UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar

Fernanda Soldatelli Valente

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar

Autora: Fernanda Soldatelli Valente

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Co-orientadora: Profª. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Valente, Fernanda Soldatelli
Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar / Fernanda Soldatelli Valente. -- 2014.
110 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.
Coorientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Pele. 2. Cicatrização. 3. Criocirurgia. 4. Crionecrose. 5. Agentes tópicos. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. Cirne-Lima, Elizabeth Obino, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Fernanda Soldatelli Valente

Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar

Aprovada em 28 de fevereiro de 2014.

APROVADO POR:

_____

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI
Orientador e Presidente da Comissão

_____

Profª. PhD. DOMINGUITA LUHERS GRAÇA
Membro da Comissão (UFSM)

_____

Prof. Dr. LUCAS MARQUES COLOMÉ
Membro da Comissão (UniRitter)

_____

Prof. Dr. MARCELO MELLER ALIEVI
Membro da Comissão (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Meus eternos e sinceros agradecimentos...

A Deus, pelo dom da vida e por conceder a graça de me interessar pelos animais e pela pesquisa.

Aos meus pais, Rudimar e Noelí, que sempre acreditaram no meu potencial, por terem me ajudado a realizar o sonho de ser Médica Veterinária, por apoiarem as minhas decisões tanto pessoais quanto profissionais, com conselhos e palavras de amor, carinho e compreensão.

Às minhas irmãs, Raquel e Patricia, minhas amigas e companheiras de todas as ocasiões, pela paciência, conversas, momentos de descontração, risadas, pela compreensão das minhas falhas e ausências em períodos conturbados e difíceis, e pelo incentivo para seguir em frente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini, pela confiança depositada em mim, por compartilhar seus conhecimentos e experiências profissionais e por me incentivar a contribuir com a ciência por meio da pesquisa.

À minha co-orientadora, Profª. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima, que gentilmente me recebeu no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA/UFRGS, pela ajuda, compreensão e receptividade as novas ideias e desafios.

À amiga e colega de doutorado, Tuane Nerissa Alves Garcez, por me guiar e contribuir incansavelmente na elaboração do projeto, colaborar com correções e sugestões durante a confecção da dissertação, auxiliar na execução dos procedimentos experimentais e por compartilhar comigo seus conhecimentos sobre cicatrização de feridas.

À amiga e colega de mestrado, Simone Passos Bianchi, por me ajudar a esquematizar as primeiras ideias na elaboração deste projeto, por compartilhar conhecimentos teóricos e práticos sobre criocirurgia e pela sua colaboração e organização imprescindíveis nas etapas experimentais.

Às amigas e colegas de pós-graduação, Silvana Bellini Vidor, Priscilla Domingues Mörchbächer e Fernanda Regina Loss, por se colocarem sempre à disposição durante as cirurgias e avaliações nos animais experimentais.

Aos amigos e colegas de mestrado, Tatiane da Silva Mottin e Kauê Danilo Helene Lemos dos Reis, com quem compartilhei dúvidas, inseguranças, felicidades e momentos de alegria e diversão. Serei eternamente grata à amizade e carinho de vocês, desde quando nos conhecemos como residentes do HCV/UFRGS.

À equipe do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA/UFRGS pela acolhida, palavras de incentivo e apoio. Em especial, as amigas e Mestres Alessandra Bileski Magrisso, pelo auxílio e dedicação durante os primeiros passos do projeto, e Cristiana Kuhl, pela paciência nos ensinamentos e disposição para me ajudar nas análises estatísticas.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, por toda ajuda e apoio durante a fase experimental, em especial à enfermeira chefe Marta Justina Giotti Cioato que nunca mediu esforços para contribuir e facilitar a execução do meu projeto. Obrigada por oferecerem um ambiente saudável, de respeito aos animais e acolhedor aos pesquisadores que necessitam, em alguns momentos, fazer da Unidade sua segunda casa, assim como eu precisei.

À Profª. PhD. Dominguita Luhers Graça, pela gentileza, acessibilidade e comprometimento nas avaliações histopatológicas. Muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos de patologia, por ser um exemplo de profissional a ser seguido e pela dedicação e competência que tens na arte de ensinar seus alunos. Minha eterna admiração pelo seu trabalho.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), na pessoa do Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck, seu Diretor, por permitir a minha atuação nesta Instituição, contribuindo com o meu crescimento profissional e pessoal.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelo ensino de qualidade e oportunidades oferecidas.

Aos colegas médicos(a) veterinários(a), Profª. PhD. Dominguita Luhers Graça, Prof. Dr. Lucas Marques Colomé e Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi, pela disponibilidade em participar da minha banca examinadora e colaborar com este trabalho.

Aos animais, fundamentais para a realização da maioria das pesquisas, que inocentes doam suas vidas para o aprendizado, desenvolvimento e melhoria da vida dos seres humanos e de outros animais.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para tornar esse trabalho possível!

“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós.”

Marcel Proust

RESUMO

A criocirurgia tem sido utilizada no tratamento de diferentes enfermidades de sistemas e órgãos, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, sendo sua maior indicação o tratamento de dermatopatias. Contudo, efeitos adversos como a cicatrização lenta, cicatrizes extensas, disfunção estética e funcional, foram relatadas após a aplicação da substância criogênica. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência da sulfadiazina de prata, própolis, ácidos graxos essenciais e calêndula no tempo da cicatrização de feridas cutâneas padronizadas e induzidas pelo nitrogênio líquido em ratos. Utilizaram-se 40 ratos Wistar, divididos aleatoriamente em cinco grupos de oito animais cada: grupo vaselina (V), grupo sulfadiazina de prata (S), grupo própolis (P), grupo ácidos graxos essenciais (A) e grupo calêndula (C). Através da aplicação do nitrogênio líquido pela técnica do *spray* aberto, realizou-se a indução de duas feridas na região dorsal em segmentos paralelos de pele, uma no antímero direito e outra no esquerdo. A ferida direita recebeu o tratamento de acordo com os agentes tópicos escolhidos ou apenas com o veículo da pomada (vaselina sólida). A ferida esquerda recebeu a limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% ou nenhum tratamento adicional. As aplicações tópicas foram realizadas duas vezes ao dia, durante 28 dias após a indução das lesões. Macroscopicamente, a cada dois dias, analisaram-se as medidas das lesões e calculou-se a área e a taxa de contração cicatricial das mesmas. No 28º dia pós-operatório, procedeu-se à coleta das biópsias para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica, quanto à presença de células inflamatórias, intensidade de deposição de colágeno, densidade de mastócitos, proliferação epitelial e angiogênese. Com base nos resultados obtidos concluiu-se que: 1) o grupo própolis apresenta a maior taxa de contração das feridas, demonstrando diferença estatística significativa em relação ao grupo sem tratamento nas avaliações a partir do 6º dia pós-cirúrgico; 2) não se observa diferenças estatísticas significativas entre os grupos pesquisados quanto à proliferação epitelial, neovascularização e deposição de colágeno, nas avaliações histopatológicas e imuno-histoquímicas aos 28 dias de pós-operatório; 3) a terapia com os agentes tópicos ou, apenas, com a limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% proporciona uma relevante evolução clínica das feridas frente a não intervenção no processo cicatricial. Sugere-se a necessidade de novos estudos com cicatrização de lesões causadas pela criocirurgia, no que diz respeito às ferramentas que podem ser usadas com o intuito de acelerar esse processo e melhorar a qualidade das cicatrizes.

Palavras-chave: pele, criocirurgia, crionecrose, agentes tópicos, processo cicatricial

ABSTRACT

Cryosurgery has been used to treat different diseases of systems and organs in both human and veterinary medicine. Although treatment of skin disorders is the leading indication, adverse effects, such as delayed wound healing, large scars, esthetical deformation, and functional impairment, have been reported with administration of cryogenic substance. This study aims to evaluate the influence of silver sulfadiazine, propolis, essential fatty acids and calendula at healing time of cutaneous wounds that were standardized and induced by liquid nitrogen in rats. For that, forty Wistar rats were randomly divided in five groups of eight animals each: vaseline group (V), silver sulfadiazine group (S), propolis group (P), essential fatty acids group (A) and calendula group (C). Two parallel lesions were produced in the dorsal region of each rat through the application of liquid nitrogen by spraying technique. The right wound received treatment according to the chosen topical agents or only with ointment vehicle (solid vaseline). The left wound was just cleaned with a 0.9% sodium chloride solution or it received no additional treatment. Topical applications were carried out twice daily for 28 days after wound induction. Macroscopically, every two days, the wounds were measured to calculate their area and healing rate. On the 28th postoperative day, biopsies were performed for histopathological and immunohistochemical evaluations. Microscopic analysis included: presence of inflammatory cells, intensity of collagen deposition, mast cells density, epithelial proliferation and angiogenesis. By the obtained results, the study concludes that: 1) propolis group shows the highest wound contraction rate, with a statistical difference to the untreated group in all the evaluations performed after the sixth day of treatment; 2) there were no significant differences among groups regarding epithelial proliferation, neovascularization and collagen deposition; 3) therapy with topical agents or just a cleaning with 0.9% sodium chloride solution provides an important clinical evolution of wounds when compared to non-intervention in healing process. Lastly, this paper proposes that new studies on ways of accelerating and improving quality of the healing process following cryosurgery are necessary.

Key words: *skin, cryosurgery, cryonecrosis, topical agents, healing process*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diagrama esquemático da estrutura da pele humana. FONTE: BEAR *et al.*, 2008 20

FIGURA 2 – Rato Wistar, decúbito ventral. Após tricotomia ampla do dorso, demarcação, com auxílio de uma régua, dos locais de indução das lesões, uma no antímero direito e outra no esquerdo, 10 mm caudalmente à borda escapular, mantendo uma distância de 20 mm entre elas 41

FIGURA 3 – Rato Wistar, decúbito ventral. Observa-se a indução das lesões, no dorso, pelo nitrogênio líquido com auxílio do aparelho de criocirurgia e delimitação do jato de *spray* através de um cone de neoprene de 15 mm. A) Indução da ferida no antímero direito. B) Indução da lesão no antímero esquerdo e descongelamento da ferida direita 42

FIGURA 4 – Halo de gelo formado logo após o procedimento criocirúrgico. A) Halo de gelo no antímero direito. B) Halo de gelo no antímero esquerdo e descongelamento desse no lado direito. C) Mensuração com paquímetro digital do halo de gelo direito imediatamente após sua formação, antes de iniciar seu descongelamento 43

FIGURA 5 – Agentes tópicos utilizados nos procedimentos terapêuticos diários. Sulfadiazina = Sulfadiazina de prata, Calêndula = Calêndula, AGE = Ácidos Graxos Essenciais, Própolis = Própolis, Vaselina = Vaselina sólida 44

FIGURA 6 – Organograma do desenho experimental 46

FIGURA 7 – Aplicação dos agentes tópicos nas feridas do antímero direito imediatamente após a indução das lesões pelo nitrogênio líquido. À esquerda, aplicação da vaselina sólida (V1). À direita, aplicação da pomada de calêndula (C1). Ao centro, aplicação da pomada de própolis (P4) 47

FIGURA 8 – Procedimento de biópsia das lesões cutâneas ou cicatrizes no 28º dia. À esquerda, incisão de pele com bisturi, demarcando a área total a ser biopsiada. À direita, dissecção do fragmento previamente delimitado com pinça e tesoura 48

FIGURA 9 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões no dia da indução e aos quatro, 16 e 28 dias de pós-operatório. Nota-se a presença de cicatriz nos grupos tratados com própolis e calêndula no 28º dia. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais e C = Calêndula 54

FIGURA 10 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões no dia da indução e aos quatro, 16 e 28 dias de pós-operatório. Nota-se a presença de cicatriz no grupo tratado com vaselina sólida no 28º dia. V = Vaselina, SF = Solução Fisiológica 0,9%, ST = Sem Tratamento 55

FIGURA 11 – Demonstração gráfica da evolução da taxa de contração média de cada grupo em relação aos dias de avaliações. O eixo X representa os dias pós-cirúrgicos de avaliação morfométrica e o eixo Y representa os valores médios das taxas de contração das feridas. A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, P = Própolis, S = Sulfadiazina de prata, SF = Solução Fisiológica 0,9%, ST = Sem Tratamento e V = Vaselina 57

FIGURA 12 – Representação gráfica dos tempos de avaliação que tiveram diferença significativa ($p<0,05$) nas taxas de contração média entre os grupos analisados. Nesta figura estão abordados os tempos 3, 4, 5, 7, 8 e 9, que correspondem ao 6º, 8º, 10º, 14º, 16º e 18º dias pós-cirúrgico, respectivamente. Nota: Os valores das diferenças estatísticas entre os grupos estão informados logo abaixo de cada gráfico. P = Própolis, ST = Sem Tratamento, SF = Solução Fisiológica 0,9%, S = Sulfadiazina de prata, V = Vaselina, C = Calêndula e A = Ácidos Graxos Essenciais 59

FIGURA 13 – Representação gráfica dos tempos de avaliação que tiveram diferença significativa ($p<0,05$) nas taxas de contração média entre os grupos

analisados. Nesta figura estão abordados os tempos 10, 11, 12, 13 e 14, que correspondem ao 20º, 22º, 24º, 26º e 28º dias pós-cirúrgico, respectivamente. Nota: Os valores das diferenças estatísticas entre os grupos estão informados logo abaixo de cada gráfico. P = Própolis, ST = Sem Tratamento, SF = Solução Fisiológica 0,9%, S = Sulfadiazina de prata, V = Vaselina, C = Calêndula e A = Ácidos Graxos Essenciais 60

FIGURA 14 – Intensidade da inflamação. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de reação inflamatória dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9% 61

FIGURA 15 – Pele reparada, rato Wistar, grupo vaselina. Epiderme hiperplásica e derme com pequenos vasos e infiltrado inflamatório difuso discreto. HE, Obj. 10 62

FIGURA 16 – Pele reparada, rato Wistar, grupo vaselina. Epiderme com camadas evidentes e derme superficial com poucos vasos. HE, Obj. 20 62

FIGURA 17 – Pele ulcerada, rato Wistar, grupo sulfadiazina de prata. Derme com rica neovascularização e infiltrado inflamatório difuso moderado. HE, Obj. 10 63

FIGURA 18 – Pele, rato Wistar, grupo própolis. Pele ulcerada recoberta por crosta espessa sobre infiltrado inflamatório intenso. HE, Obj. 10 64

FIGURA 19 – Pele, rato Wistar, grupo sem tratamento. Derme profunda com infiltrado perivascular difuso e discreto, rico em plasmócitos (setas). HE, Obj. 40 64

FIGURA 20 – Intensidade de deposição de colágeno. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de deposição de colágeno dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos

Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9% 66

FIGURA 21 – Pele, rato Wistar, grupo sulfadiazina de prata. A) Pele parcialmente reparada, com área ulcerada à direita e feixes de fibras colágenas logo abaixo da derme superficial. Masson, Obj. 10. B) Pele ulcerada recoberta por crosta espessa sobre infiltrado inflamatório abundante e numerosos feixes de fibras colágenas. Masson, Obj. 10 66

FIGURA 22 – Pele, rato Wistar, grupo sem tratamento. Pele reparada hiperplásica com derme rica em vasos e fibras colágenas. Masson, Obj. 10 67

FIGURA 23 – Pele, rato Wistar, grupo solução fisiológica 0,9%. Pele reparada com derme rica em fibras colágenas que na profundidade formam feixes entrelaçados (*). Masson, Obj. 10 68

FIGURA 24 – Densidade de mastócitos. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de densidade de mastócitos dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9% 68

FIGURA 25 – Pele, rato Wistar, grupo sem tratamento. Numerosos mastócitos próximos a vasos sanguíneos na derme profunda (setas), evidenciados pelo azul de toluidina. AT, Obj. 40. Realce: mastócito metacromático desgranulando. AT, Obj. 100 69

FIGURA 26 – Densidade de proliferação epitelial. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de densidade de células marcadas pelo Ki-67 dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9% 69

