, this research aimed at analyzing histomorphologically the effect of treatment using reconstituted bovine type I collagen biofilms upon burn healing in rats. Thus, we have developed biofilms of type I collagen obtained from bovine tendon, which were subsequently laid on burning wounds previously performed in the back of 20 male rats. The animals were killed after 14 (control C14 and experimental M14 groups) and 21 days (control C21 and experimental M21 groups), and the healing area was removed and analyzed by light and polarized microscopy. The intensity of the inflammatory reaction showed to be substantially reduced in M21 when compared to C21, whereas the epithelization index was more significant in M14 than in C14 ($p=0.026$). The average number of blood vessels and vascular perimeter were, respectively, higher and lower in M21 than in C21 ($p=0.00030$ e 0.00035). On the other hands, fibroplasia was particularly more intense in both experimental groups than in control ones, at both 14th and 21h days, whereas the group M21 had exhibited the highest density and best organizational-structural arrangement. It has been concluded that the use of reconstituted bovine type I collagen improved the burn healing process in rats.

KEY WORDS: burn healing, collagen, membrane.

1 INTRODUÇÃO

Considerado o maior órgão do corpo humano, a pele envolve o corpo determinando seu limite com o meio externo. Corresponde a 16% do peso corporal e exerce diferentes funções, como regulação térmica, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo, proteção contra diversos agentes do meio ambiente e funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato). É formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, da mais externa para a mais profunda, respectivamente. A pele é um órgão vital e, sem ela, a sobrevivência seria impossível .

Entre as maiores causas de danificação cutânea se encontram as queimaduras, ocupando o segundo lugar entre os acidentes que mais comumente ocorrem no mundo (YONG e KHOR, 2001). As queimaduras são lesões freqüentes em nosso meio. Embora a maior parte delas seja decorrente de pequenos acidentes domésticos, um número considerável de pacientes apresenta lesões de tal gravidade que põem em risco sua vida.

As queimaduras são um problema de saúde, significativo no mundo. Contudo, até hoje, existem poucos dados disponíveis para orientar programas de tratamento e prevenção (ROSSI et al. 1998). Embora o que chame mais a atenção sejam as lesões do revestimento cutâneo, elas não podem ser consideradas como simples afecções locais, devendo, desta forma, ser consideradas como afecções gerais, uma vez que as alterações dela resultantes atingem indistintamente a todos os setores do organismo (RUSSO et al. 1994).

Há diversas maneiras e produtos disponíveis para tratamento de feridas provocadas por queimaduras tais como, agentes tópicos, soluções, enxertos, curativos interativos e bioativos. Na escolha do tratamento, deve-se considerar não só a profundidade da lesão, mas também a sua fase evolutiva (FERREIRA et al. 2003).

Nesta perspectiva, membranas de colágeno têm sido um dos materiais mais utilizados para reparar danos ou traumas químico-mecânicos, devido a

sua biocompatibilidade e sua capacidade para promover a cicatrização de feridas (BERNALES et al. 2004). O fato de ser absorvível, credita ao colágeno uma grande vantagem especialmente nas áreas da implantodontia, periodontia e cirurgias odontológicas, já que não necessita de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, evitando complicações pós-operatórias e desconforto ao paciente (YAMATOGLI et al. 2005).

As tentativas do homem de intervir no processo de reparação tecidual remontam à antiguidade, quando foi reconhecida a importância de protegê-las a fim de evitar complicações ao paciente. Assim, muitos estudos vêm sendo realizado com intuito de buscar condutas e maneiras que acelerem o processo de reparo cicatricial (NASCIMENTO, 2001; BLANES 2004).

É neste contexto e com a preocupação de colaborar com a ciência humana, que propusemos neste trabalho avaliar os efeitos de filmes bioativos de colágeno bovino sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção de queimaduras de terceiro grau no dorso de ratos, por meio de estudo histomorfológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Queimaduras são lesões da pele, provocadas por agentes físicos (temperatura, eletricidade, radiação), químicos (produtos químicos) e biológicos (animais e vegetais) (PAIVA, 2001).

A pele é um órgão protetor e impermeável à água, que isola os componentes internos dos componentes do meio externo, representando, portanto, uma barreira natural do organismo. Quando esta barreira se encontra destruída total ou parcialmente em decorrência de traumas, como as queimaduras, ocorrem uma alteração da homeostase humana, comprometendo assim, a sobrevivência do indivíduo. Assim, as queimaduras são lesões que atingem a pele de forma brusca e sua gravidade irá variar de acordo com a profundidade e extensão (SMELTZER e BARE, 1993).

Dependendo da profundidade da lesão, a queimadura é comumente classificada em primeiro grau (atinge somente a epiderme), segundo grau (envolve toda a epiderme e parte da derme) e terceiro grau (atinge todos elementos da pele, podendo envolver planos anatômicos profundos) (DINO et al., 2001).

Histologicamente a ferida por queimadura é caracterizada principalmente pela necrose por coagulação com formação de três zonas distintas, denominadas zonas de Jackson (DEMLING et al., 1993).

A primeira delas é a zona de “coagulação”, com uma coagulação vascular irreversível e nenhum fluxo sangüíneo capilar. A profundidade desta zona mais gravemente lesada é determinada pela temperatura e a duração da exposição. Em torno desta encontra-se uma zona de estase, caracterizada por um lento fluxo sangüíneo capilar que embora lesado não foi coagulado e dependendo do tratamento realizado pode haver a recuperação do tecido com reepitelização ou a morte celular com aprofundamento da queimadura. A terceira zona é aquela de “hiperemia”, que é a resposta inflamatória habitual dos tecidos sadios a lesões não-letais (MONDRAGON et al., 1999).

Esse tipo de lesão tem como base a destruição da integridade capilar e vascular, decorrente, após o trauma, da liberação de mediadores químicos como a histamina liberada pelos mastócitos, funcionando como um potente vasodilatador de arteríolas, possibilitando o vazamento de líquidos e proteínas plasmáticas, daí o aumento progressivo do edema local, além de poder provocar alterações em todo o organismo (RUSSO et al., 1994). Após esse período, existindo normalização da maioria dos capilares alterados, ocorre o retorno dos líquidos aos vasos (MONDRAGON et al., 1999).

Em decorrência da perda local de líquidos, surge uma redução do volume circulante e hemoconcentração, que, com certa freqüência, são acompanhadas da aglutinação de hemácias nos pequenos vasos, levando a uma diminuição do retorno do sangue ao coração. A redução do débito cardíaco que então se verifica, ocasiona deficiência circulatória generalizada com insuficiente oxigenação dos vários setores do organismo, que em seu grau mais avançado, é caracterizado pelo estado de choque. Há ainda, um intenso

desequilíbrio hidroeletrolítico, caracterizado fundamentalmente por hiponatremia e hipercalemia, com aumento da concentração de sódio e cloro e redução do potássio ao nível da pele queimada. O hipermetabolismo catabólico com balanço nitrogenado negativo é característico no queimado, em face de sua intensidade (ARGUIJO et al., 1999).

Estatísticas comprovam que a maior parte dos acidentes por queimaduras ocorrem no âmbito domiciliar, atingindo principalmente as crianças, sendo os líquidos ferventes e inflamáveis, os maiores agentes causadores (ROSSI et al., 1998). O índice de sobrevivência de um paciente acometido por uma queimadura extensa mostra-se elevada, se comparada com décadas passadas, devido aos avanços no tratamento clínico e cirúrgico (GRAGNANI et al., 2005).

Além das modificações físicas e emocionais, a experiência vivida numa queimadura altera profundamente a relação interpessoal e a convivência com o mundo social, em função da ansiedade e de medos que são projetados pelos pacientes e familiares, em relação ao fato da alteração ou não da capacidade produtiva. Logo o apoio da família, durante o período de internação, é muito importante e contribui pra o sucesso da reabilitação (CARLUCCI et al., 2007).

Atualmente a mortalidade quando ocorre, é tardia e relacionado por fatores sistêmicos, principalmente associado à septicemia (ARGUIJO et al., 1999). Gragnani et al. (2005) explica que o tecido queimado é um potente meio de cultura para o crescimento de variadas bactérias devido à disponibilidade de nutrientes, ao ambiente úmido e à temperatura, e se não for realizado nenhuma conduta terapêutica, pode causar septicemia e conseqüentemente eleva o risco de morte.

Curativos têm sido desenvolvidos para aplicação nesta área e vêm-se confirmando como excelente barreira contra infecções, favorecendo desta forma a cicatrização da ferida e reabilitação do enfermo (NICOLOSI e MORAES, 2005).

2.1 Cicatrização da ferida por queimadura

A cura de uma lesão térmica se processa em quatro fases principais:

- eliminação dos tecidos desvitalizados;
- regeneração do tecido vascular e conjuntivo;
- epitelização;
- retração

A eliminação dos tecidos desvitalizados apresenta maior importância nas lesões térmicas profundas. Há acúmulo local de substâncias enzimáticas oriundas dos glóbulos brancos que, aos poucos, vão promovendo a lise das fibras colágenas. Para o local da lesão há migração de grande quantidade de leucócitos, fibroblastos, macrófagos, acompanhados de brotos vasculares neoformados a partir da rede vascular íntegra (DIEGELMANN e EVANS 2004).

À medida que os processos enzimáticos se intensificam, os processos de regeneração vascular e conjuntivo se ativam, formando um tecido rico em elementos vasculares e celulares (tecido de granulação), que aos poucos vai se alastrando, preenchendo o vazio resultante dos tecidos eliminados. À medida que se formam novas camadas de tecido de granulação, as mais antigas, profundamente situadas, vão perdendo sua riqueza em vasos, e os fibroblastos e feixes de colágeno passam a predominar (BALBINO et al. 2005).

O processo de epitelização começa quando as células da margem da ferida perdem a inibição de contato e começam a migrar para a área lesada. A migração procede, as células das camadas basais iniciam sua proliferação para providenciar células epiteliais adicionais. (STENN 1981, DIEGELMANN et al. 2004).

Por outro lado, o epitélio não pode emigrar se não houver tecido mesenquimal para recebê-lo. Quando a epitelização for demorada, devido à extensão das lesões ou pela presença de infecção, o tecido de granulação vai sofrendo um processo de maturação, o qual produz retração e aproximação das bordas da lesão (ROCHA 2004).

Ao fim da cobertura epitelial, o organismo promove a absorção do excesso de colágeno mais antigo, substituindo-o por outro mais recente e menos retrátil. Esse processo denominado “remodelação” garante alguma flexibilidade à cicatriz (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

2.2 Colágeno

O colágeno representa cerca de 30% da proteína existente no organismo de vertebrados e está presente em tecidos que possuem função mecânica (NIMNI et al., 1987; FORTI et al., 2006). Juntamente com sais de cálcio é responsável pela estrutura rígida dos ossos. Em combinação com outra proteína (a elastina) forma estruturas mais flexíveis, as quais são essenciais por exemplo para a aorta e os pulmões. Também é encontrado nos dentes e em cartilagens. (HO et al., 1997; FRIESS, 1998; VERAART et al., 1998; LEE et al., 2001;).