FIGURA 27 – Pele, rato Wistar, marcação de células epiteliais pelo anticorpo Ki-67. A) Grupo própolis. Pele reparada com várias células basais marcadas

pelo anticorpo. IHQ, Obj. 10. B) Grupo sem tratamento. Pele reparada hiperplásica com numerosas células basais marcadas pelo anticorpo. Alguns fibroblastos da derme também apresentam marcação. IHQ, Obj. 20. C) Grupo ácidos graxos essenciais. Marcação uniforme de células basais em pele reparada hiperplásica. IHQ, Obj. 20. D) Grupo vaselina. Pele hiperplásica e hiperceratótica reparada em remodelação com marcação escassa de células basais. Há algumas células dérmicas marcadas pelo anticorpo. IHQ, Obj. 10 70

FIGURA 28 – Densidade de novos vasos sanguíneos. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de densidade vascular dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9% 71

FIGURA 29 – Pele, rato Wistar, grupo sulfadiazina de prata. A) Vasos sanguíneos neoformados com numerosas hemácias no seu interior, juntamente com fibroblastos fusiformes (setas). HE, Obj. 20. B) Numerosos vasos sanguíneos são evidenciados pela marcação do VEGF. IHQ, Obj. 20 72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição das pomadas utilizadas com os respectivos princípios ativos 44

TABELA 2 – Média (em dias) do início da queda das crostas (crionecroses) e dia da queda da primeira e da última crosta de cada grupo avaliado, após a indução das lesões. V = Vaselina, S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9% 56

TABELA 3 – Taxa de contração média dos grupos analisados obtida a cada dois dias no período pós-cirúrgico, durante as avaliações morfométricas. A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, P = Própolis, S = Sulfadiazina de prata, SF = Solução Fisiológica 0,9%, ST = Sem Tratamento e V = Vaselina 58

TABELA 4 – Quantidade de amostras (estimada em porcentagem) em cada grupo analisado quanto à presença de: hiperplasia da epiderme, reepitelização completa, úlcera, crosta e plasmócitos avaliadas pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). V = Vaselina, S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9% 65

TABELA 5 – Classificação dos dados microscópicos em relação à categoria predominante (ausente, leve, moderada, intensa) em cada grupo analisado quanto a: intensidade da inflamação, intensidade de deposição de colágeno, densidade de mastócitos, densidade de proliferação epitelial (expressão do marcador Ki-67) e angiogênese (densidade de novos vasos sanguíneos). V = Vaselina, S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9% 73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 OBJETIVOS 18
2.1 Geral 18
2.2 Específicos 18
3 REVISÃO DE LITERATURA 19
3.1 O animal experimental 19
3.2 A pele e os mecanismos de reparo tecidual 19
3.2.1 Anatomia e fisiologia da pele 19
3.2.2 Cicatrização cutânea 21
3.3 Criocirurgia 25
3.3.1 Histórico 25
3.3.2 Mecanismos de morte celular induzida pelo frio (crionecrose) 27
3.3.3 Agentes criógenos 31
3.3.4 Equipamentos e técnicas 31
3.3.5 Tratamento criocirúrgico 32
3.3.6 Indicações terapêuticas 33
3.3.7 Vantagens e desvantagens 34
3.3.8 Complicações e sequelas 35
3.4 Agentes tópicos na cicatrização de feridas 35
3.4.1 Sulfadiazina de prata 35
3.4.2 Própolis 36
3.4.3 Ácidos graxos essenciais 37
3.4.4 Calêndula 39
4 MATERIAL E MÉTODOS 40
4.1 Animais experimentais 40
4.2 Procedimento anestésico 40
4.3 Procedimento cirúrgico 41
4.4 Agentes da terapia tópica 43
4.5 Procedimentos terapêuticos 45
4.6 Avaliação macroscópica 47
4.7 Avaliação morfométrica 47

4.8 Obtenção das amostras 48
4.9 Método de eutanásia 48
4.10 Avaliação microscópica 49
4.11 Análise estatística 50
5 RESULTADOS 51
5.1 O animal experimental 51
5.2 Procedimento anestésico 51
5.3 Procedimento cirúrgico 51
5.4 Aplicação dos agentes tópicos 52
5.5 Procedimentos pós-operatórios 52
5.6 Avaliação macroscópica 53
5.7 Avaliação morfométrica 56
5.8 Avaliação microscópica 61
5.8.1 Avaliação da coloração HE 61
5.8.2 Avaliação da coloração TM 66
5.8.3 Avaliação da coloração AT 68
5.8.4 Avaliação da expressão do marcador Ki-67 69
5.8.5 Avaliação da expressão do VEGF 71
6 DISCUSSÃO 74
7 CONCLUSÕES 88
REFERÊNCIAS 89
APÊNDICE A – Ficha de controle cirúrgico 100
APÊNDICE B – Ficha de avaliação macroscópica das feridas 101
APÊNDICE C – Ficha de controle biópsia 102
ANEXO A – Aprovação de projeto sob número 130376 103
ANEXO B – Protocolo de coloração técnica histoquímica de Hematoxilina-Eosina (HE) 104
ANEXO C – Protocolo de coloração técnica histoquímica de Tricômico de Masson (TM) 105
ANEXO D – Protocolo de coloração técnica histoquímica de Azul de Toluidina (AT) 106
ANEXO E – Protocolo técnica de imuno-histoquímica 107

1 INTRODUÇÃO

As tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização das feridas, sejam elas acidentais ou provocadas intencionalmente como parte da realização de procedimentos, remontam à Antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia a importância de protegê-las de forma a evitar complicações e repercussões negativas para o paciente.

As feridas em animais representam uma constante razão para a busca de atenção veterinária. A forma como elas são tratadas afeta diretamente a taxa de cura, o tempo de cicatrização, o retorno a função normal e a aparência cosmética final. O tratamento das lesões cutâneas depende da fase de cicatrização da ferida e pode incluir debridamento mecânico ou químico, irrigação da área afetada, utilização de antissépticos e de antibióticos, aplicação de curativos e de agentes tópicos.

A criocirurgia é uma técnica rápida de tratamento quando comparada à excisão cirúrgica tradicional. Apresenta menor potencial de invasividade e menor risco de morbidade do paciente. Porém, alguns autores e especialistas na área referem como efeitos adversos a cicatrização lenta, cicatrizes extensas, disfunção estética e funcional importante, após a aplicação da substância criogênica.

A criocirurgia tem sido utilizada no tratamento de diferentes enfermidades de sistemas ou órgãos, embora ainda haja um maior emprego no tratamento de dermatopatias. Na medicina é indicada para o tratamento de mais de 60 tipos de lesões dermatológicas inflamatórias ou neoplásicas, além de mais de quinze tipos de neoplasias malignas. Na medicina veterinária, a criocirurgia também tem sido mais aplicada em dermatologia, como por exemplo, nos granulomas de origem infecciosa ou estéreis, piodermites profundas, hiperplasias, cistos, fístulas e neoplasias benignas e malignas. Contudo, com o avanço do conhecimento, as aplicações se ampliaram tanto na medicina como na veterinária, para diferentes neoplasias em outros órgãos como olhos, próstata, fígado, pâncreas, pulmão, linfonodos, ossos e sistema nervoso.

No entanto, mesmo com todas essas indicações do tratamento criocirúrgico, nas áreas da saúde humana e animal, não existem trabalhos sobre a utilização de agentes tópicos ou qualquer outro tratamento adicional, após as sessões de congelamento pelo nitrogênio líquido em lesões cutâneas. Dessa forma, desconhece-se a influência que tais produtos poderiam ter frente à cicatrização de queimaduras cutâneas causadas pelo frio,

tanto no que diz respeito à diminuição do tempo de reparo tecidual como na qualidade da cicatriz formada.

Através deste estudo, pretende-se avaliar a cicatrização de feridas cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos e a influência da sulfadiazina de prata, própolis, ácidos graxos essenciais e calêndula nesse processo. Esta pesquisa visa testar a utilização de agentes tópicos, que são indicados em casos de queimaduras causadas pelo calor em humanos, em queimaduras provocadas pelo frio. A partir do conhecimento dos resultados obtidos neste trabalho, busca-se uma aplicação clínica rotineira no tratamento de pacientes portadores de defeitos cutâneos, causados após sessões de criocirurgia.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a influência da sulfadiazina de prata, própolis, ácidos graxos essenciais e calêndula no tempo da cicatrização de feridas cutâneas padronizadas e induzidas pelo nitrogênio líquido em ratos Wistar.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência do tratamento de feridas cutâneas com os agentes tópicos propostos e comparar as diferenças obtidas entre os grupos pesquisados;

  Estas comparações serão baseadas em resposta aos seguintes testes:

- Cálculo da taxa de contração por meio da medida da ferida com a utilização de paquímetro digital nos dias zero, dois, quatro, seis, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28;
- Avaliação da atividade celular, neovascularização e deposição de colágeno através de histopatologia e imuno-histoquímica das amostras obtidas no 28º dia;
- Acompanhamento da evolução dos tratamentos através de imagens fotográficas do processo de cicatrização das feridas nos dias zero, dois, quatro, seis, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O animal experimental

O animal experimental adotado para este estudo foi o rato (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), pertencente à ordem *Rodentia* e à família *Muridae*.

O *Rattus norvegicus* foi o primeiro mamífero a ser domesticado com propósitos científicos. O primeiro trabalho de pesquisa utilizando esse animal foi realizado na França, em 1856, para estudar os efeitos da adrenalectomia, por um pesquisador chamado Philipeaux. A linhagem Wistar, usada no mundo todo, foi desenvolvida no mais antigo Instituto de Pesquisa dos Estados Unidos, o Instituto Wistar, na Filadélfia. O fato de uma mesma linhagem ser utilizada em vários laboratórios é importante porque permite a repetição de um mesmo experimento, em diferentes centros de pesquisa no mundo (LAPCHIK *et al.*, 2009).

O rato Wistar vem sendo utilizado para diversos propósitos, incluindo estudos de regeneração tecidual, reumatologia e endocrinologia (TUFIK *et al.*, 2004). Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas na área de cicatrização cutânea e cirurgia plástica utilizando esse animal como experimental (RAHAL *et al.*, 2003; NITZ, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2009; PIMENTEL, 2011; BATISTA *et al.*, 2012; LOSS, 2013).

3.2 A pele e os mecanismos de reparo tecidual

3.2.1 Anatomia e fisiologia da pele

A pele é a principal barreira de proteção do organismo e tem como funções básicas impedir a perda excessiva de líquidos, proteger da ação de agentes externos, sintetizar vitamina D com a exposição aos raios solares, agir como órgão do sentido e participar da termorregulação corpórea (SMELTZER & BARE, 2005).

A pele é o maior órgão do corpo, recobrindo-o em sua totalidade. Continua-se com as membranas mucosas que revestem os sistemas digestório, respiratório e urogenital, nos locais onde estes se abrem para a superfície. Histologicamente, é dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme, firmemente unidas entre si (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa, composta por quatro diferentes

linhagens celulares: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel. A derme é a camada mais profunda e é formada por tecido conjuntivo (DYCE *et al.*, 1990; BANKS, 1992; BLANES, 2004).

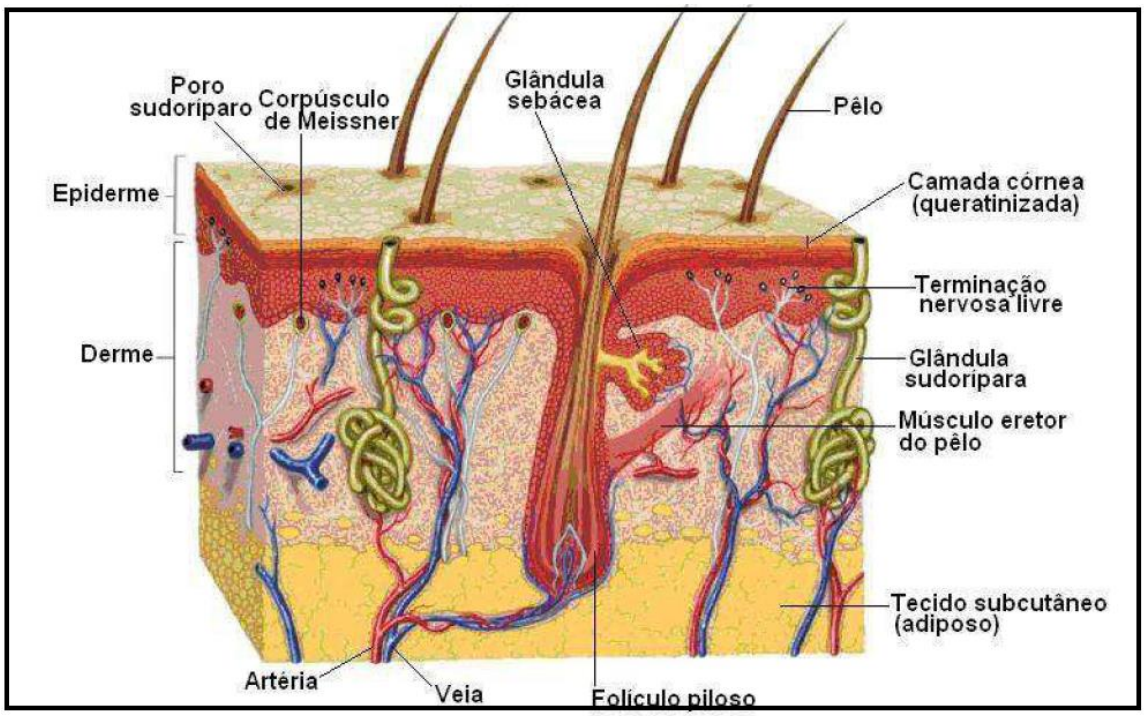

Figura 1 - Diagrama esquemático da estrutura da pele humana. FONTE: BEAR *et al.*, 2008.

A epiderme organiza-se em camadas e, à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. Nos animais, é constituída por quatro camadas: germinativa, espinhosa, granulosa e córnea. A camada germinativa é a mais profunda e faz limite com a derme. A camada córnea, a mais superficial, é constituída por células escamosas cheias de queratina, que proporcionam proteção contra traumas físicos e químicos. As várias camadas de queratinócitos intimamente unidos uns aos outros, fornecem barreira contra a invasão de microorganismos e água. O pigmento melanina na epiderme protege os tecidos subjacentes dos efeitos nocivos da luz ultravioleta (BANKS, 1992; BLANES, 2004).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo. É composta principalmente por uma matriz extracelular rica em

fibras colágenas, apresentando-se bastante vascularizada e inervada, podendo, também, conter glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos. Pode ser dividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais interna (BANKS, 1992; BLANES, 2004). A derme contém muitos tipos diferentes de células, incluindo fibroblastos e fibrócitos, macrófagos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. Esta camada fornece uma base firme para a epiderme e para os anexos cutâneos (DYCE *et al.*, 1990).

3.2.2 Cicatrização cutânea

A cicatrização de ferimentos começa imediatamente após uma lesão ou incisão e corresponde a uma combinação de eventos físicos, químicos e celulares que restaura um tecido ferido (HEDLUND, 2005). O processo de cicatrização é contínuo e cada fase é crucial para o resultado final, pois cada uma delas influencia no desenvolvimento e duração da fase seguinte. Portanto, o mais rápido reparo será o mais funcional e cosmeticamente aceitável (SWAIN & HENDERSON, 1997).

A cicatrização pode ser dividida em fases baseadas nas características microscópicas apresentadas, sendo estas iniciadas, mediadas e sustentadas por eventos bioquímicos complexos que têm como mediadores citocinas e fatores de crescimento. Este processo envolve uma regulada cascata de eventos, iniciada pela interação entre alguns tipos celulares, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (NWOMEH *et al.*, 1998). Recrutamento de células inflamatórias, angiogênese, formação de tecido de granulação, proliferação de fibroblastos e migração de queratinócitos contribuem para restaurar a integridade funcional e anatômica do tecido. A perfeita interação de todos esses fatores determina a qualidade e a velocidade de cicatrização de uma lesão (ROH & LYLE, 2006).

A cicatrização, para ser mais bem compreendida, pode ser dividida em três fases que se sobrepõem: inflamatória, proliferativa (ou fase de reparo) e de maturação (ou fase de remodelamento). O reconhecimento dessas fases, com base nas características macroscópicas, permite ao clínico fazer uma associação entre os eventos microscópicos e bioquímicos; o conhecimento desses eventos direciona ao manejo apropriado da ferida (HOSGOOD, 2006). A fase inflamatória é iniciada logo após a lesão e as fases subsequentes são dependentes de cada fase anterior (DYSON, 1997; LIPTAK, 1997; PAVLETIC, 2010).