Esta proteína compreende uma família de moléculas geneticamente distintas, as quais possuem uma única configuração tripla hélice de três subunidades polipeptídicas conhecidas como cadeias α (HO et al., 1997; FRIESS, 1998; VERAART et al., 1998; LEE et al., 2001). No mínimo 19 tipos de colágenos já foram isolados e caracterizados quanto ao comprimento da hélice e à natureza e tamanho das porções não-helicoidais (HO et al., 1997; FRIESS, 1998; VERAART et al., 1998; LEE et al., 2001).

O colágeno tipo I é encontrado predominante em animais de grande porte, especialmente na pele, tendões e ossos onde forças extremas são transmitidas (FRIESS, 1998). As demais moléculas de colágeno podem ser encontradas por exemplo em cartilagens e humor vítreo (tipo II), vasos sanguíneos e trato gastrointestinal (tipo III) e membrana basal (tipo IV) (VIEIRA, 1997).

O resíduo de hidroxiprolina representa de 10-14% na composição de aminoácidos no colágeno e oferece meios para quantificar a molécula ou seus produtos de degradação na presença de outras proteínas. Outro aminoácido não usual presente nesta proteína é a hidroxilisina, a qual é formada a partir da lisina no retículo endoplasmático pela lisil hidroxilase. A formação de resíduos de hidroxilisil permite o ataque de açúcares, um requisito indispensável para a

molécula de colágeno formar a estrutura tripla hélice. “In vivo” as moléculas de colágeno tipo I estão dispostas em fibras ligadas por dois tipos de reticulações covalentes: intramoleculares e intermoleculares. As reticulações intermoleculares são essenciais para a estabilidade da fibra e responsáveis por várias propriedades físico-químicas da mesma (HO et al., 1997).

O colágeno tipo I é uma glicoproteína com menos de 1% em carboidratos. Os componentes de açúcar são unidades de galactose ou dissacarídeos de galactose e glicose (FRIESS, 1998). Em geral, o telopeptídeo do colágeno tipo I é o provável causador da resposta imunogênica quando este é introduzido em hospedeiros xenogênicos. Para eliminar este problema, o material colagenoso deve ser tratado com pepsina para remover os telopeptídeos. O colágeno pobre em telopeptídeo é uma mistura de moléculas monoméricas e oligoméricas (HO et al., 1997). Esta proteína pode ser utilizada como biomaterial pela sua excelente biocompatibilidade, devido suas características de baixa toxicidade e imunogenicidade (MEADE e SILVER, 1990; FRIESS e LEE, 1996; HO et al., 1997; LEE et al., 2001). Outra vantagem dela como biomaterial é que este polímero possui estrutura, propriedades físicas, químicas e imunológicas bem elucidadas. Também pode ser rapidamente isolado e purificado em grandes quantidades (HO et al., 1997).

Este biomaterial pode ser processado em inúmeras formas tais como, tubos, folhas, esponjas, pós, soluções injetáveis e dispersões (SRIVASTAVA et al., 1990). Nestas formas acima citadas podem formar sistemas de liberação de fármacos.

Entretanto, algumas desvantagens têm sido reportadas por alguns pesquisadores, tais como, dificuldade de garantir fornecimento adequado do material e pobre força mecânica. Essas desvantagens podem ser contornadas melhorando as propriedades físicas e químicas da molécula. Como estratégia de melhora para garantir o uso do colágeno na liberação de fármacos é comum utilizar sistemas com outras proteínas, tais como, elastina, fibronectina ou glicosaminoglicanas. A combinação de colágeno com outros sistemas ou substâncias, tais como, colágeno/lipossoma e colágeno/silicone tem sido proposta para conseguir a estabilidade do perfil de liberação dos compostos incorporados no sistema (LEE et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste projeto foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal de acordo com a COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), tendo assim recebido a aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UNIT/ Aracaju/SE. O estudo foi realizado no Biotério da Universidade Tiradentes (UNIT/SE) e no Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP/SE).

3.1 Extração do colágeno tipo I

O colágeno foi obtido de tendão bovino através de tratamento com NaCl, ácido acético 0,5mol/L e pepsina, segundo método descrito por Cardoso, 2005. O tendão bovino foi colocado em acetona e posteriormente foi lavado com água destilada. Este material foi mantido em uma solução de NaCl 10% (m/v) a 4°C por 24 horas. Após esse período, o tendão foi lavado novamente com água destilada e mantido em tampão citrato 0,02mol/L em pH 4,3 por 48 horas. A homogeneização do tendão foi feita em 500 mL de ácido acético 0,5 mol/L, onde formará um gel do polímero. O material geleificado foi submetido a tratamento com pepsina por 24 horas e depois foi dialisado contra uma solução tampão fosfato 0,02mol/L durante 2 dias, sendo as trocas da solução tampão realizadas periodicamente. O material foi liofilizado e acondicionado sob refrigeração até o momento do uso.

3.2 Obtenção do filme bioativo (biofilme) de colágeno

O colágeno liofilizado foi redisperso em ácido acético 0,5mol/L. A concentração de polímero a ser utilizada foi definida através de testes preliminares, a fim de obter filmes mecanicamente viáveis. A inclusão de plastificantes também foi testada nesta etapa do desenvolvimento para evitar filmes quebradiços. Foram testadas concentrações de polímero igual a 2, 3 e 4%.

Os filmes foram obtidos através de “Casting process” que consiste em verter a dispersão aquosa do polímero (contendo o plastificante) em suportes de polietileno. Estes suportes foram colocados em estufa à 40 °C e o solvente foi evaporado (figura 1a e 1b). Após esta etapa, os filmes foram retirados do suporte, cortados na dimensão de 2x2 cm e acondicionados em embalagem apropriada para esterilização. A esterilização foi efetuada por radiação γ .

3.3 Ensaio Biológico

Um total de 20 ratos machos Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com massa corporal aproximadamente 250 ± 50 g foram divididos em 2 grupos (animais tratados com filmes bioativos de colágeno, e animais controle sem tratamento). Os animais foram mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h e receberão água *ad libitum* e dieta padrão Labina®(Purina, São Paulo, Brasil). Após atingir o peso supracitado, os animais foram submetidos a procedimento de indução de queimaduras de terceiro grau na sala de experimentação animal do Biotério da UNIT/SE.

3.3.1 Indução da Queimadura

Inicialmente, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de Quetamina (Ketalar), na posologia de 0,10 ml/100g, e Xylazina (Virbaxil), diluída em soro na proporção de 1:9 e administrada na posologia de 0,25ml/100mg. Após anestesia foi realizada tricotomia manual na região média do dorso e anti-sepsia com solução de Clorexidina a 2%. Um instrumental previamente confeccionado foi modificado, com ponta ativa chata e plana em bronze, apresentando a dimensão de 1,0 cm²(figura 1c).O aquecimento se deu pela chama azul do fogo do maçarico em contato direto com o bronze por um período de 40 segundos até que este atingisse o rubro; neste momento o instrumental foi encostado no dorso do animal permanecendo por 40 segundos queimando a pele (MEIRELLES, 2005) (figura 1d). Deve-se ressaltar que a queimadura realizada foi de terceiro grau, logo as terminações

nervosas referentes a esta área da úlcera formada foram danificadas, logo os animais não sentiriam dor, não havendo dessa forma a necessidade de administração de medicação sistêmica a base de analgésicos (MENEZES e SILVA, 1988) (figura 1e).

3.3.2 Ensaio cirúrgico e aplicação de biomaterial

Os 20 animais foram separados em 4 grupos, obedecendo à seguinte ordenação:

- Grupo C14: animais sem tratamento (controle) sacrificados 14 dias após os procedimentos cirúrgicos.
- Grupo M14: animais tratados com biofilme) sacrificados 14 dias após os procedimentos cirúrgicos.
- Grupo C21: animais sem tratamento (controle) sacrificados 21 dias após os procedimentos cirúrgicos.
- Grupo M21: animais tratados com biofilme) sacrificados 21 dias após os procedimentos cirúrgicos.

É importante salientar que o filme bioativo recobriu toda extensão da queimadura (extensão de 2cm²) (figura 1f). Para o procedimento de colocação deste biofilme a área lesada foi inicialmente lavada com soro fisiológico e, em seguida, as membranas de colágeno foram aplicadas delicadamente sobre a lesão; para a obtenção da aderência, um chumaço de algodão seco foi passado, não tendo sido realizando nenhum procedimento de bandagem.

Os animais foram sacrificados por meio de nova administração de anestésico em quantidade três vezes maior que aquela utilizada para anestesia, e depois de constatada a morte do animal através da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea, foi realizada a remoção dos espécimes equivalentes a área cicatricial. Para tal, foi utilizado lâmina de bisturi número #15, montado em cabo Bad Parker. Em seguida, a ferida foi excisada de forma elíptica, com margem de tecido ao redor da queimadura de 0,5cm, e esta foi acondicionada em frasco plástico contendo formol a 10% (tampão fosfato, pH

7,4) por um período igual a 24 horas. Posteriormente, estes foram hemiesecionados, desidratados em soluções crescentes de etanol a 70, 95 e 100° GL, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (técnica histológica convencional). Secções histológicas de 5µm foram obtidas a partir das amostras emblocadas em parafina e posteriormente submetidas à coloração Hematoxilina/Eosina (HE) para avaliação das características do processo inflamação-reparo, e aos métodos do histoquímico Tricrômico Masson e Picrosúrius, para análise do grau de deposição colagênica (fibroplasia).

3.4 Método de Avaliação Histomorfológica

3.4.1 Análise histomorfológica da reação inflamatória

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os seguintes critérios:

- Intensidade e tipo do infiltrado inflamatório
- Tipagem (categorização) do processo inflamatório

A intensidade do processo inflamatório foi observada e determinada de acordo com os seguintes critérios:

- +1 – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica.
- +2 – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem entre 10% a 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica.
- +3 – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem mais de 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica

A tipagem da reação inflamatória foi determinada considerando-se a análise quantitativa das diferentes células inflamatórias individualmente, a saber: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, identificadas pela sua morfologia específica. Desta forma, esta análise obedecerá aos seguintes critérios:

- +1 – quando o fenótipo celular estudado corresponder a menos de 10% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica.
- +2 – quando o fenótipo celular estudado corresponder a mais de 10 e menos de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica.
- +3 – quando o fenótipo celular estudado corresponder a mais de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica.