Na fase **inflamatória** (0 a 3 dias) ocorre a vasoconstrição reflexa e oclusão de pequenos vasos, com acúmulo plaquetário e deposição de coágulos de fibrina. Essa vasoconstrição tem duração de 5 a 10 minutos e é seguida por uma vasodilatação que permite a passagem de células e fluidos através das paredes dos vasos sanguíneos para o espaço extravascular, diluindo substâncias tóxicas e favorecendo a diapedese leucocitária (HEDLUND, 2005; HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010). Esta vasodilatação com extravasamento de elementos para o exterior do vaso forma um exsudato, traduzido clinicamente por tumor, calor, rubor e dor, cuja intensidade correlaciona-se com o tipo e grau de agressão. Juntamente com todas estas alterações, que correspondem à resposta vascular, existe uma resposta celular. Algumas células são importantes nesta fase: os neutrófilos são responsáveis pela digestão de bactérias e tecidos desvitalizados e os monócitos transformam-se em macrófagos e auxiliam na fagocitose de bactérias e restos celulares. Após o trauma, são liberados mediadores celulares, os quais estimulam a elaboração de substâncias, que desenvolvem o fenômeno inflamatório (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e tromboxanos, linfocinas, interleucina 1 e 2) (BLANES, 2004; HEDLUND, 2005). A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea produzem um coágulo que sela os vasos rompidos e impede o extravasamento sanguíneo adicional (DYSON, 1997). O coágulo, formado por plaquetas, fibrina, eritrócitos e leucócitos, também é responsável por estabilizar as bordas da ferida e fornecer a ela uma resistência mínima (HOSGOOD, 2006).

Os neutrófilos possuem vida curta, fagocitam microorganismos e após, degeneram e morrem. Dessa forma, liberam enzimas que auxiliam os monócitos a retirar os restos necróticos do local. As plaquetas são as primeiras células reparadoras a aparecerem em uma ferida, e elas produzem alguns dos fatores de crescimento que cumprem um importante papel na fase reparadora da cicatrização “epidermal growth fator” (EGF), fator plaquetário IV, “insulin-like growth facto-1” (IGF-1), “transforming growth fator-beta” (TGF-β) (SWAIN & HENDERSON, 1997). Os monócitos são essenciais à cicatrização. Privada de outros elementos celulares, as feridas continuam cicatrizando; contudo, se privada dos monócitos e suas funções, as feridas não cicatrizam (SWAIN & HENDERSON, 1997; BALBINO *et al.*, 2005). Os monócitos atraem fibroblastos para a ferida, estimulando estes para a maturação da síntese de colágeno e tornam-se macrófagos quando ingressam na ferida, fagocitando tecidos e fragmentos mortos (RAISER, 1995; ANDERSON, 1996; PAVLETIC, 2010). Quando se diferenciam em

macrófagos, sintetizam e liberam proteases debridantes que retiram coágulos de fibrina e colágeno, restos e fragmentos de células mortas. Liberam fatores de crescimento de células endoteliais que atraem mais fibroblastos para a ferida. A chegada dos linfócitos coincide com a chegada dos macrófagos, e existe uma interação entre eles. A duração desta fase depende da quantidade de fragmentos e infecção, sendo então importante o debridamento cirúrgico, hemostasia e drenagem da lesão. Quanto mais infectada e mais restos de tecidos mortos restarem na ferida, mais tempo durarão as fases inflamatória e de debridamento, levando a um retardo no processo cicatricial (ANDERSON, 1996; SWAIN & HENDERSON, 1997; HATANAKA & CURI, 2007).

A fase de **proliferação** ou **fibroblástica** ou **de reparo** (3 a 14 dias) é composta pelos seguintes processos: proliferação fibroblástica, infiltração capilar e, proliferação e migração epitelial. Nessa fase ocorre intensa migração e proliferação celular, principalmente de fibroblastos e queratinócitos (SEPHEL & WOODWARD, 2006), que atuam para o reparo do tecido conjuntivo e do epitélio. Os fibroblastos surgem por volta do segundo e terceiro dia após o trauma. São células importantes na produção de componentes da substância fundamental e colágeno. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais denso e elástico. Esse processo é denominado de fibroplasia e sua eficiência é dependente da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, da neovascularização da região (HARTLAPP *et al.*, 2001; HATANAKA & CURI, 2007).

Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e, após influência dos fatores de crescimento, são ativados e migram das bordas para o centro da ferida (THEORET, 2005; STOCUM, 2006). A indução da angiogênese ocorre principalmente pela ação direta de fatores de crescimento sobre as células endoteliais (BALBINO *et al.*, 2005; MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009). Por volta do quarto dia, com a fibroplasia e a angiogênese, inicia-se a formação do tecido de granulação, o qual é constituído por macrófagos, fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares, os quais são sustentados pela matriz extracelular. Esse tecido é edematoso, exsudativo e caracteriza-se pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos (BAUM & ARPEY, 2005; HATANAKA & CURI, 2007). Durante o amadurecimento fenotípico dos fibroblastos em células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à diferenciação de alguns fibroblastos das margens das feridas em

miofibroblastos, células com características funcionais semelhantes às células do músculo liso (THEORET, 2005; SEPHEL & WOODWARD, 2006).

A formação do epitélio ocorre pelo aumento de tamanho, da divisão e da migração das células da camada basal da epiderme sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente. Nas feridas com perda total da derme, a epitelização se faz apenas das margens da mesma, pois não há anexos cutâneos remanescentes. A ineficiência do processo mitótico destas células nas etapas iniciais é devido à inexistência de substrato adequado na região da ferida, que somente é fornecido quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme (BALBINO *et al.*, 2005). Em feridas suturadas, células epiteliais podem cobrir a ferida em 12 a 24 horas. Já em feridas abertas com espessura total, um leito de granulação deve formar-se antes da epitelização; sendo assim, ocorre um intervalo de quatro a cinco dias (PAVLETIC, 2010).

Os fatores mais importantes que influenciam a epitelização são os fatores de crescimento de macrófagos e plaquetas. Fatores de crescimento epidermal também são importantes para a proliferação fibroblástica e de tecido de granulação. O excesso de lactato, sintetizado por macrófagos, também estimula a deposição de colágeno. A migração epitelial é guiada pelas fibras de colágeno (HEDLUND, 2005; PAVLETIC, 2010). O teor de água no leito da ferida aparentemente facilita a migração epitelial, pois feridas com tecidos adequadamente úmidos reparam mais rapidamente do que feridas ressecadas (HANKS & SPODNICK, 2005). Enquanto as células epiteliais se deslocam, há a liberação de colagenase para facilitar sua migração abaixo da crosta, que será posteriormente separada da superfície da ferida devido à ação dessa enzima. O contato entre as células epiteliais em todos os lados resulta na inibição de uma migração celular adicional (inibição densidade dependente) (HEDLUND, 2005; HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010).

A fase de **maturação** ou **remodelação** (14 dias a um ano) é a fase final da cicatrização de uma ferida e corresponde a remodelação e restauração da estrutura normal de tecidos (ANDERSON, 1996). A transição da matriz extracelular em cicatriz requer o remodelamento do tecido conjuntivo presente na lesão (HOSGOOD, 2006). Ocorre então o remodelamento do colágeno, com um equilíbrio entre a deposição e o catabolismo deste, e a substituição do colágeno tipo III, que gradualmente se reduz, pelo colágeno tipo I, que aumenta. Enzimas colagenase específicas (metaloproteinases) produzidas pelos macrófagos, fibroblastos e células epidérmicas degradam os colágenos

tipos I, II, III, X e XIII e as fibras de colágeno não-funcionais presentes na ferida. A deposição de colágeno está diretamente relacionada à resistência à tração exercida pela ferida (PAVLETIC, 2010). Durante essa fase, a quantidade de fibronectina e ácido hialurônico da matriz extracelular são reduzidos e a quantidade de proteoglicanos se eleva. Os proteoglicanos são responsáveis pelo aumento na elasticidade da ferida (DYSON, 1997). Conforme a maturação da ferida progride, a densa rede de capilares do tecido de granulação saudável declina, assim como sua celularidade, devido a apoptose das células. O resultado é a substituição do tecido de granulação pelo tecido cicatricial, concluindo o reparo da lesão. Em feridas crônicas, há o desenvolvimento de uma matriz fibrosa marcada pela deposição de colágeno e uma decadência na quantidade de capilares (DYSON, 1997; HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010).

De um modo geral, as feridas agudas respondem de maneira rápida, cicatrizam sem maiores complicações, enquanto as feridas crônicas são de longa duração, podendo reincidir frequentemente. Uma característica marcante de inflamação crônica é a proliferação de monócitos. Isso acontece quando há presença de um "provocador da lesão", como material estranho ou até mesmo bactérias, desencadeando então uma proliferação dos monócitos (HOSGOOD, 2007). Os fatores que retardam a cicatrização são: infecções, tecido de granulação excessivo, mudanças repetidas de curativos, hipotermia, hipoproteinemia, baixa tensão de oxigênio, dissecação da superfície da ferida, anemia, uremia, diabetes, hiperadrenocorticismo, doença hepática, fármacos citotóxicos, anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE'S) e corticosteróides (ANDERSON, 1996; HOSGOOD, 2007).

3.3 Criocirurgia

3.3.1 Histórico

O uso do frio pela medicina é muito antigo. Inicialmente utilizado de forma empírica, teve grandes avanços nos séculos XIX e XX com a evolução da Física e, principalmente, do conhecimento que se adquiriu sobre a liquefação dos gases. Pode-se utilizar o frio de duas maneiras, aparentemente paradoxais: a conservação e a destruição. O conhecimento de diferentes técnicas permite a manutenção pelo frio chamada de criopreservação (de medula óssea, de sangue e de gametas), enquanto a destruição de tecidos é promovida pela crionecrose. Entre esses dois polos extremos,

alguns autores consideram como crioterapia a utilização de baixas temperaturas na fisioterapia para tratamento de processos mórbidos articulares e musculares (LUCAS & LARSSON, 2007).

A criocirurgia também denominada de crioablação, crioterapia ou cirurgia por congelamento, é uma modalidade terapêutica onde as baixas temperaturas são utilizadas para destruir tecidos comprometidos. Etimologicamente, o prefixo "crio" deriva do grego "kruos" significando frio. Inicialmente, foi conceituada por Cooper (1963) como a aplicação do frio com fins terapêuticos visando o congelamento dos tecidos biológicos, o que acarretaria inibição fisiológica ou a destruição tecidual. Já, segundo Goldstein & Hess (1977) seria o procedimento no qual haveria a destruição seletiva de tecidos quando da interposição em alternância de ciclos de congelamento e de descongelamento. Withrow (1980) referiu-se a tal modalidade de terapia como sendo o uso de baixas temperaturas, induzindo a morte celular. Finalmente, ainda em termos conceituais, Hong & Rubinsky (1994) a definiram como a destruição "*in situ*" de tecidos cancerígenos pelo emprego do congelamento localizado.

Este tipo de terapia já fora referido na literatura médica que antecede a era cristã. Homero (900 a.C.) e Hipócrates (400 d.C.) descreveram os efeitos benéficos do frio no controle local de hemorragias e na diminuição de edemas quando do tratamento de ferimentos (PODKONJAK, 1982). Cornelio Celso (25 d.C.) foi o primeiro a descrever lesões provocadas pelo frio, classificando-as desde graus leves até a gangrena. Galeno (70 d.C.) menciona a diminuição de sensibilidade dolorosa após o tratamento de lesões pelo frio, em seu manuscrito intitulado "Pain as a means of diagnostic" (MARQUES, 1989).

Em 1899, White descreveu a utilização do então recentemente desenvolvido "ar líquido" no tratamento de lesões superficiais de pele e de doenças dermatológicas como o lúpus, os epiteliomas e alguns cânceres (BAXTER, 1977; PODKONJAK, 1982). Allington (1950) utilizou zaragatoas embebidas em nitrogênio no tratamento de doenças de pele (SEIM, 1980). O primeiro aparelho capaz de conduzir o nitrogênio por uma sonda e propiciar o congelamento controlado de tecidos foi desenvolvido pelo médico Irving Cooper e pelo engenheiro Arnold Lee, o qual serviu de protótipo e deu origem aos equipamentos empregados até os dias atuais (KUFLIK *et al.*, 2000).

Entre 1961 e 1970, a criocirurgia foi utilizada em distintos tratamentos de diferentes especialidades, encontrando aplicação em ginecologia, neurologia, proctologia e ortopedia, dentre outras (RUBINSKY, 2000). Essa técnica foi,

provavelmente, a primeira pouco invasiva para o tratamento de tecidos neoplásicos, fato este que propiciou seu grande desenvolvimento na década de 1960. Entretanto, esta mesma natureza pouco invasiva criou obstáculos para o preciso controle deste procedimento, principalmente quando aplicado em lesões de grandes dimensões ou em órgãos internos. Esta falta de precisão foi decisiva para o decréscimo da sua utilização e substituição por outras técnicas, na década de 1980, restringindo, novamente, o seu emprego à dermatologia e à ginecologia. Porém, na década de 1990, o avanço de modelos matemáticos e o desenvolvimento de técnicas de imagem, como a ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, propiciaram o "renascimento" e novas indicações para a aplicação do frio na medicina (SANDISON, 2002; BUTTS *et al.*, 2003; ESCUDERO *et al.*, 2003).

Comparando os relatos do emprego da criocirurgia na medicina veterinária com aqueles da medicina humana, pode-se verificar que até meados deste século eram raros os trabalhos relativos ao emprego de agentes criógenos em lesões evidenciadas em animais. O trabalho pioneiro foi de Openchowski, em 1883, que realizou estudos de fisiologia utilizando-se do congelamento localizado na região do córtex cerebral de cães. Balthasar, em 1957, desenvolveu estudo semelhante em cérebros de gatos, concluindo que o frio seria um excelente método para produzir necrose tecidual aliando-se a esta observação à baixa ocorrência de hemorragia (PODKONJAK, 1982; MARQUES, 1989). Em 1975, Farrell tratou, pela primeira vez, um caso de sarcóide equino com gelo seco (PODKONJAK, 1982). Na década de 1970, veterinários ingleses e americanos, passaram a publicar trabalhos, retratando a experiência obtida, em animais de guarda e companhia (GREINER *et al.*, 1975).

3.3.2 Mecanismos de morte celular induzida pelo frio (crionecrose)

A crionecrose é a lesão celular direta, que ocorre em resposta à exposição à temperatura negativa extrema. A célula desidrata e ocorre alta concentração dos solutos que causam danos à membrana celular e às enzimas e proteínas intracelulares. Outro mecanismo é a injúria vascular, porque com o congelamento ocorre estase vascular, principalmente na microcirculação. Como resultado há isquemia com posterior necrose tissular (NISHIDA *et al.*, 2011). A ocorrência da crionecrose pode ser classificada de acordo com o tempo em fase imediata, retardada e tardia (SEIM, 1980).

A **fase imediata** ocorre ainda durante o ciclo de congelamento/ descongelamento, no qual as células são destruídas instantaneamente em decorrência de quatro eventos simultâneos (CASTRO *et al.*, 2013).

O primeiro evento ocorre com o congelamento da água contida nos tecidos, especialmente a água intersticial livre, que forma cristais extracelulares. Dessa forma se produz um ambiente hiperosmolar, fazendo com que a água do meio intracelular seja deslocada para o meio extracelular, o que conduz a desidratação celular e a concentração tóxica de eletrólitos, que causam um dano irreparável à célula (SEIM, 1980; GAGE & BAUST, 1998; HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

O segundo evento é a formação de cristais de gelo, intra ou extracelular, dependendo do ciclo, ou seja, da velocidade com que o tecido é congelado e, em seguida, descongelado. O congelamento lento produz grandes cristais principalmente no meio extracelular, onde são menos letais, mas provocam desequilíbrio osmótico. Para manter o equilíbrio, a célula acaba perdendo água para o interstício, o que conduz a uma concentração de eletrólitos dentro das células e uma série de alterações. À medida que esta concentração vai aumentando, maior será a morte celular (SEIM, 1980; GAGE & BAUST, 1998; HOFFMANN & BISCHOF, 2002). Entretanto, quando o congelamento ocorre rapidamente, a célula não é capaz de perder água para o meio externo para manter o equilíbrio, formando-se então, cristais intracelulares. Se na sequência ocorrer um descongelamento lento, os pequenos cristais inicialmente inócuos se transformarão em grandes cristais, causando ruptura de organelas e membranas, levando à morte celular (GREINER *et al.*, 1975; NISHIDA *et al.*, 2011). Caso o descongelamento ocorra rapidamente, os pequenos cristais irão apenas derreter (HOFFMANN & BISCHOF, 2002). Portanto, pode-se dizer que maior será a destruição celular quando o ciclo for de congelamento rápido seguido de descongelamento lento (SEIM, 1980).

O terceiro evento é a desnaturação de proteínas, a partir de complexos lipoproteicos das membranas celulares, que têm ligações instáveis e sensíveis às mudanças físicas causadas pelo congelamento, o que desencadeia dano e destruição das membranas celulares. A perda de fosfolipídio aumenta a permeabilidade da membrana celular, leva ao aumento no volume e posterior lise, podendo ocorrer tanto durante o congelamento quanto no descongelamento (GAGE & BAUST, 1998). Todas as membranas de uma célula, como as das mitocôndrias, microssomas e núcleo sofrem danos pelo congelamento, devido à desnaturação dos complexos lipoproteicos. Além

disso, as alterações eletrolíticas que ocorrem durante o congelamento causam danos às proteínas e aos sistemas enzimáticos (NISHIDA *et al.*, 2011).

O quarto evento é o choque térmico, que se refere à lesão celular causada pela mudança brusca de temperatura, independente dos efeitos diretos do congelamento. Supõe-se, que o choque térmico aconteça pela variação da capacidade de expansão das membranas dos vários componentes celulares, que se rompem durante essa mudança de temperatura (SEIM, 1980; NISHIDA *et al.*, 2011).

A **fase retardada** ocorre algumas horas após o fim do ciclo, na área de exposição ao agente criógeno. É caracterizada pelos efeitos da estase vascular, sendo muito estudada em lesões cutâneas causadas pela neve. A principal alteração que ocorre nessa fase é a aglutinação, tamponamento e aderência de células vermelhas entre si e à parede do vaso. Como resultado da estase vascular ocorre trombose e isquemia, seguidas de hipóxia ou até mesmo anóxia, mudança de pH e morte celular (GAGE & BAUST, 1998; HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

A anóxia celular consequente da perda de circulação é considerada o principal mecanismo de lesão na criocirurgia. Após o descongelamento dos tecidos, a estase microcirculatória se desenvolve rapidamente. A resposta inicial à refrigeração do tecido é a vasoconstrição, redução e até interrupção do fluxo sanguíneo, quando o congelamento é completo (GAGE & BAUST, 1998; NISHIDA *et al.*, 2011).

Durante o descongelamento, quando a temperatura se aproxima de 0ºC, há o retorno da circulação, nessa fase com vasodilatação, hiperemia e aumento da permeabilidade vascular, o que causa um edema que progride por algumas horas. Ocorre, na sequência, lesão na junção endotelial pela destruição celular e distensão vascular provocada pelo congelamento e liberação de radicais livres no momento da reperfusão tecidual. Como os tecidos ficam privados de sangue durante o congelamento, as células liberam fatores vasoativos após o descongelamento, causando vasodilatação e reperfusão tecidual. As lesões endoteliais além de agravarem o aumento da permeabilidade e edema já presentes, provocam agregação plaquetária, formando microtrombos e consequente interrupção da circulação em, aproximadamente, 30-35 minutos a contar do descongelamento. A perda de suprimento sanguíneo priva o tecido de qualquer possibilidade de vida, resultando em necrose uniforme, exceto na periferia da área submetida ao congelamento (HOFFMANN & BISCHOF, 2002; NISHIDA *et al.*, 2011).

Após 30 minutos de submissão à temperatura de 20ºC negativos toda a circulação se encontra interrompida, havendo trombose completa dos vasos, com sinais de necrose isquêmica do tecido adjacente. A área deficientemente perfundida é sempre menor que a área congelada e será ainda menor se próximo a ela estiver situada uma grande artéria (MARQUES, 1989). Histologicamente, todo este processo assemelha-se a um infarto, havendo uma tênue linha de divisão entre o tecido normal e aquele congelado. Apenas a microcirculação é comprometida, as grandes artérias manterão sua função mesmo após o seu congelamento (WITHROW *et al.*, 1975).

A **fase tardia** ou imunológica é de especial interesse no tratamento de neoplasias malignas. Este fenômeno ocorre devido à formação de anticorpos antineoplásicos, resultantes da criocirurgia, o que alteraria a constituição antigênica celular. De acordo com esta hipótese, após a criocirurgia, o sistema imune seria sensibilizado pelo tecido destruído e estimulado a combater células remanescentes, que não foram totalmente destruídas pelo procedimento criocirúrgico (SEIM, 1980; GAGE & BAUST, 1998; KUFLIK *et al.*, 2000; RUBINSKY, 2000; HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

Neel *et al.* (1971) verificaram que a resposta imunológica à tumores multifocais é maior após a destruição de um tumor "*in situ*" por congelamento, do que quando removido por excisão cirúrgica. Isso ocorreria porque a crionecrose liberaria, nas circulações sanguínea e linfática, antígenos localizados nos tumores e provocaria uma resposta imunológica mais específica. Dawber (2002) e Tanaka *et al.* (2001) observaram a diminuição na ocorrência de metástases à distância. Hoffmann & Bischof (2002) descreveram a respeito do efeito deletério da hipotermia na periferia da lesão criotratada, provocando aumento da apoptose e destruindo, assim, clones de células neoplásicas.

Nem todas as células de uma determinada área, submetida à criocirurgia, são destruídas em um único ciclo de congelamento/descongelamento. Para que se tenha mais êxito nesses procedimentos, deve-se levar em consideração alguns pontos tais como: criógeno utilizado, equipamento e técnicas de aplicação, duração e temperatura do congelamento, relação entre os tempos de congelamento e descongelamento, número de ciclos e fatores intrínsecos ao próprio paciente (LUCAS, 2004).

3.3.3 Agentes criógenos

Os agentes criógenos são gases que podem ser convertidos ao estado líquido e têm a capacidade de extrair calor de tecidos vivos. Diferentes gases atingem distintas temperaturas e pontos de ebulição e essas características ditam sua adequação ao uso na criocirurgia, pois o tecido alvo deve chegar rapidamente a no mínimo -20ºC (GREINER *et al.*, 1975; BOJRAB, 1978). Os criógenos mais frequentemente utilizados são o nitrogênio líquido e o argônio. O óxido nitroso, dióxido de carbono, “freons”, oxigênio e propano líquido, são substâncias que foram gradativamente abandonadas por atingirem temperaturas pouco agressivas ou, ainda, por apresentarem um risco potencial durante a manipulação (GREINER *et al.*, 1975).

O nitrogênio líquido é, dentre os agentes criógenos, o de escolha na criocirurgia, pois atinge a temperatura de -195,8ºC e é efetivo tanto em lesões benignas quanto malignas. Ele é incolor, inodoro, não inflamável, atóxico e inerte e, embora seja extremamente potente, é considerado seguro à manipulação, desde que sejam tomadas precauções básicas. Comparado aos outros agentes, é o mais barato, tem a maior capacidade de penetração e promove um congelamento rápido (BOJRAB, 1978; DAWBER, 1999).

3.3.4 Equipamentos e técnicas

O nitrogênio líquido pode ser aplicado através de *spray*, por sondas abertas ou fechadas e, menos frequentemente, por *swabs* e derramamento direto na lesão. Cada uma das técnicas é mais apropriada para uma determinada lesão; porém, há lesões que podem ser tratadas por mais de uma técnica, em função da preferência pessoal e da experiência do profissional (LUCAS, 2004). A escolha da forma de aplicação é feita através da avaliação da lesão, porém na rotina clínica, o *spray* tem sido o mais comumente utilizado, devido a sua praticidade e por apresentar taxas de sucesso tanto em lesões benignas quanto malignas (QUEIROZ *et al.*, 2008).

Na aplicação através de *spray*, o nitrogênio líquido quando confinado em recipiente fechado, tem sua pressão aumentada, e tende a buscar a abertura existente (LANE, 1974; GREINER *et al.*, 1975; WITHROW *et al.*, 1975; GOLDSTEIN & HESS, 1977). A velocidade de saída do nitrogênio é controlada por um gatilho e, o gás é liberado através de uma cânula, onde são acopladas as ponteiras com diferentes

diâmetros. A pressão do jato é inversamente proporcional ao diâmetro do orifício de saída (DAWBER, 2002). Esse método possibilita o tratamento de lesões planas, em relevo ou pedunculadas, com aplicação no ponto médio da lesão (LUCAS & LARSSON, 2007); de lesões lineares, nas quais se faz um movimento de vai-e-vem; ou, de lesões geográficas, onde a aplicação é de modo circular ou em movimentos em espiral (DAWBER, 1999).

O emprego do *spray* inclui-se no chamado sistema aberto, quando o jato é direcionado para a lesão sem nenhum aparato para contê-lo. Pode ser chamado de confinado, quando se utiliza algum utensílio para direcionar o jato ou para se controlar o diâmetro do congelamento (por exemplo, ponteiras de cone confinado ou cones de neoprene). Denomina-se sistema fechado quando se recorre a cilindros fechados, em uma das extremidades, denominados de sondas (LUCAS & LARSSON, 2007; CASTRO *et al.*, 2013).

3.3.5 Tratamento criocirúrgico

À temperatura de no mínimo -20ºC, por pelo menos um minuto, todos os tecidos vivos sofrem crionecrose. Porém, quanto mais longo for o período do congelamento, maior será a extensão de área necrosada. Deve-se levar em consideração que se desejam temperaturas mais baixas em regiões onde não existam estruturas importantes próximas à lesão que se pretende congelar (LANE, 1974; GREINER *et al.*, 1975; GOLDSTEIN & HESS, 1977; PODKONJAK, 1982; WITHROW, 1989).

Segundo Goldstein & Hess (1977), a temperatura ideal a ser alcançada é de pelo menos 25ºC negativos, para que se obtenha crionecrose adequada. Todavia, é muito difícil precisar uma única temperatura como aquela ideal, já que o congelamento se dá em distintas temperaturas em função do tecido considerado, principalmente em função do teor hídrico. Assim, os osteócitos são destruídos a uma temperatura de 0ºC; células do epitélio tegumentar e das glândulas de mucosas são destruídas a -10ºC; e, os melanócitos são destruídos numa faixa térmica de -3ºC a -14ºC (GAGE & BAUST, 1998). Considera-se que a temperatura de -50ºC é aquela ideal para tratamento de neoplasias malignas (ZACARIAN, 1985; GILBERT *et al.*, 1997).

Os melanócitos são células de grande sensibilidade, mesmo em um tempo curto de congelamento com nitrogênio líquido, o que resulta em alterações na cor da pele. São as células mais sensíveis ao frio, seguidas, em ordem decrescente, por células epiteliais,

do estroma fibroso, das grandes artérias, dos nervos, de cartilagens e do tecido ósseo (DAWBER, 1999). As células e os tecidos com grande conteúdo de água são mais sensíveis ao congelamento do que aqueles com menos (tendões e ossos). Os tecidos neoplásicos possuem mais água do que os normais (HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

De acordo com Greiner *et al.* (1975), o tempo ideal para o descongelamento é de 20 a 30 minutos, mas Seim (1980) definiu que o descongelamento lento deve ocorrer naturalmente à temperatura ambiente. Não há um consenso entre os autores sobre o tempo em que o tecido deve permanecer congelado, variando de 30 segundos a 20 minutos (KUFLIK, 2004). Quando os procedimentos estão relacionados a tratamentos de dermatopatias neoplásicas, hiperplásicas e degenerativas raramente os tempos ultrapassam 90 segundos (DAWBER, 2002; LUCAS & LARSSON, 2002; KUFLIK, 2004). Porém, para o tratamento de neoplasias em órgãos internos como fígado, pâncreas, próstata e ossos, os tempos necessários para o congelamento podem variar de 5 a 40 minutos (SILVERMAN *et al.*, 2000; KORPAN, 2001).

Dawber (2002) sugeriu dividir o tempo de aplicação recomendado para a lesão, entre o necessário para se atingir o halo desejado e o resto do tempo para mantê-lo. Assim, uma lesão que deve ser congelada por 60 segundos, o tempo pode ser dividido da seguinte forma: de 10 a 15 segundos para se atingir o halo desejado e, os 45 a 50 segundos restantes para manter o halo de congelamento. Da mesma maneira, para se determinar o tempo ideal de descongelamento total, sugere-se que este deve ser igual ou maior a duas vezes o tempo de congelamento total (TDT $\geq$ 2 x TCT) (DAWBER, 2002; KUFLIK, 2004; LUCAS & LARSSON, 2007).

De modo geral, são necessários dois ciclos para se atingir uma maior taxa de mortalidade celular, pelo aumento da condutividade térmica em tecidos já congelados. Nos casos em que não há risco de perda de estruturas vitais ou em neoplasias malignas, no mínimo dois ciclos devem ser realizados e, em lesões benignas, até dois ciclos são suficientes (SEIM, 1980; GAGE & BAUST, 1998; HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

3.3.6 Indicações terapêuticas

Devido ao seu caráter destrutivo, a criocirurgia tem sido utilizada para o tratamento de diferentes enfermidades de sistemas ou órgãos. Historicamente, há uma maior indicação para o sistema tegumentar, devido à facilidade de aplicação por equipamentos e métodos simples. Dawber (2002) indicou o procedimento para mais de

sessenta tipos de lesões dermatológicas inflamatórias ou neoplásicas, além de mais de quinze indicações para neoplasias malignas. Kuflik (2004) também recomendou a criocirurgia para mais de quarenta tipos de dermatopatias. Todos os autores que se utilizam desta metodologia de tratamento relatam o grande êxito em termos de resultados. No contexto da medicina veterinária a criocirurgia, igualmente, tem maiores possibilidades de emprego na dermatologia (LUCAS, 2004).

Contudo, com o avanço tecnológico houve o grande desenvolvimento da aplicação desta modalidade terapêutica em diferentes neoplasias, tanto em medicina veterinária como na medicina humana, de outros órgãos tais como a próstata, fígado, pâncreas, pulmão, linfonodos, bem como de diferentes tecidos (ósseo e nervoso), além do tratamento de casos recidivantes ou avançados de neoplasias genitais e da glândula mamária (HOFFMANN & BISCHOF, 2002; BUTTS *et al.*, 2003; ESCUDERO *et al.*, 2003).

3.3.7 Vantagens e desvantagens

As vantagens e desvantagens da criocirurgia são frequentemente apontadas por alguns autores. As principais vantagens incluem: rapidez da técnica quando comparada aos métodos tradicionais de excisão cirúrgica; segurança para pacientes debilitados e/ou idosos, principalmente; diminuição da dor em decorrência da destruição das terminações nervosas; presença de poucos sangramentos ou até ausência de hemorragias; tratamento múltiplo, pois enquanto se espera o descongelamento de uma lesão pode-se congelar outra; acessibilidade em lesões orais, interdigitais, retais e perianais, que são locais com restrição de acesso; custo baixo do tratamento e facilidade da técnica quando comparada à cirurgia tradicional. São descritas como principais desvantagens: custo inicial do equipamento; evaporação do agente criógeno; efeito estético indesejável no pós-cirúrgico a curto e médio prazo, em virtude da ocorrência de crostas hemorrágicas, necrose e odor exalado que se sucedem, e despigmentação da área que sofreu a criocirurgia, resultando em insatisfação dos proprietários (LUCAS & LARSSON, 2007).