Após a semi-quantificação, a reação inflamatória foi categorizada de acordo com o(s) fenótipo(s) inflamatório(s) predominante(s) em:

- Inflamação aguda – quando predominarem leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e/ou eosinófilos).
- Inflamação subaguda – quando leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) estiverem presentes em quantidade semelhante.
- Inflamação crônica inespecífica – quando predominarem linfócitos e/ou plasmócitos.
- Inflamação crônica específica (granulomatosa) – quando predominarem macrófagos e/ou gigantócitos (células gigantes multinucleadas).

3.4.2 Determinação do índice percentual de epitelização da superfície da queimadura

O índice de reepitelização da superfície da úlcera por queimadura (área lesionada) foi avaliado observando-se a formação de epitélio pavimentoso estratificado na região correspondente a superfície da ferida cirúrgica.

Para obtenção deste índice, foram selecionadas 04 imagens previamente fotomicrografadas de cada secção histológica. Estas foram processadas em um software específico para morfometria Image Tool[®], onde foi determinado o número de pixels correspondente a área de extensão ocupada pela faixa de epitelização na superfície da ferida e a extensão total da superfície da ferida. Posteriormente foi determinado o percentual de epitelização (E_p) em cada caso, calculando-se a razão entre a extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado (E_{ex}) e a extensão total da úlcera por queimadura (Q_{ex}), multiplicado por 100, de acordo com a seguinte fórmula:

$$E_p = (E_{ex} / Q_{ex}) \times 100, \text{ onde:}$$

E_p – Percentual de epitelização

E_{ex} – extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado

Q_{ex} – extensão total da úlcera por queimadura

3.4.2 Análise do comportamento da microvasculatura

Para avaliação do comportamento vascular serão analisadas duas variáveis: número médio de vasos por campo histológico e perímetro vascular médio. Para operacionalização deste estudo, será procedida a aquisição de imagens referentes a cada caso estudado. Assim, para cada caso serão confeccionadas 5 secções histológicas seriadas de 5 μ m de espessura, separadas entre si por uma distância de 10 μ m; em cada lâmina serão fotomicrografados 10 campos histológicos (ampliação de 400x) selecionados

por casualização sistemática. Desta forma, os campos serão selecionados da esquerda para direita e de cima para baixo; para cada campo selecionado seguir-se-ão dois campos desprezados, até que se atinja o total de 20 campos. As imagens fotomicrografadas serão digitalizadas por meio de software de captura de imagens Olympus 2000[®].

Após digitalização, as imagens referentes a cada campo histológico serão projetadas em monitor Samsung[®] de 14", com sobreposição de um retículo contendo 100 pontos testes em quadrículas (totalizando 1000 pontos contados em cada lâmina analisada). Este recurso facilitará a seleção das estruturas a serem mensuradas na análise morfométrica das variáveis dependentes, além de impedir sua recontagem.

O número médio de vasos sanguíneos será determinado pela contagem de vasos capilares seccionados transversalmente em cada campo histológico. A média será obtida por meio da razão entre o somatório de vasos contados e o quantitativo de campos analisados.

Para determinação do perímetro vascular médio será utilizado o software *Image Tool*[®]. Assim, as imagens dos campos histológicos capturados previamente será processada no software, e o perímetro de cada vaso capilar seccionado transversalmente em cada campo histológico será determinado. O perímetro médio será definido por meio da razão entre o somatório de todos os perímetros obtidos e o quantitativo de vasos analisados. Serão considerados apenas os vasos sanguíneos com diâmetro superior a 20 micrômetros, conforme recomendado por Prado et al (2000).

3.43. Análise da fibroplasia

Os cortes foram submetidos ao método histoquímico do Picrossírius para análise descritiva da deposição de colágeno. Para tanto, a deposição de fibras colágenas (fibroplasia) coradas, destacadas por sua birrefringência ao exame com microscópio de luz polarizada, foram categorizadas de acordo com sua disposição e aparência em:

- +1 – quando predominarem fibras colágenas exibindo disposição entrelaçada e aparência delgada e delicada em toda extensão da área lesada.
- +2 – quando predominarem fibras colágenas exibindo disposição entrelaçada e aparência delgada e delicada na superfície e centro da área lesada, mas espessa e grosseira na profundidade e margens.
- +3 – quando predominarem fibras colágenas exibindo disposição entrelaçada e/ou paralela e aparência espessa e grosseira em toda a área lesada.

3.5 Análise Estatística

Os dados obtidos a partir da análise da determinação da intensidade da reação inflamatória e deposição de fibras colágenas foram comparados entre os grupos experimentais e controles (14 e 21 dias) de maneira puramente descritiva.

Para análise da existência ou não de diferenças estatisticamente significativas no índice percentual de epitelização, número médio de vasos neoformados e perímetro vascular médio, as médias de cada grupo experimental e controle, tanto de 14 como de 21 dias, foram submetidos ao teste F, para determinar a existência de variâncias semelhantes ou distintas entre os grupos, e posteriormente o teste T de *student*, para indicar se existia ou não diferença estatisticamente significativa entre as médias.

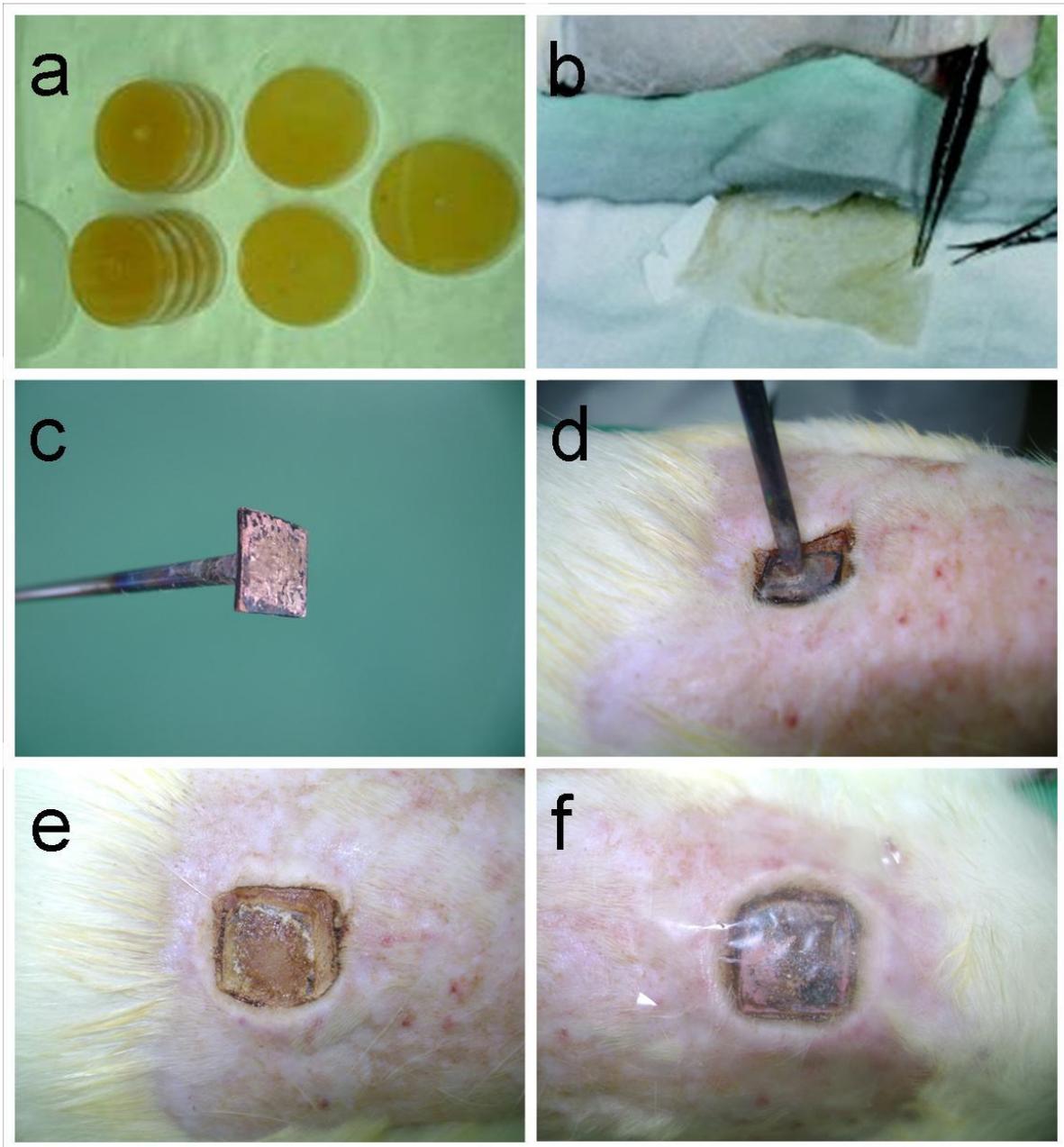


Figura 1. Etapas dos procedimentos metodológicos. (a) Placas de petri contendo material colagenoso para confecção de membranas. (b) Manuseio da membrana estéril durante ato cirúrgico. (c) Instrumento confeccionado para indução da queimadura e (d) procedimento de indução da queimadura. (e) área de necrose coagulativa no dorso do animal após a produção da queimadura de terceiro grau e (f) área de necrose já recoberta pela membrana.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Morfológica do Infiltrado Inflamatório

Ao décimo quarto dia, nos animais que compunham o grupo controle (C14), a área cicatricial da ferida cirúrgica estava representada por um tecido conjuntivo fibroso frouxo, sede de intenso infiltrado inflamatório (padrão +3 em todos os espécimes), exibindo um fenótipo misto entre linfócitos e plasmócitos; entretanto o padrão de distribuição das células inflamatórias era bem definido, concentrando-se na superfície da ferida os neutrófilos e na profundidade do espécime especialmente plasmócitos. Os linfócitos de forma geral representam, em todos os espécimes desse grupo, mais de 50% da população celular, sendo observados mais na profundidade da ferida (figura 2a). A reação inflamatória do grupo C14 foi, portanto, categorizada como do tipo crônica inespecífica (Tabela 1).

Tabela1: Distribuição dos escores relativos a análise morfológica semiquantitativa da reação inflamatória nos animais pertencentes ao grupo controle sacrificado ao décimo quarto dia após a experimentação cirúrgica.

| INFLAMAÇÃO | 1(R1) | 2(R4) | 3(R6) | 4(R7) | 5(R10) | |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----|
| Intensidade da inflamação | +3 | +3 | +3 | +3 | +3 | |
| Células | Neutrófilos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | Eosinófilos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | Linfócitos | +3 | +3 | +3 | +3 | +3 |
| | Plasmócitos | +2 | +3 | +2 | +2 | +3 |
| | Macrófagos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | Gigantócitos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

Com relação ao grupo tratado com membrana (M14), observou-se, ao décimo quarto dia, a presença de tecido conjuntivo fibroso frouxo sede de intenso infiltrado inflamatório (padrão +3 nos 5 casos). De maneira geral, a intensidade das células linfoplasmocitárias permaneceu semelhante ao grupo controle (aproximadamente 50%) (figura 2b). A reação inflamatória foi caracterizada como crônica inespecífica (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos escores relativos a análise morfológica semiquantitativa da reação inflamatória nos animais pertencentes ao grupo membrana sacrificado ao décimo quarto dia após a experimentação cirúrgica.

| INFLAMAÇÃO | 1(R1) | 2(R2) | 3(R3) | 4(R4) | 5(R6) |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Intensidade da inflamação | +3 | +3 | +3 | +3 | +3 |
| Neutrófilos | +1 | +2 | +1 | +1 | +1 |
| Eosinófilos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| Células Linfócitos | +3 | +3 | +3 | +3 | +3 |
| Plasmócitos | +3 | +2 | +2 | +3 | +3 |
| Macrófagos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| Gigantócitos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

Ao vigésimo primeiro dia, as secções histológicas das amostras obtidas do grupo controle (C21) revelaram tecido conjuntivo fibroso ainda sede de intenso infiltrado inflamatório. No entanto, o padrão de infiltração mostrou-se predominantemente plasmocitário (figura 2c). A inflamação foi caracterizada como uma inflamação crônica inespecífica (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos escores relativos à análise morfológica semiquantitativa da reação inflamatória nos animais pertencentes ao grupo controle sacrificados ao vigésimo primeiro dia após a experimentação cirúrgica.

| INFLAMAÇÃO | 1(R2) | 2(R3) | 3(R5) | 4(R8) | 5(R9) |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Intensidade da inflamação | +2 | +3 | +3 | +3 | +2 |
| Neutrófilos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| Eosinófilos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| Células Linfócitos | +3 | +3 | +3 | +3 | +3 |
| Plasmócitos | +3 | +3 | +3 | +3 | +2 |
| Macrófagos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| Gigantócitos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

Por sua vez, as secções histológicas do grupo tratado com membrana (M21) revelaram, ao vigésimo primeiro dia a presença de tecido conjuntivo exibindo uma significativa redução no infiltrado inflamatório, variando de intensidade moderada a escassa. As populações de linfócitos e plasmócitos diminuíram sensivelmente, comparado com os demais grupos (figura 2d). A reação inflamatória foi categorizada como crônica inespecífica (Tabela 4). É importante salientar que no animal 5, há uma variância muito distante dos

demais animais do mesmo grupo, mas a provável explicação para tal é que este pode ter sido acometido por uma grave infecção, pois na região da queimadura apresentava um edema severo. Salienta-se que os neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e gigantócitos apresentaram-se de forma escassa, seguindo na sua totalidade um padrão +1 em todos os espécimes.

Tabela 4: Distribuição dos escores relativos à análise morfológica semiquantitativa da reação inflamatória nos animais pertencentes ao grupo membrana sacrificado ao vigésimo primeiro dia após experimentação cirúrgica.

| INFLAMAÇÃO | | 1(R5) | 2(R3) | 3(R8) | 4(R9) | 5(R10) |
|----------------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Intensidade da inflamação | | +1 | +2 | +1 | +1 | +3 |
| Células | Neutrófilos | +1 | +1 | +1 | +1 | +3 |
| | Eosinófilos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | Linfócitos | +2 | +3 | +3 | +3 | +2 |
| | Plasmócitos | +1 | +2 | +2 | +2 | +2 |
| | Macrófagos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | Gigantócitos | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

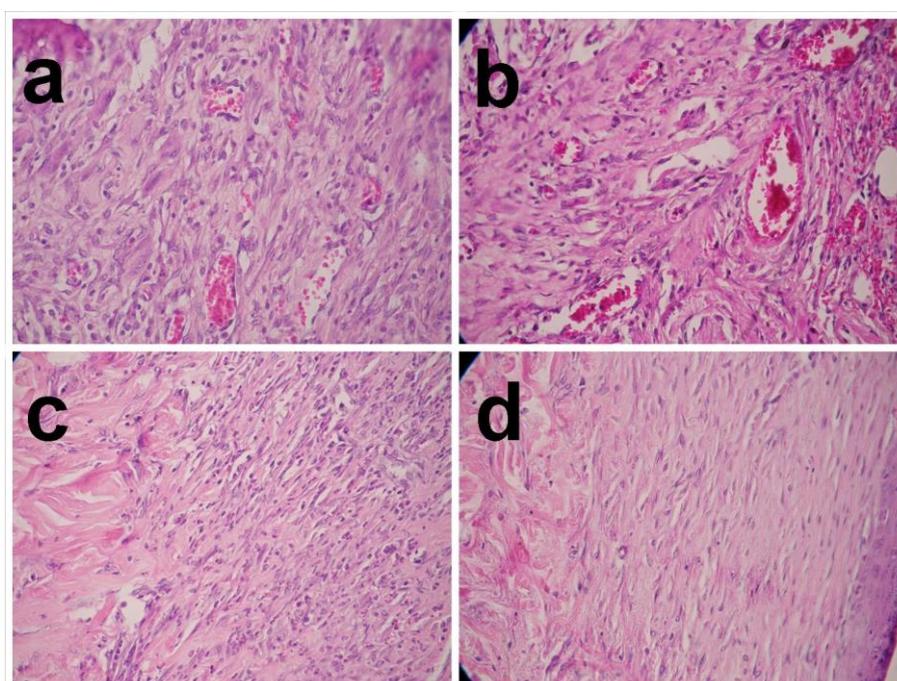


Figura 2.. Fotomicrografias do padrão de infiltração inflamatória nos grupos de trabalho. Observa-se reação de granulação exuberante nos grupos controle (a) e experimental (b) sacrificados ao décimo quarto dia. O grupo controle sacrificado ao vigésimo primeiro dia exibe persistência de infiltração linfoplasmocitária (c), enquanto que esta é escassa no grupo experimental (d). (HE, 100x).

4.2 Determinação do índice percentual de epitelação da Superfície da queimadura

A análise morfométrica da extensão percentual de epitelação nos grupos de trabalho (gráfico 1) revelou que, entre os animais sacrificados ao décimo quarto dia, aqueles que compunham o grupo experimental (M14) exibiram, em média, 50,37% da superfície da ferida já epitelizada (figura 3), contra apenas 23,86% observado no grupo controle (C14) (figura 4). Essa diferença mostrou ser estatisticamente significativa ($p=0,026$). Quando avaliados os animais sacrificados ao vigésimo primeiro dia, verificou-se uma média de 97,01% de epitelação superficial para os animais do grupo experimental (M21) (figura 5), em contraste aos 61,88% observados no grupo controle (C14) (figura 6). Apesar da disparidade entre as médias, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=7,31$). Não se pode deixar de comentar, contudo, que em dois casos do grupo M21 observou-se epitelação completa da superfície da ferida, fato não observado no grupo controle (C21) (tabela 5).

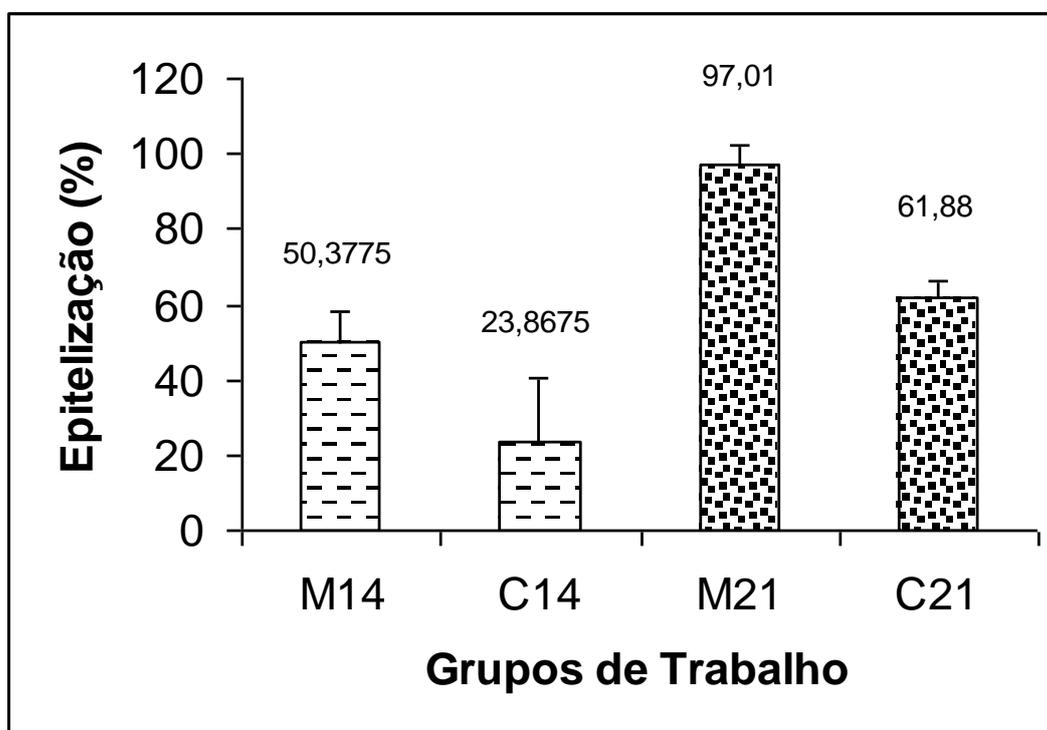


Gráfico 1. Índice percentual médio de epitelação da superfície da úlcera por queimadura nos grupos experimental e controle sacrificados ao décimo quarto (M14 e C14) e vigésimo primeiro dias (M21 e C21).