3.3.8 Complicações e sequelas

O procedimento criocirúrgico pode provocar alterações transitórias ou definitivas na região exposta à crioterapia. As complicações temporárias que podem ser observadas são: dor, eritema, edema, hemorragia após 60 a 120 minutos da aplicação, lesões vesicobolhosas, crosta, enfisema (que quando ocorre deve ser seguido pela interrupção do tratamento), lesões neurológicas, hiperpigmentação da periferia das lesões e fraturas patológicas. O nitrogênio pode invadir órgãos e cavidades, causando lesões severas ou mesmo a morte, como a embolia quando adentra grandes vasos, o pneumoperitônio em casos de fístulas perianais, e ruptura pulmonar quando do tratamento de carcinomas nasais. As complicações dermatológicas permanentes, chamadas de sequelas são: cicatriz e perda tecidual, leucodermia, leucotriquia e alopecia (LUCAS & LARSSON, 2007).

3.4 Agentes tópicos na cicatrização de feridas

Os processos de cicatrização e reparo tecidual ocorrem após trauma ou doença. Embora a reparação tecidual seja um processo sistêmico, é necessário favorecer condições locais através de terapia tópica adequada para otimizar o processo fisiológico (COELHO *et al.*, 2010).

Há diversos produtos disponíveis para utilização em queimaduras provocadas pelo calor excessivo como os agentes tópicos (soluções, pomadas, cremes e produtos naturais), entre os quais se destacam a sulfadiazina de prata, a própolis, os ácidos graxos essenciais e a calêndula (FERREIRA *et al.*, 2003).

3.4.1 Sulfadiazina de prata

A sulfadiazina de prata é um dos agentes tópicos mais utilizados no tratamento de queimaduras, sendo recomendada em queimaduras de segundo e terceiro grau. É um composto de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio, efetivo contra uma ampla microbiota de gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de incluir bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e também *Candida albicans* (WARD & SAFLLE, 1995).

Há consenso na literatura quanto à utilização da sulfadiazina de prata 1% para o tratamento de queimaduras, com a finalidade de debridar tecidos necrosados e combater infecção local. É facilmente aplicada e removida, não provoca dor e apresenta poucos efeitos colaterais (WARD & SAFLLE, 1995). De acordo com Hedlund (2005), esse agente consegue penetrar em tecidos necrosados e potencializar a epitelização de ferimentos, sendo indicada sua aplicação em ulceração por frio.

Depois de uma queimadura grave, a superfície ferida torna-se vulnerável às bactérias, devido à perda da barreira protetora. Níveis elevados de bactérias em um ferimento podem diminuir a disponibilidade de fatores de crescimento e, assim, retardar o processo de cura. Dessa forma, a entrega de antibióticos localmente como um método de tratamento adjuvante a administração sistêmica pode reduzir a concentração sérica total de antibióticos e aumentar a concentração local para um nível bactericida. Entre os antibióticos tópicos, a sulfadiazina de prata apresenta boa tolerabilidade por parte do paciente, tem baixa toxicidade, boa penetração no tecido lesado e um amplo espectro de atividade contra a maior parte dos microorganismos, em particular os gram-negativos. Por essas razões, a sulfadiazina de prata representa o antimicrobiano tópico de escolha no tratamento de queimaduras, estando disponível, normalmente, como um creme na concentração de 1% (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Esse agente tópico deve ser aplicado duas vezes ao dia em razão da oxidação da prata. Entretanto, segundo Ferreira *et al.* (2003), em humanos, há dificuldades para atender a essa recomendação, quando a sulfadiazina de prata 1% é utilizada em curativos oclusivos, em função do trauma físico e emocional que cada curativo provoca ao paciente e do alto custo dos recursos utilizados. No momento da troca a pomada pode apresentar aspecto purulento devido a sua oxidação sem, contudo, apresentar infecção real. O Dermazine® e Pratazine® são exemplos comerciais (FRANCO & GONÇALVES, 2008).

3.4.2 Própolis

Uma ampla variedade de produtos naturais tem sido utilizada no tratamento de feridas pela facilidade de utilização, inocuidade, baixo custo e poder bactericida ou bacteriostático. Entre eles destaca-se a própolis, constituída basicamente de resinas e bálsamo, cera de abelha, óleos voláteis e pólen (DAMYANLIEV *et al.*, 1982).

Os flavonoides são considerados os principais compostos responsáveis pelos efeitos benéficos da própolis. São definidos como compostos fenólicos provenientes de plantas, que agem em diferentes processos fisiológicos, atuando na ação e absorção de vitaminas, nos processos de cicatrização como antioxidantes e exercendo função antimicrobiana e moduladora do sistema imune (PERUCHI *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2006).

Atualmente, questiona-se a ação da própolis na regeneração e na granulação dos tecidos. Nesta perspectiva, a própolis é sugerida como produto que favorece a cicatrização, além de sua propriedade antibiótica natural desprovida de efeitos colaterais, o que não acontece com os antibióticos sintéticos. Apresenta, também, baixo custo em relação às coberturas utilizadas frequentemente, tornando-se acessível à população (BARBOSA *et al.*, 2009).

Sutta *et al.* (1974) utilizaram solução alcoólica de própolis no tratamento de feridas em animais domésticos, tanto em casos clínicos como experimentais. Esses pesquisadores observaram seu bom efeito epitelizante, considerando-a adequada para o tratamento de feridas após a eliminação da infecção. Damyanliev *et al.* (1982) aplicaram solução tópica de própolis 20% e 30% em pacientes com feridas infeccionadas. Foi observado que a cicatrização ocorria dentro de um período de tempo menor do que as tratadas com solução cloreto de sódio 0,9%. Essas preparações de própolis exerceram efeito antimicrobiano "in vivo" sobre *Bacterium coli*, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*

Ao comparar a cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos a partir do uso de solução alcoólica de própolis a 10% e a 30%, constatou-se que ambas estimularam a reparação tecidual, ocorrendo uma acentuada neovascularização, seguida de rápida regeneração do tecido, embora o resultado das lesões tratadas com solução a 30% fosse mais lento (PERUCHI *et al.*, 2001).

Em relação à atuação terapêutica da própolis na cicatrização das lesões, os estudos mostraram resultados positivos, com ação antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica e de neoangiogênese (BARBOSA *et al.*, 2009).

3.4.3 Ácidos graxos essenciais

A partir da década de 1970, foram realizados estudos demonstrando os efeitos dos ácidos graxos sobre a resposta imune. Existem diversos tipos de ácidos graxos, mas

em relação ao tratamento de feridas, o ácido linoléico e o ácido linolênico são os mais importantes, pois não podem ser sintetizados pelos mamíferos, por esses não possuírem a enzima delta 9-dessaturase, sendo assim chamados de ácidos graxos essenciais (AGE) (FERREIRA *et al.*, 2012).

Os AGE são precursores de substâncias farmacologicamente ativas envolvidas no processo de divisão celular e diferenciação epidérmica. Possuem a capacidade de modificar reações inflamatórias e imunológicas, alterando funções leucocitárias e acelerando o processo de granulação tecidual (FERREIRA *et al.*, 2003; HATANAKA & CURI, 2007).

Dentre as diversas opções para tratamento de queimaduras observa-se a recomendação da utilização dos ácidos graxos essenciais, que podem conter um ou os dois AGE, acrescidos de outras substâncias, tais como a vitamina A e E e a lecitina de soja, ou integrar formulações de triglicérides de cadeia média (TCM). Os TCM são úteis como fonte nutricional, solvente, veículo e estabilizador de produtos a serem administrados por via oral, tópica ou parenteral (FERREIRA *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos essenciais promovem a quimiotaxia (atração de leucócitos) e a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), mantêm o meio úmido, aceleram o processo de granulação tecidual, facilitam a entrada de fatores de crescimento, promovem mitose e proliferação celular, atuam sobre a membrana celular, aumentando a sua permeabilidade, auxiliam o debridamento autolítico e são bactericidas para *Staphylococcus aureus* (MANDELBAUM *et al.*, 2003). O ácido linoléico é importante no transporte de gorduras, manutenção da função e integridade das membranas celulares e age como imunógeno local. As vitaminas A e E possuem propriedades antioxidantes e protegem a membrana celular do ataque de radicais livres. A lecitina de soja, além de ser um agente de proteção, proporciona a manutenção da hidratação dos tecidos e ajuda no processo de cicatrização da pele (HAMÚ *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2012).

A aplicação em pele íntegra tem grande absorção, formando uma película protetora na pele, prevenindo escoriações devido à alta capacidade de hidratação e proporcionando nutrição celular local. Podem ser utilizados diretamente sobre o leito da ferida ou embebidos em gases estéreis, devendo ser trocados no máximo a cada 24 horas (MARINHO, 1997). Além do tratamento de queimaduras, são indicados para todos os tipos de lesões, tais como úlceras por pressão, úlceras venosas de estase, feridas abertas superficiais com ou sem infecção e prevenção de úlceras por pressão. O

Agederm®, Ativoderme®, Dersani®, Curatec®, Repitelin®, Dermosan® são exemplos comerciais (FRANCO & GONÇALVES, 2008; FERREIRA *et al.*, 2012).

3.4.4 Calêndula

A calêndula (*Calendula officinalis*) é uma planta muito popular pelo seu uso em cosmética e dermatologia (DELLA LOGGIA *et al*., 1994). Cultivada por egípcios, gregos, hindus e árabes, a calêndula cresceu em jardins europeus e vem sendo utilizada medicinalmente desde o século XII. Como suas flores seguem o sol (abrem pela manhã e fecham ao anoitecer), foi relacionada ao signo astrológico do verão, leão, e utilizada para tratamento de queimaduras e outras condições patológicas causadas pelo calor (KEMPER, 1999).

Como fitoterápico, é indicada em casos de inflamações da pele e mucosas, queimaduras suaves, queimaduras do sol, escaras, avermelhamento de peles sensíveis e delicadas. Também, é recomendada no tratamento de feridas abertas purulentas e de difícil cicatrização. Como fitocosmético, é indicada no tratamento de acne, eczemas, abcessos e impetigo, além de ser usada na prevenção e tratamento de assaduras de crianças e como protetora dos raios UVA e UVB (TESKE & TRENTINI, 1995).

Della Loggia *et al.* (1994) demonstraram que a utilização da calêndula reduziu a inflamação induzida experimentalmente em camundongos. Em feridas cirúrgicas, provocadas experimentalmente em ratos, a aplicação da pomada contendo extrato de calêndula 5% acelerou significativamente a cicatrização (KLOUCHEK-POPOVA *et al.*, 1982). Patrick *et al.* (1996) descreveram a indução da vascularização usando extrato aquoso das flores de *Calendula officinalis*. Campos *et al.* (2000) avaliaram treze casos de feridas infectadas em cães, de diversas causas, tratadas com solução cloreto de sódio 0,9%, debridamento, aplicação tópica da pomada de calêndula e administração oral de *Calendula officinalis*, e observaram que a associação desses dois últimos beneficiou significativamente a cicatrização das feridas.

Aprovada pela comissão científica alemã como antisséptica e cicatrizante, o uso da calêndula no Brasil está regulamentado pela RE Nº 89/04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2004). Os extratos glicólicos são usados em formulações de pomadas e são obtidos por processo de sete dias de maceração ou percolação de uma erva em um solvente hidro-alcóolico, podendo ser este o propilenoglicol ou a glicerina (TESKE & TRENTINI, 1995).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados 40 ratos Wistar, linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, machos, hígidos, com quatro meses de idade, pesando em média 400-500g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas-RS. Os animais foram alojados em gaiolas retangulares de polipropileno, cada uma acomodando cinco animais, durante quinze dias, antes do início dos procedimentos, para aclimatação e quarentena na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA). A temperatura e a umidade relativa do ar foram controladas (22ºC ±2ºC e 55% ±5%, respectivamente). A alimentação fornecida era à base de ração comercial peletizada, específica para a espécie, e água *ad libitum*.

Após o período de adaptação, os animais foram separados aleatoriamente e mantidos nas mesmas gaiolas retangulares, porém individuais. A fim de minimizar o estresse provocado pelo isolamento e manipulações frequentes, era fornecido a eles, diariamente, porções de amendoim com casca, semente de girassol e papel toalha para estimular comportamentos naturais da espécie como descascar, rasgar e roer, contribuindo para seu enriquecimento ambiental e alimentar.

Os animais foram mantidos e manipulados segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde se encontra registrado sob o protocolo número 130376 (Anexo A).

4.2 Procedimento anestésico

Os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória, sendo utilizado como agente anestésico o isoflurano, vaporizado em oxigênio 100%, ao efeito, administrado através de máscara facial. A analgesia foi iniciada previamente a indução das lesões com cloridrato de tramadol (5 $mg.kg^{-1}$), por via intraperitoneal, sendo continuada no período pós-operatório a cada 12 horas, durante dois dias.

Com o animal sob anestesia geral inalatória, realizou-se a pesagem do mesmo e tricotomia ampla da região dorsal, desde o espaço compreendido entre as escápulas até o final das costelas. Após, procedeu-se a antissepsia de todo o campo cirúrgico com gliconato de clorexidina 2%.

Durante o período transoperatório, os animais foram monitorados pelo anestesista quanto às frequências cardíaca e respiratória, coloração das mucosas/superfícies digitais, resposta a estímulos dolorosos e temperatura corporal. Ao término do procedimento cirúrgico, foram observados até a completa recuperação anestésica, sendo então recolocados em suas gaiolas individualmente.

4.3 Procedimento cirúrgico

Com o animal sob anestesia geral inalatória e posicionado em decúbito esternal, delimitou-se, com o auxílio de uma régua, os locais de confecção das duas feridas na região dorsal em segmentos paralelos de pele, uma no antímero direito e outra no esquerdo, a 10 mm caudal da borda escapular e apresentando entre elas a distância de 20 mm (Figura 2).

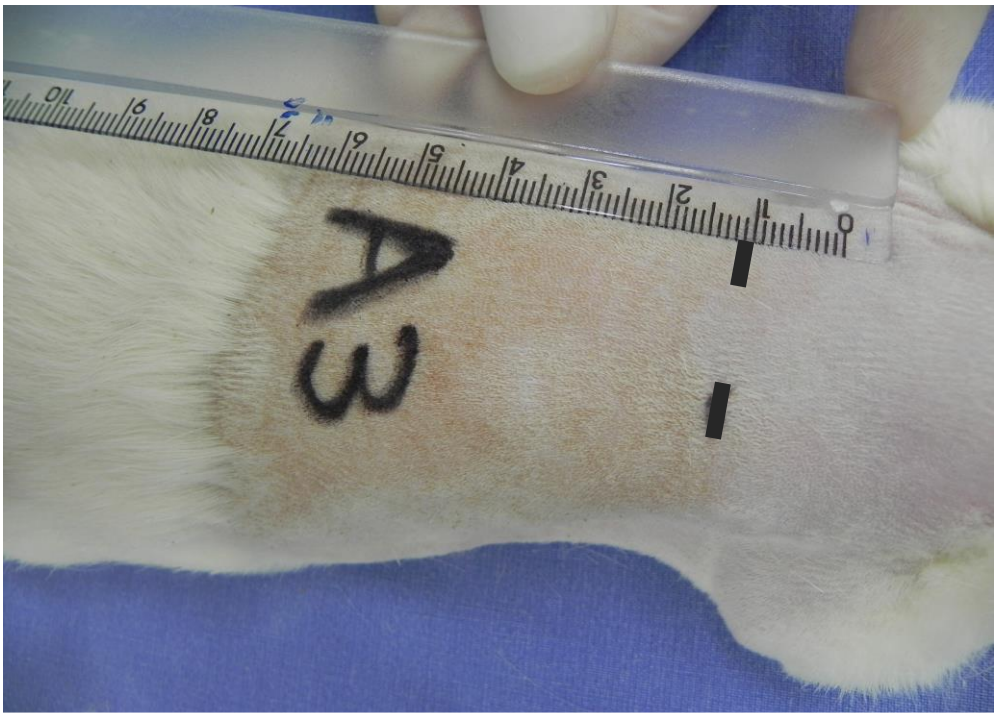

Figura 2 – Rato Wistar, decúbito ventral. Após tricotomia ampla do dorso, demarcação, com auxílio de uma régua, dos locais de indução das lesões, uma no antímero direito e outra no esquerdo, 10 mm caudalmente à borda escapular, mantendo uma distância de 20 mm entre elas.