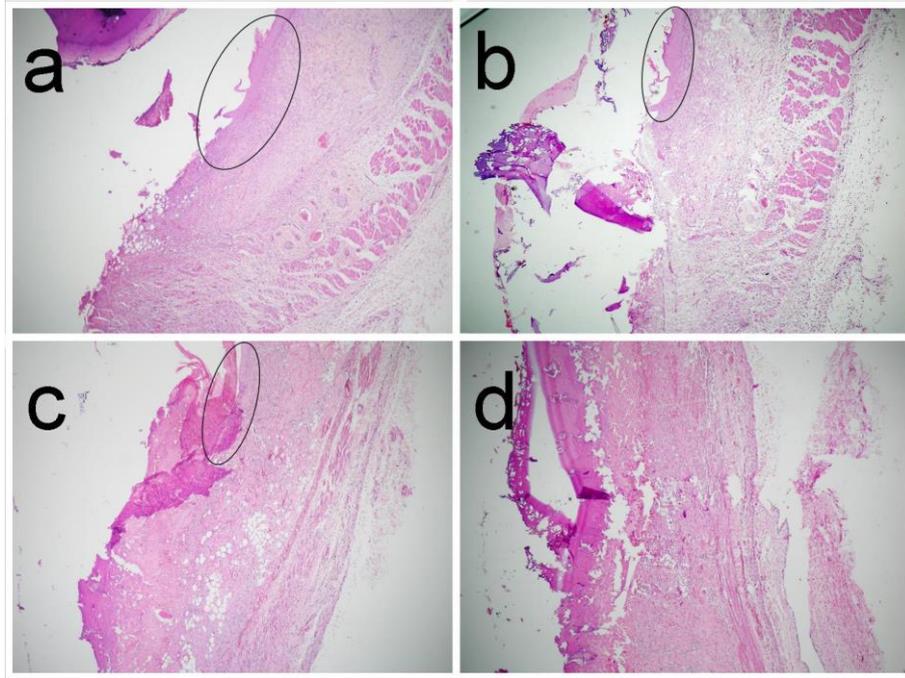


Figura 3. Fotomicrografias mostrando o padrão de epiteliação nas úlceras por queimadura nos animais do grupo C14. Em destaque a área de epiteliação (HE, 40x).

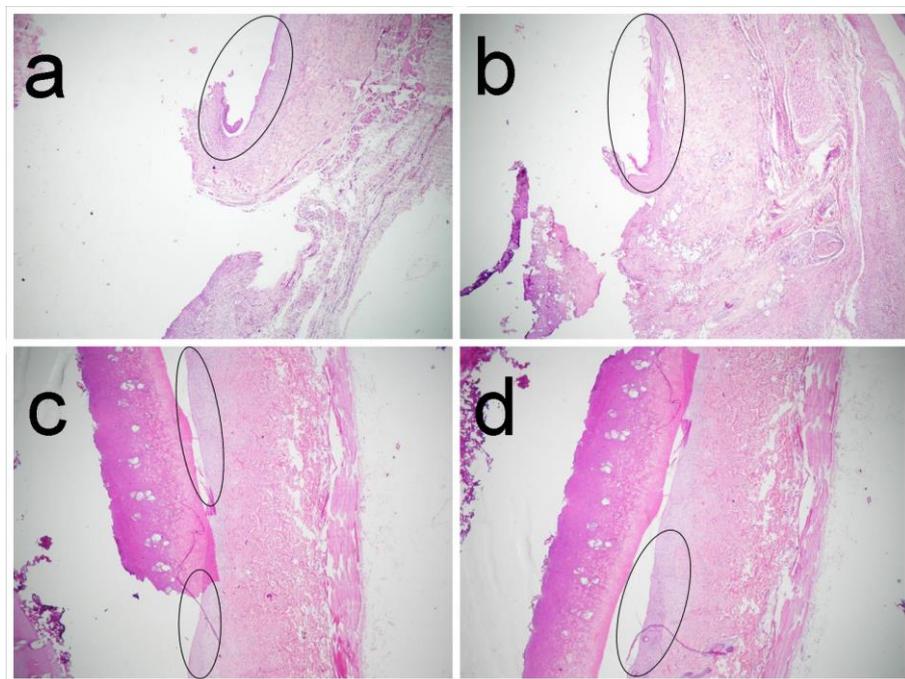


Figura 4. Fotomicrografias mostrando o padrão de epiteliação nas úlceras por queimadura nos animais do grupo M14. Em destaque a área de epiteliação (HE, 40x).

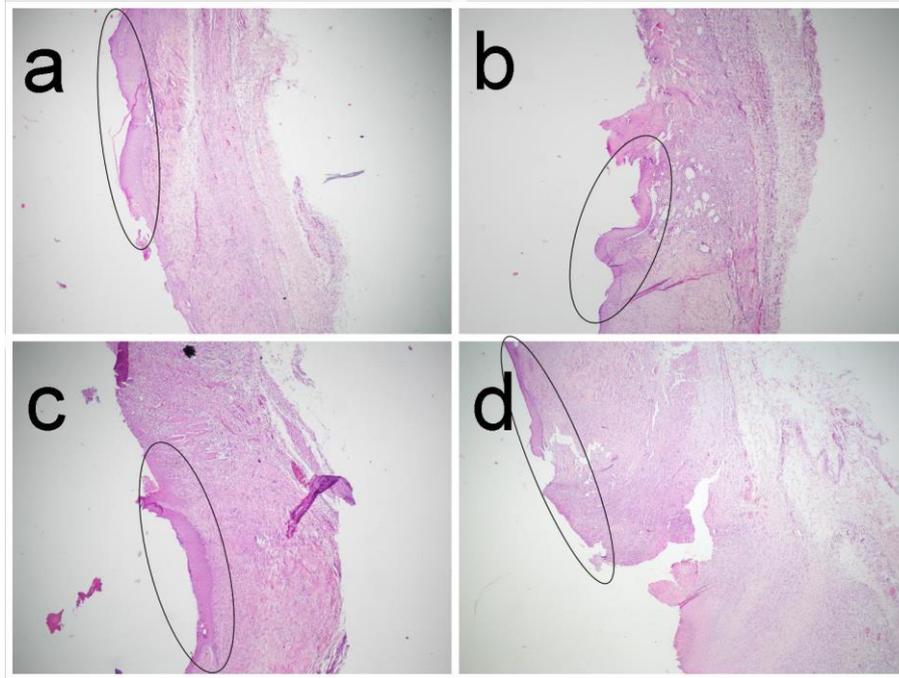


Figura 5. Fotomicrografias mostrando o padrão de epitelização nas úlceras por queimadura nos animais do grupo C21. Em destaque a área de epitelização (HE, 40x).

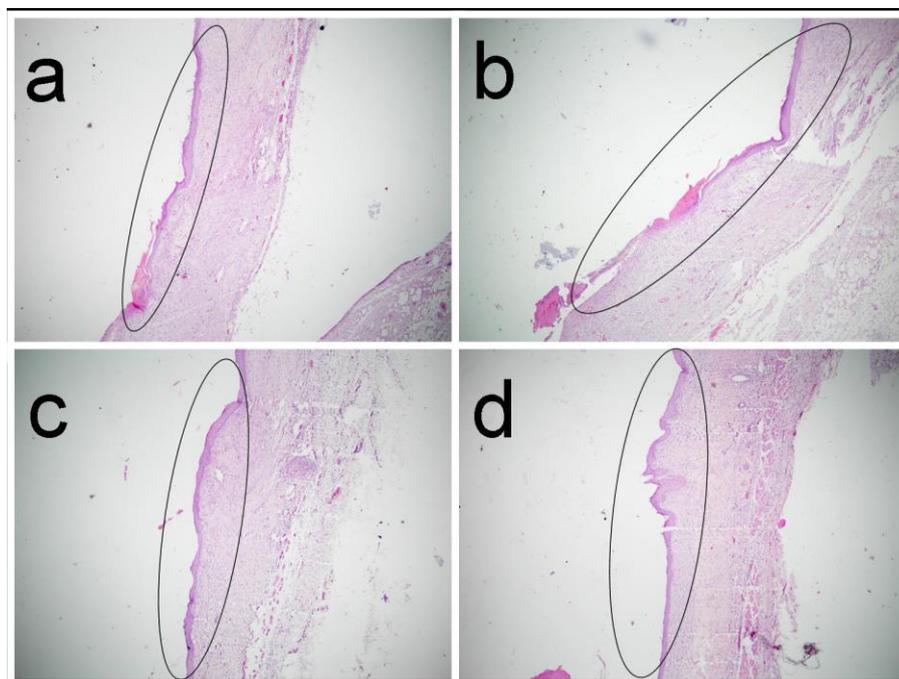


Figura 6. Fotomicrografias mostrando o padrão de epitelização nas úlceras por queimadura nos animais do grupo M21. Em destaque a área de epitelização (HE, 40x).

4.3 Análise quantitativa do número médio de vasos por campo histológico

O número médio de vasos sanguíneos por campo histológico foi analisado nos grupos controle e tratados com membrana sacrificados ao décimo quarto e vigésimo primeiro dia, após a realização dos procedimentos cirúrgicos. Foi observado que o número médio de vasos no grupo C14 correspondeu a 5,15 ($\pm 3,6$), enquanto que no grupo M14 este foi de 4 ($\pm 2,6$). Aplicado ao teste T de *Student*, verificou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre os dois valores ($p=0,0765$). Com relação aos grupos sacrificados ao vigésimo primeiro dia, foi observada uma média de vasos no grupo C21 de 3,28 ($\pm 2,05$) e 5,0 ($\pm 2,8$) no grupo M21. Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois grupos ($p=0,0003$) após a análise por intermédio do teste T de *student* (gráfico 2).

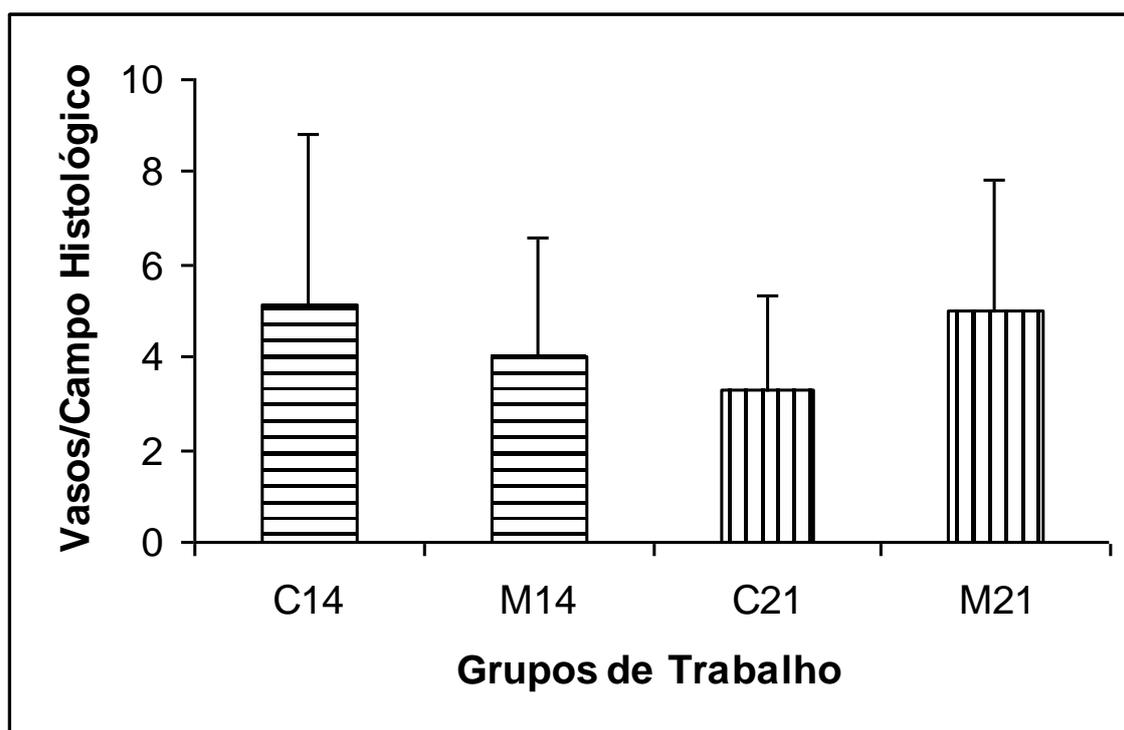


Gráfico 2: Média do número de vasos sanguíneos por campo histológico observados na área da úlcera por queimadura nos grupos experimental e controle sacrificados ao décimo quarto (M14 e C14) e vigésimo primeiro dias (M21 e C21).

4.4 Análise quantitativa do perímetro vascular médio

O perímetro vascular (determinado em pixels quadrados) foi analisado em todos os grupos de trabalho após a realização dos procedimentos cirúrgicos. Foi observado que a média dos perímetros vasculares no grupo C14 foi de 697,39 (\pm 329,8), enquanto que no GM14 foi de 915,382 (\pm 427,8). Aplicado o teste T, detectamos não haver diferença estatisticamente significativa entre a média dos dois grupos ($p=2,17$). Com relação aos grupos sacrificados ao vigésimo primeiro dia, foi observado média de 958,648 (\pm 423,3) no grupo C21, enquanto que no grupo M21 foi observado uma média de 790,6 (\pm 361,7). Verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois grupos ($p=0,00035$) após a aplicação do teste T.

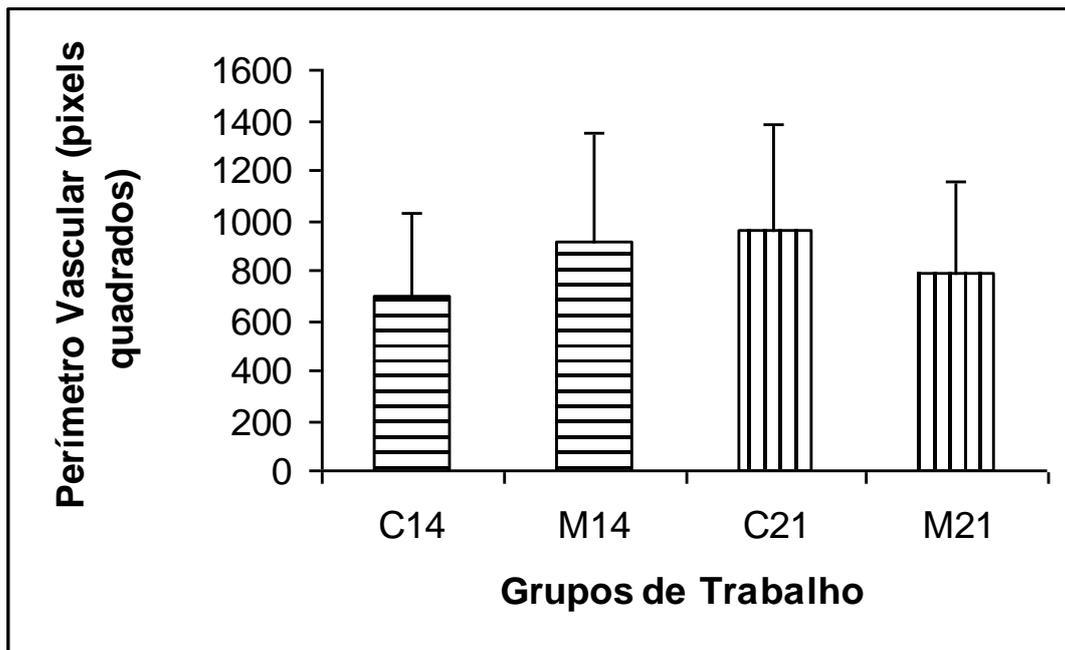


Gráfico 3: Média do perímetro luminal de vasos sanguíneos neoformados observados na área da úlcera por queimadura nos grupos experimental e controle sacrificados ao décimo quarto (M14 e C21) e vigésimo primeiro dias (M21 e C21).

4.4 Análise da fibroplasia

O estudo da fibroplasia (densidade e morfologia dos feixes de fibras colágenas depositadas durante o processo de reparo) foi efetuado por meio da coloração histoquímica do Picrossírius, analisado com uso de microscópio com filtro de luz polarizada; esse recurso destaca as fibras colágenas maduras, que devido a birrefringência, brilham sob efeito da luz polarizada.

Nos animais do grupo C14, as fibras colágenas mostram-se delgadas e delicadas (figura 7a), não exibindo, de forma geral, birrefringência à luz polarizada (figura 8a), denotando a natureza ainda bastante imatura do colágeno depositado (padrão +1). No grupo M14, a fibroplasia ainda era escassa, embora, em alguns cortes, fosse possível identificar feixes mais espessos depositados tanto na profundidade do espécime quanto nas margens, caracterizando o padrão +2 (figura 7b). No entanto, mesmo nestes casos, os feixes birrefringentes à luz polarizada mostravam orientação entrelaçada e irregular (figura 8b). Com relação aos animais sacrificados ao vigésimo primeiro dia, verificou-se que, no grupo C21, os feixes de colágeno se apresentavam espessos e grosseiros, dispersos por todo espécime (figura 7c); à luz polarizada, contudo, estes exibiam disposição ora paralela ora francamente entrelaçada, sem configurar um padrão específico (figura 8c). No grupo M21, por sua vez, os feixes de fibras colágenas exibiam morfologia também grosseira e espessa, embora com densidade claramente mais intensa (figura 7d); além disso, os feixes apresentavam, à luz polarizada, padrão de organização bem definido, com disposição paralela (figura 8d).

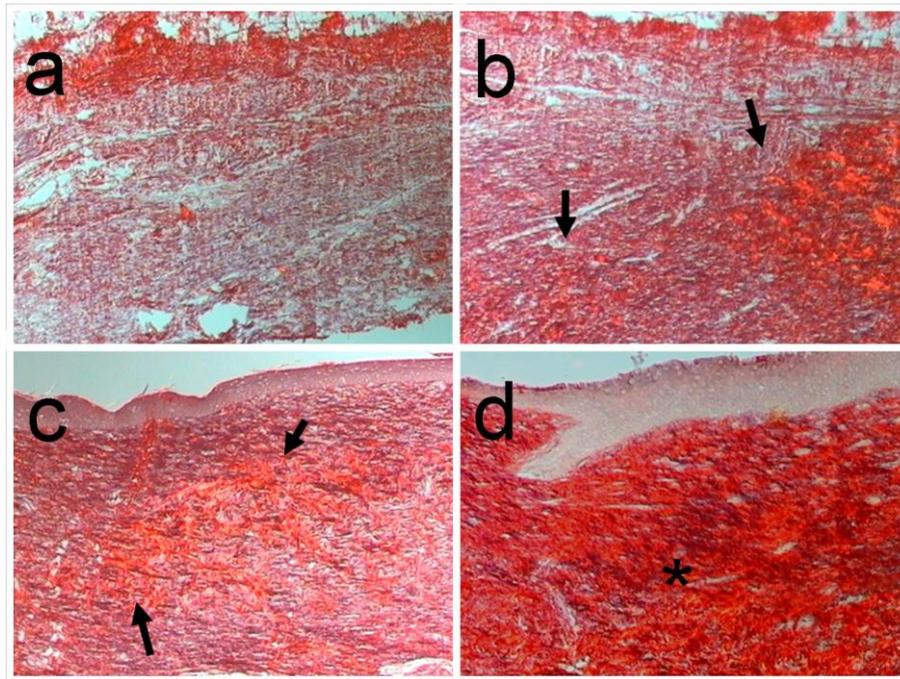


Figura 7. Fotomicrografias da área de reparação cicatricial das queimaduras. As fibras colágenas, praticamente escassas no grupo C14 (a), aparecem destacadas pelo sírius vermelho (setas) nos grupos M14 (b) e C21 (c). Observar a densa deposição colagênica no grupo M21 (*) (d) (Picrosírius, 100x).

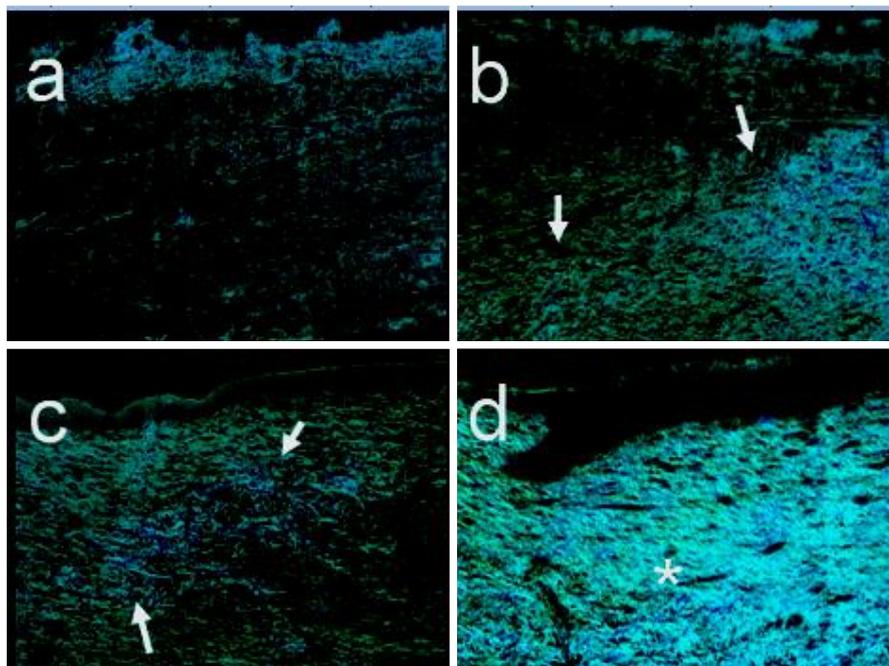


Figura 8. Fotomicrografias dos cortes anteriores sob luz polarizada, exibindo. fibras colágenas birrefringentes fosforescentes escassas e com aparência fibrilar no grupo C14 (a); densas e entrelaçadas nas margens e profundidade do espécime no grupo M14 (b) (setas); entrelaçadas e dispersas por todo espécime no grupo C21 (c) (setas); e densamente depositado, com arranjo paralelo e aparência espessa e grosseira no grupo M21 (d) (*). (Picrosírius, 100x)

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a dinâmica, a progressão e resolução da resposta cicatricial foram estudadas em modelo murino, utilizando-se, para tanto, ratos machos da linhagem *Wistar*.