As lesões foram induzidas pela aplicação de nitrogênio líquido com auxílio do aparelho de criocirurgia Package Cryogun® e a área das feridas foi delimitada através de um Cryocone® de 15 mm de diâmetro (Figura 3). Utilizou-se a técnica do *spray* aberto durante um minuto, em jato contínuo (15 segundos) até a formação do halo de gelo do diâmetro desejado e, após, jatos intermitentes a cada cinco segundos (totalizando 45 segundos) para a manutenção do congelamento e não extensão do halo de gelo (Figura 4). Esses tempos foram mensurados com o auxílio de um cronômetro digital e todos os dados anotados em uma ficha de controle cirúrgico (Apêndice A).

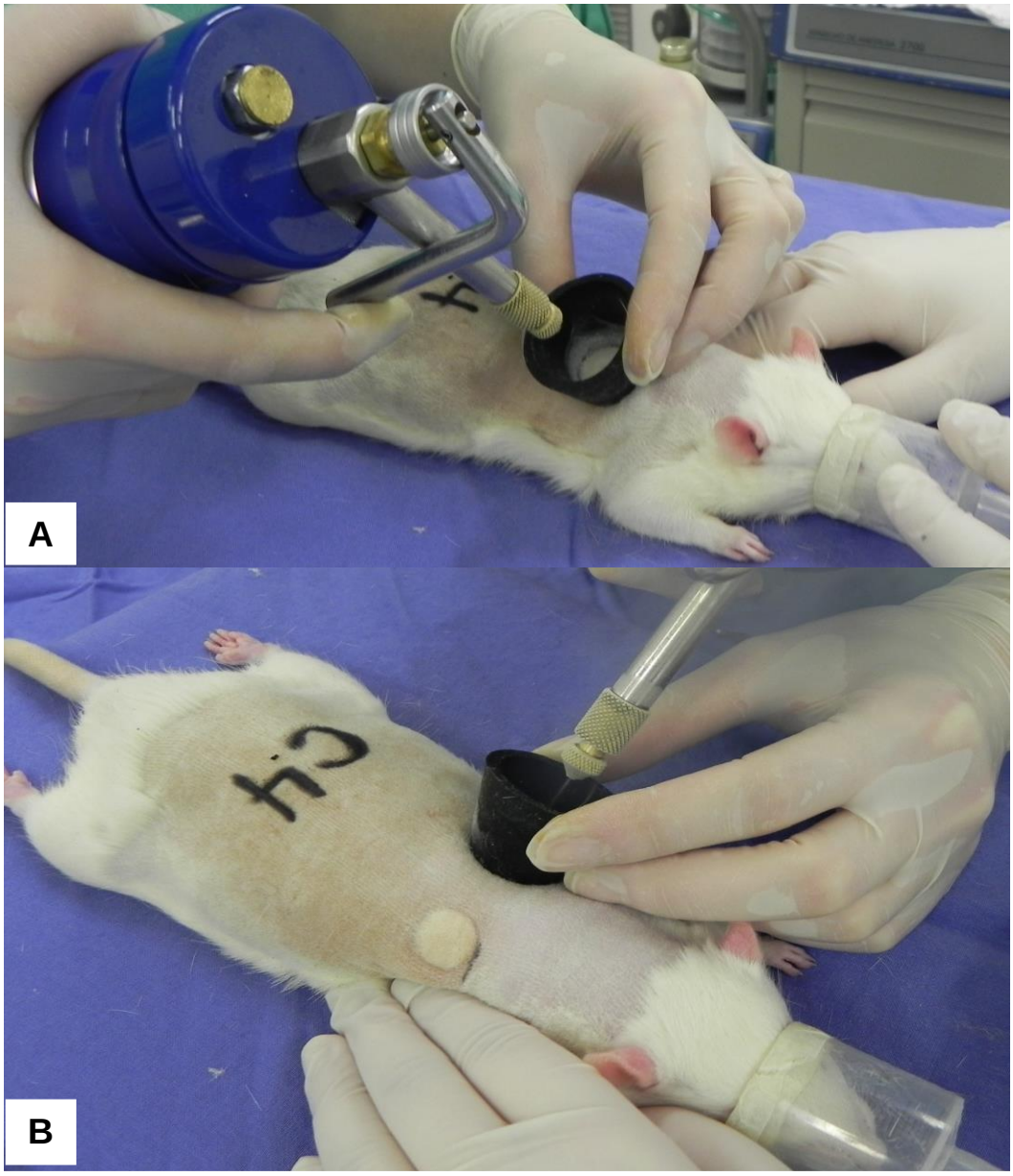

Figura 3 – Rato Wistar, decúbito ventral. Observa-se a indução das lesões, no dorso, pelo nitrogênio líquido com auxílio do aparelho de criocirurgia e delimitação do jato de *spray* através de um cone de neoprene de 15 mm. **A)** Indução da ferida no antímero direito. **B)** Indução da lesão no antímero esquerdo e descongelamento da ferida direita.

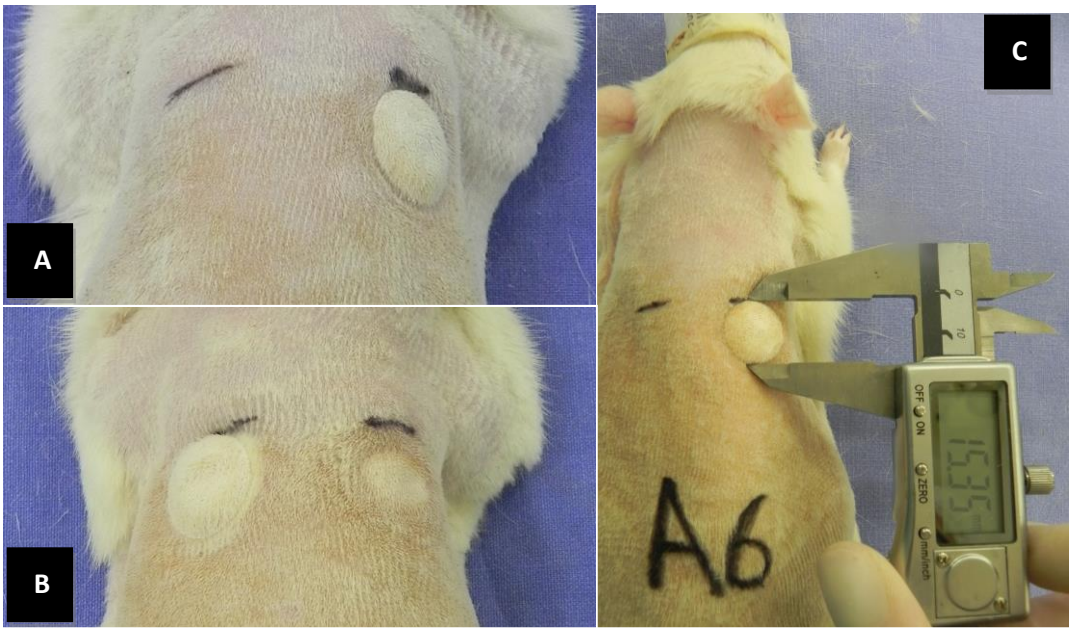

Figura 4 – Halo de gelo formado logo após o procedimento criocirúrgico. **A)** Halo de gelo no antímero direito. **B)** Halo de gelo no antímero esquerdo e descongelamento desse no lado direito. **C)** Mensuração com paquímetro digital do halo de gelo direito imediatamente após sua formação, antes de iniciar seu descongelamento.

4.4 Agentes da terapia tópica

As feridas confeccionadas receberam tratamentos diferentes, de acordo com o lado do animal a que pertenciam. A ferida direita recebeu o tratamento com os agentes tópicos escolhidos (sulfadiazina de prata, própolis, ácidos graxos essenciais e calêndula) ou apenas com o veículo da pomada (vaselina sólida), na dosagem de um grama de pomada em cada lesão, duas vezes ao dia. A ferida esquerda recebeu a limpeza com solução cloreto de sódio 0,9%, duas vezes ao dia, ou nenhum tratamento adicional após a indução da lesão. As lesões permaneceram abertas, não recebendo curativo oclusivo adicional, a fim de que esses não interferissem com a queda da crosta (crionecrose) causada pelo procedimento criocirúrgico.

As preparações com os agentes tópicos aplicados sobre as feridas diariamente foram provenientes de uma farmácia de manipulação, uma vez que todos os princípios ativos testados deveriam apresentar o mesmo veículo (vaselina sólida) (Figura 5) (Tabela 1). No momento dos tratamentos, fazia-se a mensuração da dosagem a ser aplicada de cada pomada com o auxílio de medidor de um grama.

Figura 5 – Agentes tópicos utilizados nos procedimentos terapêuticos diários. Sulfadiazina = Sulfadiazina de prata, Calêndula = Calêndula, AGE = Ácidos Graxos Essenciais, Própolis = Própolis, Vaselina = Vaselina sólida.

Tabela 1 – Composição das pomadas utilizadas com os respectivos princípios ativos.

Pomada	**Composição**
Vaselina	Vaselina sólida.....100g
Sulfadiazina de prata	Sulfadiazina de prata 1% Vaselina sólida.....qsp 100g
Própolis	Própolis 10% Vaselina sólida.....qsp 100g
Ácidos graxos essenciais	Ácido linoléico 10% Lecitina de soja 1% Vitamina A 0,5% Vitamina E 2% Óleo de girassol 3% TCM 10% Vaselina sólida.....qsp 100g
Calêndula	Extrato glicólico de calêndula 10% Vaselina sólida.....qsp 100g

4.5 Procedimentos terapêuticos

Os animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos, perfazendo um total de oito animais por grupo: grupo vaselina (V), grupo sulfadiazina de prata (S), grupo própolis (P), grupo ácidos graxos essenciais (A) e grupo calêndula (C) (Figura 6).

Grupo VASELINA (V): a ferida do lado direito recebeu, em seu leito e bordas, 1g de vaselina sólida (veículo das demais pomadas), duas vezes ao dia; a ferida do lado esquerdo recebeu, em quatro animais, apenas limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% **(SF)**, duas vezes ao dia, e nos outros quatro animais, nenhum tratamento adicional **(ST)**.

Grupo SULFADIAZINA DE PRATA (S): a ferida do lado direito recebeu, em seu leito e bordas, 1g de pomada sulfadiazina de prata 1%, duas vezes ao dia; a ferida do lado esquerdo recebeu, em quatro animais, apenas limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% **(SF)**, duas vezes ao dia, e nos outros quatro animais, nenhum tratamento adicional **(ST)**.

Grupo PRÓPOLIS (P): a ferida do lado direito recebeu, em seu leito e bordas, 1g de pomada própolis 10%, duas vezes ao dia; a ferida do lado esquerdo recebeu, em quatro animais, apenas limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% **(SF)**, duas vezes ao dia, e nos outros quatro animais, nenhum tratamento adicional **(ST)**.

Grupo ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS (A): a ferida do lado direito recebeu, em seu leito e bordas, 1g de pomada ácidos graxos essenciais, duas vezes ao dia; a ferida do lado esquerdo recebeu, em quatro animais, apenas limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% **(SF)**, duas vezes ao dia, e nos outros quatro animais, nenhum tratamento adicional **(ST)**.

Grupo CALÊNDULA (C): a ferida do lado direito recebeu, em seu leito e bordas, 1g de pomada calêndula 10%, duas vezes ao dia; a ferida do lado esquerdo recebeu, em quatro animais, apenas limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% **(SF)**, duas vezes ao dia, e nos outros quatro animais, nenhum tratamento adicional **(ST)**.

As feridas do antímero esquerdo foram divididas em outros dois grupos: **grupo SOLUÇÃO FISIOLÓGICA 0,9% (SF) e grupo SEM TRATAMENTO (ST)** para fins de avaliações macro e microscópicas e agrupamento dos dados para análises estatísticas.

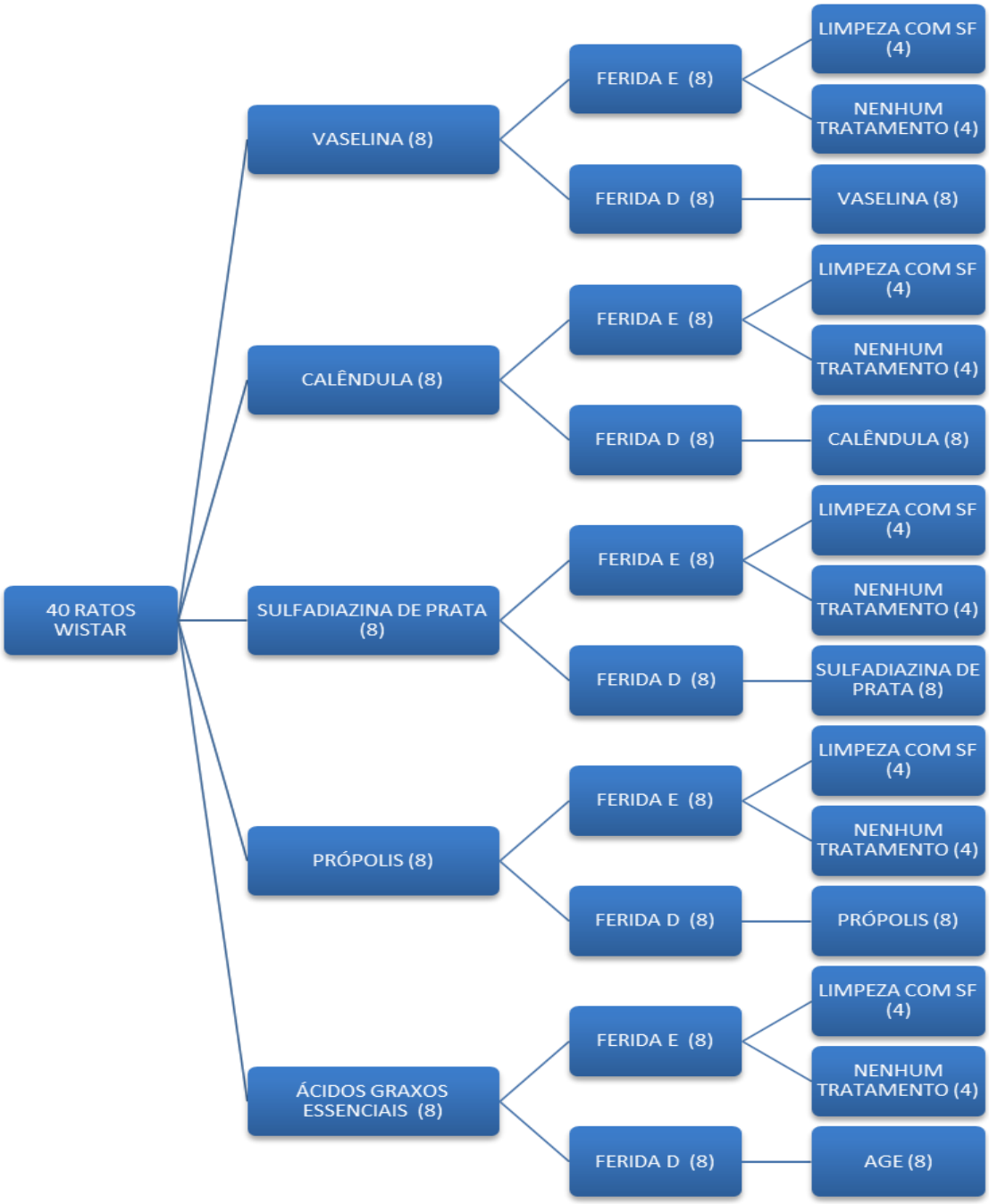

Figura 6 – Organograma do desenho experimental.

Imediatamente após a indução das lesões, tão logo ocorresse o descongelamento das mesmas, os animais começaram a receber os tratamentos de acordo com o grupo que compunham (Figura 7).

Figura 7 – Aplicação dos agentes tópicos nas feridas do antímero direito imediatamente após a indução das lesões pelo nitrogênio líquido. À esquerda, aplicação da vaselina sólida (V1). À direita, aplicação da pomada de calêndula (C1). Ao centro, aplicação da pomada de própolis (P4).

4.6 Avaliação macroscópica

Os animais foram avaliados, a cada dois dias, e os dados macroscópicos coletados através de uma ficha de parâmetros clínicos que incluía: formação de crosta (crionecrose), aspecto das bordas, queda da crosta, presença de tecido de granulação, sinais de dor local, sangramento, secreções, edema, eritema e prurido. Esses dados foram mensurados de acordo com sua gravidade (+ a +++). Essa avaliação foi utilizada como controle da evolução das feridas e possíveis alterações como contaminação, exsudação excessiva, autotraumatismo e sinais de dor no pós-operatório. O formulário de parâmetros clínicos foi desenvolvido por Garcez (2012) e adaptado para esse experimento (Apêndice B).