A utilização de ratos neste estudo deve-se ao fato que o processo de completa reparação na derme de ratos ocorre em um período de tempo similar àquele em humanos (ROCHA et al. 2006). Além disto, a estrutura da pele do rato é em muitos aspectos similar a pele dos humanos. A pele da região dorsal destes animais é formada por epiderme, derme e tecido subcutâneo, similarmente a pele humana, justificando assim a utilização destes como modelo experimental nesta pesquisa.

Por outro lado, a restrição do estudo apenas à animais do gênero masculino pretendeu minimizar possíveis vieses decorrentes de influências das oscilações hormonais sofridas pelas fêmeas.

A escolha dos dois tempos de sacrifício (14 e 21 dias) alicerçou-se nos fenômenos biológicos que caracterizam o processo de reparo nestes períodos.

O tratamento de pacientes queimados por muito tempo era associado a um grande sofrimento e resultados insatisfatórios. Poucos pacientes sobreviviam ao choque causado pela perda de fluidos, a sepse e à insuficiência respiratória. Os sobreviventes sofriam e ainda sofrem com seqüelas físicas e psicológicas por toda a vida (HETTIARATCHY et al. 2004).

Atualmente o tratamento de queimaduras apresenta um grande desenvolvimento técnico e organizacional (SHERIDAN et al. 2004), permitindo que grandes queimados, com mais de 80% de superfície corporal queimada sobrevivam (LOSS et al. 2000).

Dentre os inúmeros progressos no tratamento de queimaduras, os substitutos de pele têm melhorado a sobrevida e a qualidade de vida destes pacientes (STALEY et al, 1996). Pesquisas iniciadas no final da década de 60, buscavam um substituto cutâneo para ser utilizado como alternativa para o

tratamento de grandes queimados, com quantidade insuficiente de área doadora de pele autóloga para a realização de enxertia (SCHULZ et al. 2000).

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo interativo e dinâmico envolvendo fenômenos de epitelização e formação de reação de granulação (SINGER, CLARK, 1999). O sucesso deste mecanismo depende da remodelação finamente controlada da matriz extracelular cicatricial, composta por, entre outras moléculas, colágeno fibrilar (I e III) e não fibrilar (IV e VI).

O colágeno tipo I tem papel fundamental no processo de reparo cutâneo, posto que corresponde ao principal elemento protéico do parênquima cicatricial (LELIEVRE et al, 1998). Em adição, uma intrincada rede de interação entre o colágeno e os fenômenos de proliferação e migração celular tem sido demonstrada na literatura, envolvendo a ligação entre integrinas de superfície celular (ceratinócitos e fibroblastos) e moléculas de colágeno, ativando receptores de algumas quinases protéicas associadas ao ciclo celular (SCHELESSINGER, 1997; SHRIVASTAVA et al, 1997; HAGA et al, 2005).

Tem sido relatado que o colágeno tipo I representa um importante constituinte protéico da pele humana, e parece ter um importante papel na dispersão e dissipação de forças mecânicas, posto que é abundante em tecidos onde forças extremas são transmitidas, como tendões e ossos, além da pele (VIEIRA, 1997). Além disso, o colágeno I, além de apresentar propriedades físicas, químicas e estruturais bem elucidadas, tem não apenas se mostrado de fácil isolamento e purificação (HO et al, 1997), mas também pode ser dispensado em inúmeras formas, como filmes e esponjas (SHRIVASTAVA et al, 1997).

O potencial de interação da matriz de colágeno acelular com células circunjacentes, a ponto de induzir nestas últimas alterações morfoestruturais, já foi demonstrado na literatura (CHEN et al, 2000; ELLIOTT et al, 2003). Desta forma, em virtude de suas propriedades bioativas, o colágeno, sob diversas formas, vem sendo utilizado como adjuvante no reparo de injúrias físico-químicas (BERNALES et al, 2004, CHENGCAN et al, 2006).

Observa-se, pois, uma íntima correlação entre o colágeno I e o processo de reparo cicatricial, o que veio suscitar e ensejar à investigação do efeito da

adição de colágeno I, sob a forma de filmes, ao sistema dinâmico que caracteriza o processo de cicatrização de queimaduras.

Assim, no presente estudo, o colágeno I foi extraído a partir de tendão bovino, processado e estruturado sob a forma de uma membrana acelular reconstituída delgada (10 a 15 μ m), com intuito de analisar sua influência sobre os fenômenos biológicos que tomam parte na cicatrização de queimaduras de terceiro grau.

Foi observado que a intensidade da reação inflamatória foi similar entre os grupos C14 e M14, mas substancialmente reduzida em M21. Os resultados obtidos na primeira fase do estudo parecem indicar que, conforme esperado, o biofilme não exibiu propriedades antiinflamatórias. Essa observação também se respalda no fato de que, apesar de apresentar numerosas características biomodulatórias, não tem sido relatada na literatura qualquer associação entre esta molécula protéica e atividade antiinflamatória. Nas fases tardias do experimento, contudo, foi possível evidenciar uma redução importante da infiltração leucocitária nos animais tratados com filmes de colágeno I. No entanto, essa redução não parece estar associada à composição físico-química do biofilme, mas sim à proteção mecânica da ferida, o que sabidamente reduz a contaminação microbiana e facilita a instalação e completude do reparo cicatricial (DIELGEMAN, EVANS, 2004).

Estudos têm demonstrado uma relação íntima entre a proliferação fibroblástica, deposição de colágeno e a epitelização da superfície de feridas cutâneas (McDOUGALL et al, 2006). Assim, as moléculas de colágeno I parecem funcionar como uma matriz que orienta a migração de células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e leucócitos (MORIMOTO et al, 2005). Ratificando estes relatos, na fase inicial deste estudo, os animais tratados com biofilmes de colágeno (M14) exibiram maior índice de epitelização que os animais controle (C14), sugerindo um papel importante da matriz colagênica na migração e proliferação de ceratinócitos. Em adição, na fase final, apesar da diferença entre os grupos experimental (M21) e controle (C21) não ter sido estatisticamente significativa, evidenciou-se uma forte tendência a uma melhor epitelização nos animais tratados com biofilme.

A importância da interação entre ceratinócitos e matriz extracelular para a indução da angiogênese (proliferação vascular) tem sido destacada na literatura; estudos têm demonstrado que a interação entre células epiteliais e fibroblastos conduz a hiperexpressão, e conseqüente secreção aumentada, do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), uma citocina amplamente envolvida na proliferação de vasos sanguíneos (ONG et al, 2007).

Nesta perspectiva, é interessante observar que, embora na fase inicial do experimento, tanto o número médio de vasos neoformados quanto o perímetro médio destes foi estatisticamente similar, sendo a densidade vascular significativamente maior na fase final (21 dias). Esses resultados corroboram os estudos anteriormente mencionados, posto que, nas etapas mais tardias do reparo, as células mesenquimais presentes na matriz extracelular em formação já haveriam sofrido a ação modulatória dos ceratinócitos, que estavam em franca proliferação na etapa anterior, levando a maior produção local de fatores de crescimento para células endoteliais e conseqüente proliferação vascular elevada. Aos 14 dias, contudo, a reação de granulação se desenvolvia de maneira semelhante em ambos os grupos, provavelmente devido ao fato de que o estímulo oriundo da interação ceratinócitos-matriz extracelular ainda não havia se processado sobre as células mesenquimais presentes no interior da ferida.

O oposto, contudo foi observado quando da análise do perímetro vascular médio. Esses achados podem encontrar respaldo científico em uma provável ação compressiva dos feixes de fibras colágenas sobre os vasos capilares, levando à redução em seu perímetro médio nos animais do grupo experimental (M21). Foi demonstrado recentemente que ceratinócitos ativos – a exemplo daqueles observados durante o fenômeno proliferativo-migratório de epitelização da superfície de feridas – também secretam citocinas que atuam diretamente na proliferação fibroblástica, como o Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) (NARINE et al, 2006). Espera-se, portanto, uma maior produção de fibras colágenas no grupo M21, onde houve maior interação dermo-epidérmica (ceratinócitos-matriz extracelular), o que resultaria, em última instância, em uma maior compressão de vasos e, portanto, menor perímetro vascular.

Em consonância com esses dados estão os achados verificados quando da análise do padrão de fibroplasia (deposição, morfologia e orientação dos feixes de colágeno). Os feixes de fibras colágenas mostraram-se mais espessos, grosseiros e com melhor orientação nos grupos experimentais, quando comparados aos controles, especialmente aos 21 dias. A deposição densa de feixes espessos de fibras colágenas evidenciada em M21 pode ter sido um fator preponderante para indução da redução do calibre vascular.

No entanto, outras inferências podem ser efetuadas a partir da análise da orientação das fibras colágenas. No grupo M21, estas exibiram o melhor padrão conformacional e maior espessura. O arranjo paralelo das fibras colágenas é fundamental para dissipação de forças mecânicas e aumento da resistência tênsil da ferida (VIEIRA, 1997). Considerando o padrão predominantemente paralelo das fibras colágenas, observado claramente no grupo M21 sob luz polarizada, seria lúcido inferir que a cicatriz reparativa, aos 21 dias, estava bem melhor formada nos animais do grupo tratado com biofilmes de colágeno.

A análise global dos resultados obtidos no presente estudo indica que a utilização de biofilmes de colágeno tipo-I bovino reconstituído contribuiu significativamente para o processo de reparo cicatricial de queimaduras de terceiro grau. As implicações clínicas destes achados são de extrema relevância, uma vez que às características físico-químicas e estruturais dos biofilmes utilizados nesta pesquisa permitem seu emprego em uma ampla gama de condições clínicas onde haja desnudamento epitelial ou ulceração com perda de substância, sem possibilidade de coaptação de bordas, além da óbvia aplicação na recuperação de queimaduras extensas. No âmbito da odontologia, é possível extrapolar os nossos resultados para o tratamento de cirurgias cruentas intra-orais, em que seja necessária a reparação por segunda intenção, como cirurgias por eletrocauterização, cirurgias periodontais, frenectomias, etc., em substituição aos cimentos cirúrgicos convencionais.

Ressalta-se, outrossim, que, sendo produzida a partir de resíduos de produtos naturais (tendão bovino), e de custo de fabricação relativamente baixo, a utilização clínica destes biofilmes poderia representar não apenas um ganho importante para a saúde pública, mas também viria a contribuir para a

identificação de uma provável vertente comercial para o tendão bovino, o que, em última análise, agregaria valor a esse resíduo antes descartável.

No entanto, a despeito de todas as vantagens supramencionadas, estudos posteriores são necessários para elucidar todos os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dinâmica da estimulação do processo de cicatrização evidenciado neste ensaio biológico preliminar antes de iniciar quaisquer ensaios clínicos.