4.7 Avaliação morfométrica

As feridas foram mensuradas em duas direções, o maior comprimento (c = crânio-caudal) pela maior largura (l = látero-lateral), com o auxílio de um paquímetro digital nos dias zero, dois, quatro, seis, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28. A partir desses dados foi possível calcular a área da lesão em cada avaliação (A = c x l). A área de contração da ferida (C) foi calculada subtraindo-se a área inicial (A_1) determinada no dia zero (dia da indução da lesão), da medida da área da lesão obtida nos dias subsequentes de avaliação (A_0) (dois, quatro, seis, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26

e 28) de forma que $C = A_0 - A_1$. A taxa de contração cicatricial (TC) foi avaliada a partir dos resultados prévios, onde $TC = C \times 100/ A_1$.

Ainda, realizaram-se registros fotográficos durante as avaliações macroscópicas e mensurações das feridas, para posterior análise do aspecto clínico macroscópico das lesões.

4.8 Obtenção das amostras

Decorrido o período pré-estabelecido (28 dias), os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico descrito anteriormente. Em seguida, procedeu-se à remoção da área total das feridas, incluindo 2 mm além da interface entre o tecido sadio e a cicatriz em toda sua extensão, tanto do antímero direito quanto do esquerdo (Figura 8). Os fragmentos foram identificados quanto ao animal e ao lado a que pertenciam, fixados em solução neutra de formaldeído a 10% e, posteriormente, incluídos em parafina e processados de forma rotineira (Apêndice C). A confecção das lâminas ocorreu na Unidade de Patologia Experimental (UPE) do HCPA.

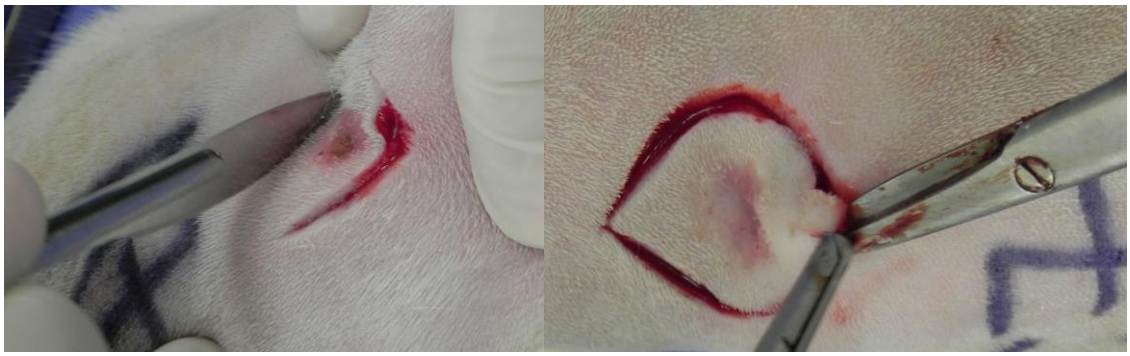

Figura 8 – Procedimento de biópsia das lesões cutâneas ou cicatrizes no 28º dia. À esquerda, incisão de pele com bisturi, demarcando a área total a ser biopsiada. À direita, dissecção do fragmento previamente delimitado com pinça e tesoura.

4.9 Método de eutanásia

Ao término do período de avaliação (28 dias), os animais foram eutanasiados através de sobredose anestésica com isoflurano até a promoção de parada cardiorespiratória e, após, confirmação com decapitação por guilhotina, conforme recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2013).

4.10 Avaliação microscópica

Os fragmentos biopsiados no 28º dia foram fixados em formol tamponado a 10% e, após 24 horas, as amostras foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Os cortes histológicos com espessura de 3-5 micrômetros foram corados pelas técnicas histoquímicas de Hematoxilina-Eosina (HE) (Anexo B), Tricômico de Masson (TM) (Anexo C) e Azul de Toluidina (AT) (Anexo D) e, pelas técnicas de imuno-histoquímica (Anexo E) com o anticorpo Ki-67 e Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) na UPE do HCPA.

As lâminas foram examinadas por um profissional qualificado que desconhecia a qual grupo pertencia cada amostra em análise. Foram utilizadas para essas avaliações variáveis categóricas, classificadas em: ausente, leve, moderada e intensa de acordo com cada uma das análises.

Na coloração HE foi avaliada a intensidade da reação inflamatória pela presença e densidade de células do infiltrado inflamatório (mononucleares e polimorfonucleares), sendo classificadas como ausente, leve, moderada e intensa.

Pela técnica do TM foi observada a porcentagem de colágeno tanto na derme superficial quanto profunda, considerando apenas a área da lesão. As amostras que continham até 33% de colágeno novo foram classificadas como leve para intensidade de deposição de colágeno; as que apresentavam de 34% a 67% de colágeno novo foram consideradas como moderada; e, as que evidenciaram de 68% a 100% foram categorizadas como intensa para intensidade de deposição de colágeno.

A coloração AT foi utilizada para avaliar a densidade de mastócitos na área da lesão. Para tanto, fez-se a contagem dos mastócitos, da derme superficial para a profunda, em 10 campos de grande aumento (cga) e após, realizou-se a média dos valores obtidos. Sendo a média obtida até o valor 3,1, a amostra era considerada como leve; se a média resultante ficasse entre os valores 3,2 e 6,3, a amostra era tida como moderada; e, se o valor obtido fosse acima de 6,4, era declarada como intensa para densidade de mastócitos.

Para analisar a proliferação celular na área da lesão, empregou-se a técnica de imuno-histoquímica com o anticorpo Ki-67, positivo em núcleos comprometidos a entrar em mitose. Efetuou-se a contagem das células marcadas na camada basal, apenas onde havia epitélio de revestimento (não se considerou as áreas de ulceração), em cinco

campos de grande aumento (cga) e, após, foi realizada a média dos valores obtidos. Classificaram-se as amostras com valor médio até 17,5 como leve; as que obtiveram média entre 17,6 e 35,1, como moderada; e, as amostras com valor superior a 35,2 como intensa para densidade de proliferação epitelial.

A observação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) foi através das técnicas de VEGF e HE. Para isso, procedeu-se à contagem em cinco campos de grande aumento (cga) através das duas técnicas e, após, obteve-se a média entre os dois valores resultantes. A contagem foi realizada tanto na derme superficial quanto profunda e, somente foram contabilizadas as estruturas de que se tinha absoluta certeza que se tratavam de vasos sanguíneos, seja pela conformação que apresentavam ou pela presença de hemácias no seu interior. As amostras com valor médio até 43,4 foram classificadas como leve para densidade de neovascularização; as que apresentaram média entre 43,5 e 73,4, como moderada; e, as amostras com valor superior a 73,5 como intensa para densidade de novos vasos sanguíneos.

Os valores de corte das categorias (leve, moderada e intensa) em cada uma das avaliações microscópicas acima descritas foram obtidos considerando-se o valor máximo evidenciado em cada análise (porcentagem ou valor médio) e dividindo-o em três intervalos iguais.

4.11 Análise estatística

Após a tabulação dos dados obtidos na macroscopia, foi utilizada a metodologia de modelos de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE), que incorpora a estimativa dos dados provenientes da mesma unidade experimental ao longo do tempo (medidas repetidas), podendo-se estimar a forma pela qual esses dados se correlacionam ao longo do tempo através de interações entre as variáveis consideradas.

Para a análise dos dados resultantes das avaliações microscópicas relacionados à histopatologia e imuno-histoquímica, foi utilizado o Teste Exato de Fisher, uma variação do teste não paramétrico Qui-Quadrado para medidas mais exatas. Para ambos os testes considerou-se um nível de significância de 5% ($p<0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 O animal experimental

O animal experimental adotado para esse estudo (ratos Wistar, *Rattus norvegicus*) mostrou-se adequado para o cumprimento de todos os objetivos aos quais foi desafiado. As etapas anestésicas e cirúrgicas transcorreram sem intercorrências. Esse animal permitiu, ainda, a padronização das feridas e a redução do número de animais necessários, pois possibilitou a indução de duas lesões simétricas paralelas.

5.2 Procedimento anestésico

O protocolo anestésico empregado foi adequado para as necessidades inerentes à intervenção cirúrgica proposta, ou seja, rápida, não cruenta e de baixo nível álgico. A recuperação pós-operatória dos animais após a suspensão do anestésico inalatório foi satisfatória, assim como a analgesia, podendo-se constatar o retorno às suas atividades normais (alimentação, deambulação, exploração do ambiente, entre outras) logo que retornavam para o alojamento. O procedimento anestésico levou entre oito e 11 minutos.

5.3 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi considerado de fácil execução e rápido, levando entre três e cinco minutos (para a realização das duas feridas por animal). O tempo de indução de cada lesão através do *spray* de nitrogênio líquido foi de exatamente um minuto, dividido em 15 segundos de jato contínuo e 45 segundos de jatos intermitentes (a cada cinco segundos). O tempo de descongelamento das feridas variou entre dois e quatro minutos. Tal procedimento foi bem tolerado pelos animais, os quais permaneceram com aspecto saudável durante todo o período experimental.

Apenas uma ferida necessitou ser descartada devido a um problema na manipulação do aparelho de criocirurgia, o qual provocou um congelamento excessivo da superfície cutânea do animal e, consequentemente, aumento do tamanho da lesão.

5.4 Aplicação dos agentes tópicos

A manipulação dos animais para a aplicação dos agentes propostos: vaselina sólida, sulfadiazina de prata, própolis, ácidos graxos essenciais e calêndula, bem como a limpeza das lesões com solução cloreto de sódio 0,9% foi realizada sem apresentar dificuldades, duas vezes ao dia, durante os 28 dias de experimento. Os animais se mostraram dóceis em todo o período, facilitando seu manejo ao longo do estudo.

No intuito de enriquecer o ambiente e evitar o estresse pelo isolamento, os animais receberam, após cada aplicação, toalha de papel, amendoim torrado com casca e semente de girassol. Esses objetos de exploração e entretenimento minimizaram o comportamento de coçar e lamber, através dos quais poderiam remover os agentes tópicos. As grades das gaiolas também permaneceram viradas do lado oposto, ou seja, não completamente encaixadas, de tal forma que os animais não pudessem retirar os agentes tópicos ao se movimentar e raspar com o dorso nas grades. Essa conduta foi realizada durante um tempo médio de 30 minutos após cada aplicação, quando, então, já havia ocorrido à absorção das pomadas.

5.5 Procedimentos pós-operatórios

A analgesia realizada com cloridrato de tramadol, duas vezes ao dia, durante dois dias após o procedimento de indução das feridas, demonstrou ser eficiente para o controle da dor para a espécie e intervenção propostas. Os animais não manifestaram sinais de dor no local das lesões durante os procedimentos terapêuticos diários, bem como se mantiveram ativos, dóceis e apresentando normofagia, normodipsia, normúria e normoquesia, tendo ao final do experimento um incremento médio de 20 gramas nos seus pesos corporais.

5.6 Avaliação macroscópica

As lesões induzidas não apresentaram exsudação, não tendo ocorrido nenhum caso de sangramento e/ou contaminação bacteriana. Entretanto, ocorreram algumas escoriações, decorrentes de lambedura ou prurido próximos ao local das feridas, em alguns animais de todos os grupos, sem exceção. No grupo que recebeu apenas vaselina sólida, esse evento foi menos observado. Contudo, naqueles que receberam a pomada de própolis, esse sinal clínico ficou mais evidente, principalmente no início do tratamento, quando se pode observar prurido intenso e, até mesmo autotraumatismo, em três animais desse grupo.

O grupo que recebeu a pomada composta por ácidos graxos essenciais apresentou eritema generalizado de intensidade moderada, principalmente, no início do tratamento. Nas feridas dos demais grupos, essa alteração não foi observada.

As figuras a seguir (Figuras 9 e 10) demonstram o aspecto clínico macroscópico das feridas, nos dias zero, quatro, 16 e 28 pós-cirúrgicos.

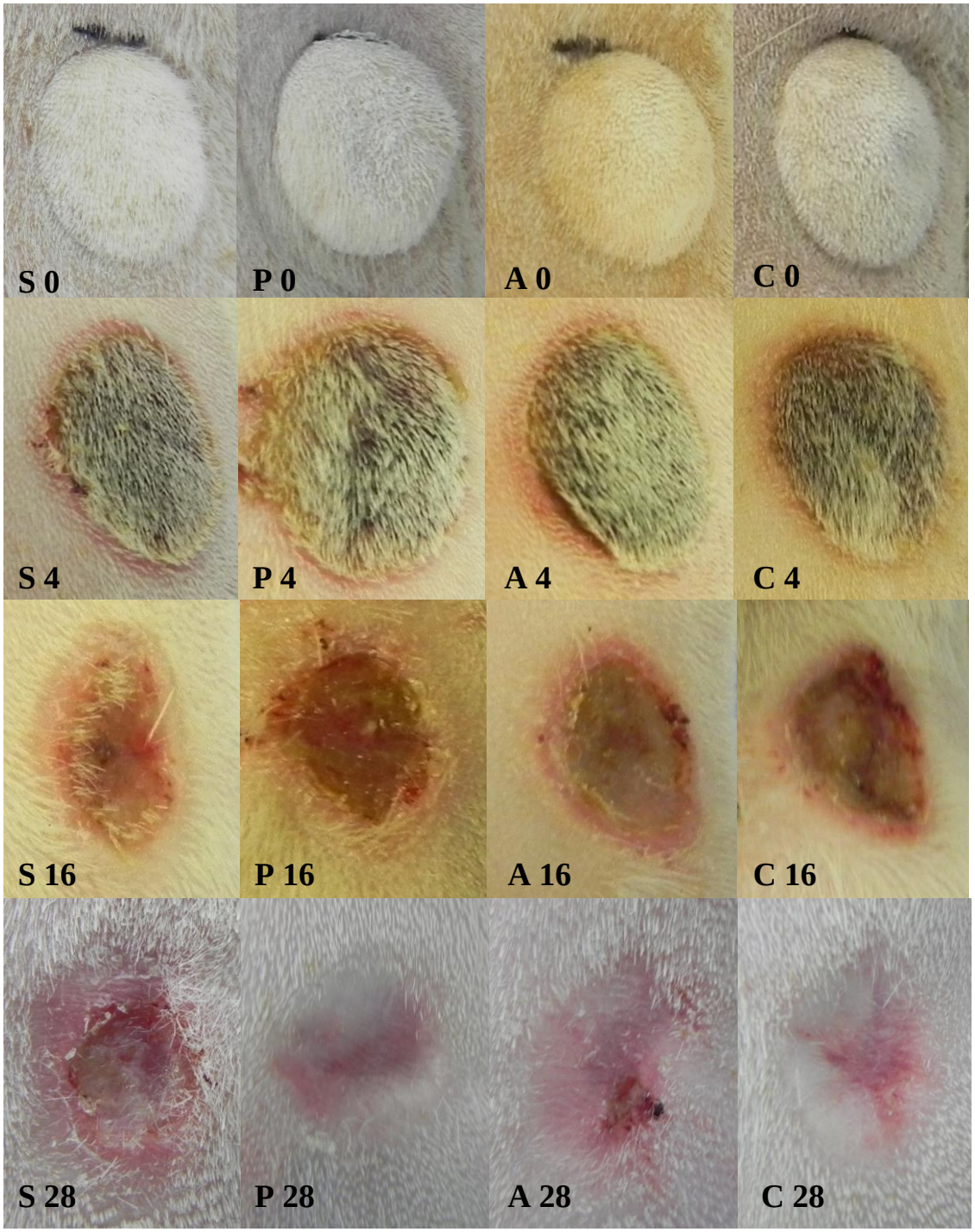

Figura 9 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões no dia da indução e aos quatro, 16 e 28 dias de pós-operatório. Nota-se a presença de cicatriz nos grupos tratados com própolis e calêndula no 28º dia. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais e C = Calêndula.