6 CONCLUSÕES

Diante os resultados encontrados, podemos concluir que, em modelo murino, a membrana de colágeno bovino utilizado mostrou-se bastante eficiente em acelerar o processo de reparo cicatricial por segunda intenção de queimaduras de terceiro grau.

7 REFERÊNCIAS

ARGUIJO, H.G.; SANES, J.C.; VALVERDE, H.D.; VOLTRICO, S.M.R.; HAIDBAUER, A. **Actualización em anestesia para pacientes quemados**. Pren. Méd. Argent. 86:808-818, 1999.

BALBINO, C.A.; PEDREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 41 (1), Jan/Mar 2005.

BERNALES, D.M.; CARIDE, F.; LEWIS, A.; MARTIN, L. Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tissular y ósea guiadas. **Rev Cubana Invest Biomed**. 23(2):65-74, 2004.

BLANES, L. Tratamento de feridas. In: BAPTISTA-SILVA, J. C. C. (Ed.). **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo, 2004.

CARDOSO, J.C. Modificação do colágeno pela reação de Maillard e avaliação de formulações na forma gel desenvolvidas a partir do material modificado. **Tese de Doutorado apresentada - FCFRP, Universidade de São Paulo.2005, 152p.**

CARLUCCI, V.D.S.; ROSSI, L.A.; FICHER, A.M.F.T.; FERREIRA, E.; CARVALHO, E.C.. A experiência da queimadura na perspectiva do paciente. **Rev Esc Enferm USP**. 41(1): 21-8, 2007.

CHEN, C. S.; OSTUNI, E.; WHITESIDES, G.M.; INGBER, D.E. Using self-assembled monolayers to pattern ECM proteins and cells on substrates **Methods Mol. Biol.**, 139, 209-219, 2000.

CHENGCAN, Y.; PING, Y.; HAO, W.; ZHENGANG, Z.. Acceleration of wound healing in traumatic ulcers by absorbable collagen sponge containing recombinant basic fibroblast growth factor. **Biomed Mater**. 1 33-37, 2006.

DEMLING, R.H; WAY, L.W. Queimaduras e outras lesões térmicas. In: Way LW, editor, **Cirurgia: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.170-80, 1993.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, C.M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. 9: 283-89, Jan 2004.

DINO, R.G; SERRA, M.C.; MACIEIRA, L. Queimaduras no Brasil. In: **Conduas atuais em queimaduras. Revinter**. Rio de Janeiro, p.1-3, 2001.

ELLIOTT, J.T.; TONA, A.; WOODWARD, J.T.; JONES, P.L.; PLANT, A.L. Thin Films of Collagen Affect Smooth Muscle Cell Morphology. **Langmuir**, 19 (5), 1506 -1514, 2003.

FERREIRA, E.; LUCAS, R.; ROSSI, L.A.; ANDRADE, D.. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Rev Esc Enferm USP**. 37(1): 44-51, 2003.

FORTI, F.L.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A.M. Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. **J. Biomater Appl.**;20(3):267-85, 2006 Jan.

FRIESS, W. Collagen - biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 113-136, 1998.

FRIESS, W.; LEE, G. Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices. **Biomaterials**, v. 17, p. 2289-2294, 1996.

FORTI, F.L.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A.M. Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. **J. Biomater Appl.** 20(3):267-85, Jan 2006.

GRAGNANI, A.; GONÇALVES, M.L.; FERIANI, G.; FERREIRA, L.M.. Análise microbiológica em queimaduras. **Rev Soc. Bras. Cir. Plást.** 20(4):237-40, 2005.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. Fisioterapia Dermato-Funcional. 3 ed. São Paulo: Manole, 2002. KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE Journal Quantum Electronics.** 10:1703-1717, 1987.

HAGA, H.; IRAHARA, C.; KOBAYASHI, R.; NAKAGAKI, T.; KAWABATA, K. Collective movement of epithelial cells on a collagen gel substrate. **Biophys. J.** 88(3), 2250-6 2005.

HETTIARATCHY S.; DZIEWULSKI P. ABC of burns. **Introduction. Bmj** 328(7452):1366-8, 2004.

HO, H-O.; LIN, L-H.; SHEU, M-T. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as drug carrier. **J. Contr. Rel.** v. 44 (2-3), p. 103-112, 1997.

LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Int. J. Pharm.** v.221, p.1-22, 2001.

LELIEVRE, S.A.; WEAVER, V.M.; NICKERSON, J.A.; LARABELL, C.A.; BHAUMIK, A.; PETERSEN, O.W.; BISSELL, M.J.; Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, 14711-14716, 1998.

LOSS M.; WEDLER V.; KUNZI W.; MEULI-SIMMEN C.; MEYER V.E. Artificial skin, splitthickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93% of TBSA. **Burns**. 26(7):644-52, 2000.

McDOUGALL, S.; DALLON, J.; SHERRATT, J./ MAINI, P. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modeling and clinical implications. **Philos Transact A Math Phys Eng Sci**. 364(1843):1385-405,2006.

MEADE, K.R.; SILVER, F.H. Immunogenicity of collagenous implants. **Biomat.**, v.11, p.176-180, 1990. ACKERMANN, T. Fast chromatography study of propolis crude. **Food Chemistry**, Oxon, v.42, n.2, p.135-138,1991.

MEIRELES, G.C.S. Análise comparativa do efeito dos lasers GaAlAs de 660nm e 780nm na cicatrização de úlceras por queimadura em dorso de ratos diabéticos e não-diabéticos: estudo histológico. **Tese de Doutorado apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Bahia**. Salvador, 2005.

MENEZES, Eni-Leci Monteiro de; SILVA, Maria José da. **A enfermagem no tratamento dos queimados**. São Paulo: EPU, 1988

MONDRAGON, P. Tratamiento de las quemaduras. **Bol Med Hosp Infant Mex**. 56:459-70, 1999.

MORIMOTO, N.; SASO Y.; TOMIHATA K.; TAIRA T.; TAKAHASHI Y.; OHTA M.; SUZUKI S. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. **J Surg Res**, 1;125(1):56-67 May 2005. Epub 15, Jan 2005

NARINE K.; WEVER D.O.; VALCKENBORGH V V.D, FRANCOIS K., BRACKE M.; SMET D.S.; MAREEL M.; NOOTEN V.G;. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. **Tissue Eng.** 12(10):2707-16. Oct 2006.

NASCIMENTO, P. M. Efeito da variação da intensidade e do comprimento de onda do laser não cirúrgico em feridas cirúrgicas em dorso de ratos: estudo histológico. **Dissertação(Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos. 2001.**

NICOLOSI, J.G.; MORAES, A.M.. Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: Estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados. **VI Cobeq.** 2005.

NIMNI, M.E.; CHEUNG, D.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. **J Biomed Mater Res**, 21: 741-771,1987.

ONG C.T.; KHOO Y.T.; TAN E.K.; MUKHOPADHYAY A., DO D.V.; HAN H.C.; LIM I.J. Phan TT.Epithelial-mesenchymal interactions in keloid pathogenesis modulate vascular endothelial growth factor expression and secretion. **J Pathol.** 211(1):95-108, Jan 2007

PAIVA, M.B.G.. Massagem terapêutica em vítimas de queimaduras. **Associação Fluminense de Reabilitação.** Niterói 2001.

PRADO, M.P; CARVALHO JÚNIOR A. E.; FERNANDES T.D Estudo da densidade vascular do tendão do músculo tibial posterior em cadáveres. **Rev Brás Ortop.** 35(3):p53-66, 2000.

ROCHA, J.C.T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogenese. **RBPS.** 17(1): 44-48, 2004.

ROCHA, J.A.M.; OLIVEIRA, R.G.; FARIAS, R.E.; ANDRADE, L.C.R.; AERESTRUP, F.M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta

inflamatória pela terapia de laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Bras Dermatol.** 81 (2): 150-6, 2006.

ROSSI, L.A.; BARRUFFINI, R.C.P.; GARCIA, T.R.; CHIANCA, T.C.M. Queimaduras: características dos casos tratados em um hospital escola em Ribeirão Preto (SP), Brasil. **Rev. Panam Salud Publica.** 4(6), 1998.

RUSSO, A.C. Considerações gerais sobre queimaduras. In: Netto AC. **Clínica cirúrgica.** São Paulo. 1:216-20, 1994.

SCHELESSINGER, J. Direct binding and activation of receptor tyrosine kinases by collagen. **Cell,** 91, 869-872, 1997.

SCHULZ J.T; 3rd, TOMPKINS R.G.; BURKE J.F. Artificial skin. **Annu Rev Med.** 51:231-44, 2000.

SHERIDAN, R.L.; TOMPKINS, R.G. What's new in burns and metabolism. **J Am Coll Surg.**198(2):243-63, 2004.

SHRIVASTAVA, A.; RADZIEJEWSKI, C.; CAMPBELL, E.; KOVAC, L.; MCGLYNN, M.; RYAN, T.E.; DAVIS, S.; GOLDFARB, M., GLASS, D.J.; LEMKE, G.; YANCOPOULOS, G.D. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. **Molecular Cell,** 1, 25-34, 1997.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine,** 341, 738-746, 1999.

SMELTZER, S.C. da; HAIDAR, B.G. Tratado de enfermagem médico-cirúrgica. **Guanabara Koogan.** 3(7):1227-1274, Rio de Janeiro 1993.

SRIVASTAVA, S.; GORHAM, S. D.; FRENCH, D. A.; SHIVAS, A. A.; COURTNEY, J. M. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. **Biomaterials.** v. 11, p. 155-161, 1990.

STALEY, M.; RICHARD, R.; WARDEN, G.D.; MILLER, S.F.; SHUSTER, D.B. Functional outcomes for the patient with burn injuries. **J Burn Care Rehabil.** 17(4):362-8, 1996.

VERAART, J.R.; KOK, S.J.; te KOPPELE, J.M.; GOOIJER, C.; LINGEMAN, H.; VELTHORST, N.H.; BRINKMAN, U.A.Th. Capillary electrophoresis of the collagen crosslinking HP and LP utilizing absorbance, wavelength-resolved laser-induced fluorescence and conventional fluorescence detection. **Biomed. Chromatography**, v.12, p.226-231, 1998.

VIEIRA, D. C. **Estudos da liberação da rolitetraciclina suportada em gel injetável de colágeno aniônico : ransana** 1997. 61p. Dissertação de Mestrado apresentada – IFQSC Universidade de São Paulo.

YAMATOOGI, R.S.; RAHAL, S.C.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R.; CESTARI, T.M.; LIMA, A.F.M.. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. **Ciência Rural, Santa Maria.** 35(4): 837-842, Jul-Ago 2005.

YONG, L.L.; KHOR, E.; LOKE, W.K.; LAU, S.K.; SUM, C.K. **J. Biomed. Mater.Res.** 53 (1): 8–17,2000.