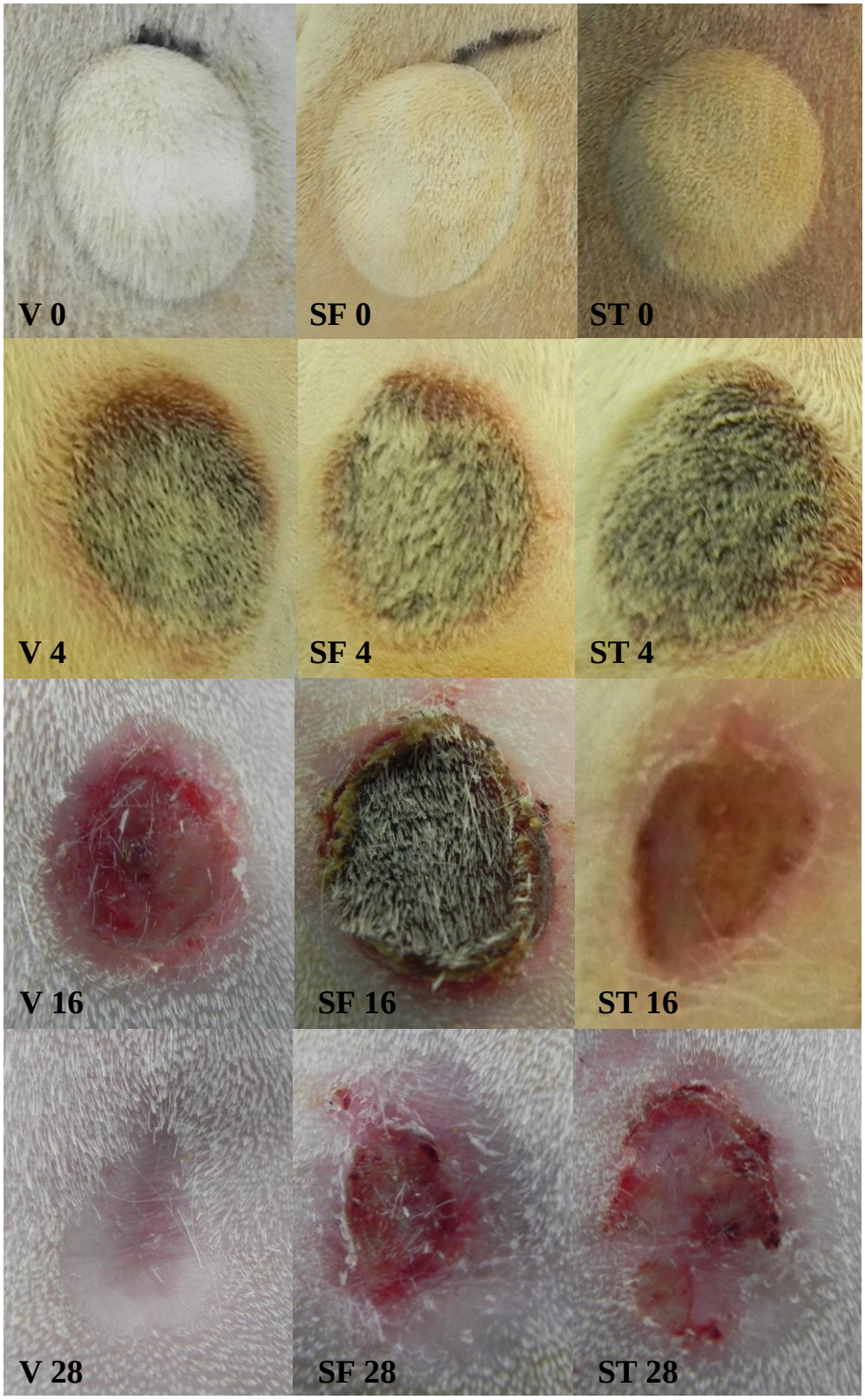

Figura 10 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões no dia da indução e aos quatro, 16 e 28 dias de pós-operatório. Nota-se a presença de cicatriz no grupo tratado com vaselina sólida no 28º dia. V = Vaselina, SF = Solução Fisiológica 0,9%, ST = Sem Tratamento.

As crostas (crionecrose) começaram a se desprender (soltar as bordas) entre o 10º e 12º dia após a indução das lesões. No 14º dia pós-cirúrgico essas crostas começaram a cair completamente e esse processo se estendeu até o final do experimento (28 dias) conforme mostra a tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 – Média (em dias) do início da queda das crostas (crionecroses) e dia da queda da primeira e da última crosta de cada grupo avaliado, após a indução das lesões. V = Vaselina, S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9%.

GRUPO	MÉDIA	Queda da primeira crosta do grupo	Queda da última crosta do grupo
V	20,25	14º	28º
S	23,75	16º	28º
P	18,00	14º	24º
A	21,00	16º	26º
C	20,50	14º	28º
ST	22,90	16º	28º
SF	23,89	18º	28º

Essa tabela mostra o tempo médio do início da queda das crostas após a indução das lesões em cada grupo de tratamento, bem como o dia do desprendimento total da primeira e da última crosta. Pode-se observar que o grupo própolis foi, em média, o que iniciou a queda das crionecroses mais precocemente, aos 18 dias de pós-operatório. Já, o grupo que recebeu apenas a limpeza com solução cloreto de sódio 0,9%, apresentou a média mais alta, o que representa a perda das crionecroses mais tardiamente, quase aos 24 dias de pós-operatório, ou seja, aproximadamente seis dias de atraso quando comparado ao grupo própolis.

5.7 Avaliação morfométrica

Os resultados estão demonstrados na tabela (Tabela 3) e figuras (Figuras 11, 12 e 13) que seguem. Ressalta-se que os valores médios das taxas de contração se apresentam mais negativos quanto mais cicatrizadas estão as feridas. Ou seja, quanto

mais próximo do valor –100, maior é a taxa de contração e mais cicatrizada se encontra a ferida.

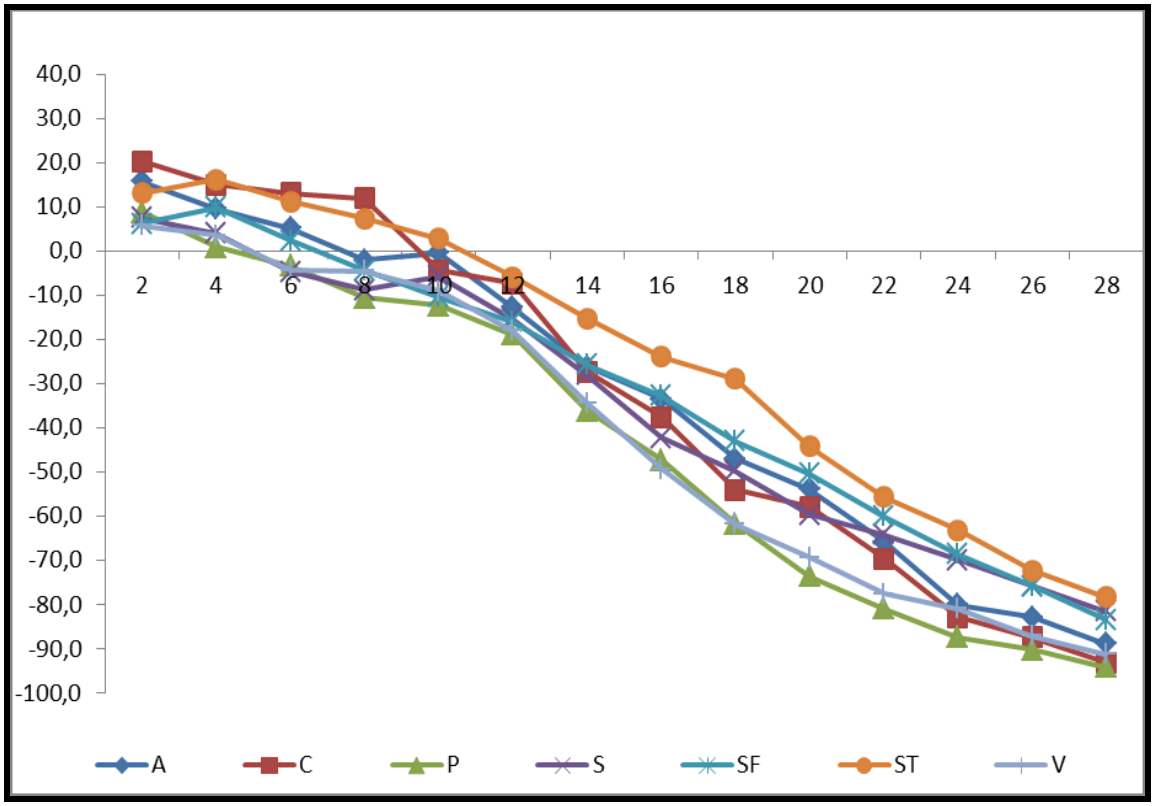

Figura 11 – Demonstração gráfica da evolução da taxa de contração média de cada grupo em relação aos dias de avaliações. O eixo X representa os dias pós-cirúrgicos de avaliação morfométrica e o eixo Y representa os valores médios das taxas de contração das feridas. A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, P = Própolis, S = Sulfadiazina de prata, SF = Solução Fisiológica 0,9%, ST = Sem Tratamento e V = Vaselina.

Essa figura mostra a taxa de contração média de cada grupo em relação aos dias avaliados. É possível observar que o grupo que não recebeu nenhum tratamento em suas feridas (ST) obteve as médias mais baixas das taxas de contração a partir do 10º dia pós-cirúrgico, chegando ao final do experimento com média de aproximadamente -80. As feridas dos grupos própolis e vaselina apresentaram uma evolução das suas taxas de contração muito semelhantes ao longo do estudo, começando a se destacar mais evidentemente em relação aos outros grupos a partir do 12º dia pós-operatório, chegando ao final do experimento com média aproximada de -94 e -91,

respectivamente. O grupo calêndula, que inicialmente apresentava taxas de contração média inferiores aos demais, a partir do 10º dia pós-cirúrgico se destacou gradativamente, permanecendo muito próximo aos grupos anteriormente citados a partir do 22º dia pós-operatório, finalizando com média aproximada de -93. A tabela a seguir (Tabela 3) mostra esses valores médios com maior detalhamento.

Tabela 3 – Taxa de contração média dos grupos analisados obtida a cada dois dias no período pós-cirúrgico, durante as avaliações morfométricas. A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, P = Própolis, S = Sulfadiazina de prata, SF = Solução Fisiológica 0,9%, ST = Sem Tratamento e V = Vaselina.

DIAS PÓS-CIRÚRGICO	A	C	P	S	SF	ST	V
2	15,7	20,3	8,7	7,5	6,1	13,0	5,6
4	9,6	15,0	0,9	4,0	9,8	16,1	3,5
6	5,1	13,1	-3,5	-4,7	2,4	11,2	-4,4
8	-2,1	11,9	-10,7	-8,9	-4,4	7,4	-4,5
10	-0,4	-4,5	-12,4	-5,7	-10,5	2,7	-9,2
12	-12,9	-7,4	-18,9	-15,4	-16,0	-5,9	-18,1
14	-26,2	-27,4	-36,1	-28,1	-25,7	-15,3	-34,4
16	-33,5	-37,7	-47,4	-42,3	-32,9	-24,0	-49,4
18	-47,0	-54,1	-61,8	-49,8	-43,1	-29,0	-61,9
20	-54,0	-58,0	-73,6	-59,7	-50,5	-44,3	-69,4
22	-65,8	-69,7	-81,0	-64,3	-60,1	-55,8	-77,7
24	-80,1	-83,0	-87,4	-70,0	-68,6	-63,3	-81,0
26	-82,9	-87,5	-90,2	-75,9	-75,9	-72,4	-87,2
28	-88,9	-93,3	-94,3	-81,5	-83,6	-78,4	-91,3

As Figuras 12 e 13, na sequência, demonstram os tempos de avaliação que apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos avaliados em relação às taxas de contração média.

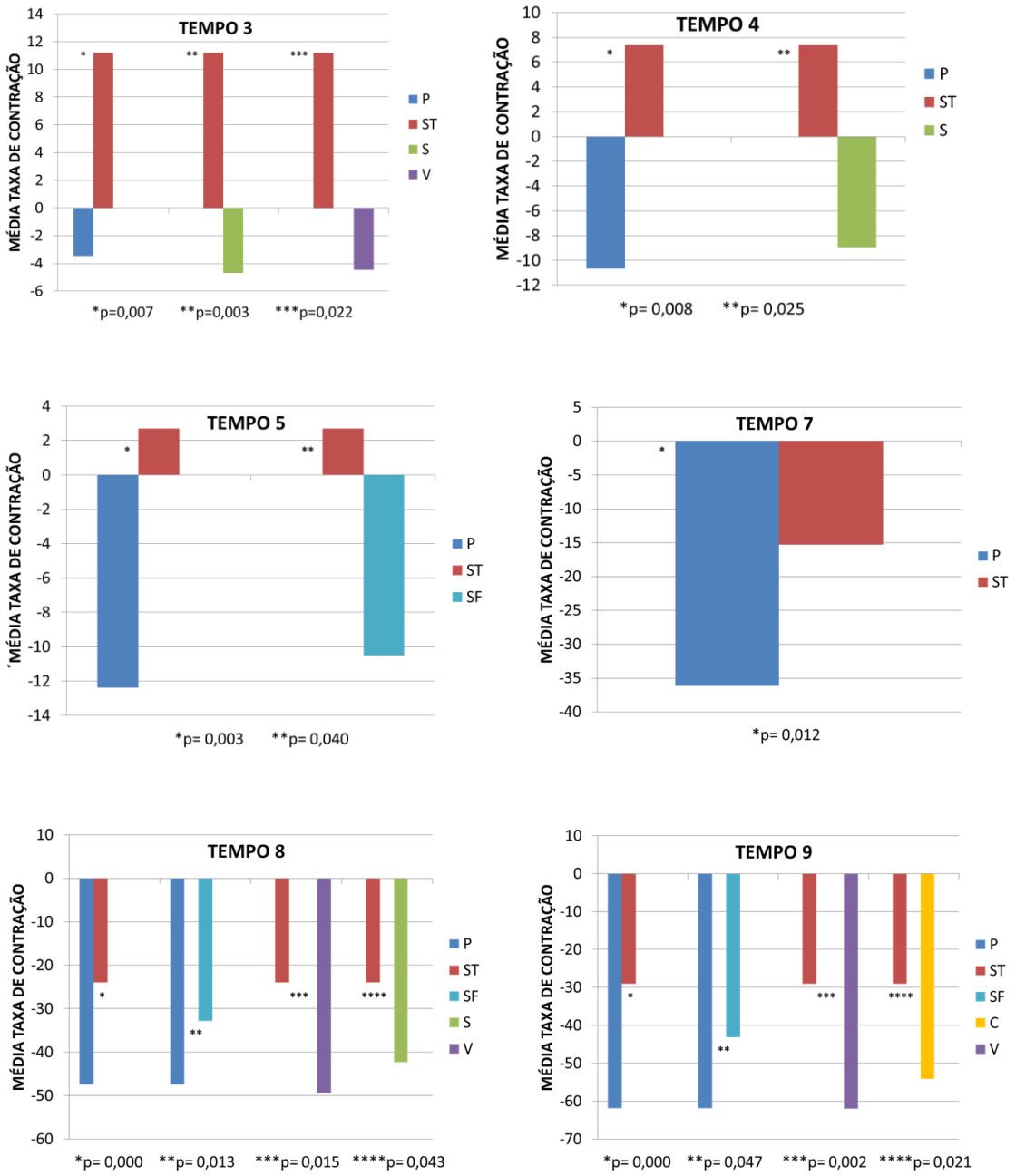

Figura 12 – Representação gráfica dos tempos de avaliação que tiveram diferença significativa (p<0,05) nas taxas de contração média entre os grupos analisados. Nesta figura estão abordados os tempos 3, 4, 5, 7, 8 e 9, que correspondem ao 6º, 8º, 10º, 14º, 16º e 18º dias pós-cirúrgico, respectivamente. Nota: Os valores das diferenças estatísticas entre os grupos estão informados logo abaixo de cada gráfico. P = Própolis, ST = Sem Tratamento, SF = Solução Fisiológica 0,9%, S = Sulfadiazina de prata, V = Vaselina, C = Calêndula e A = Ácidos Graxos Essenciais.

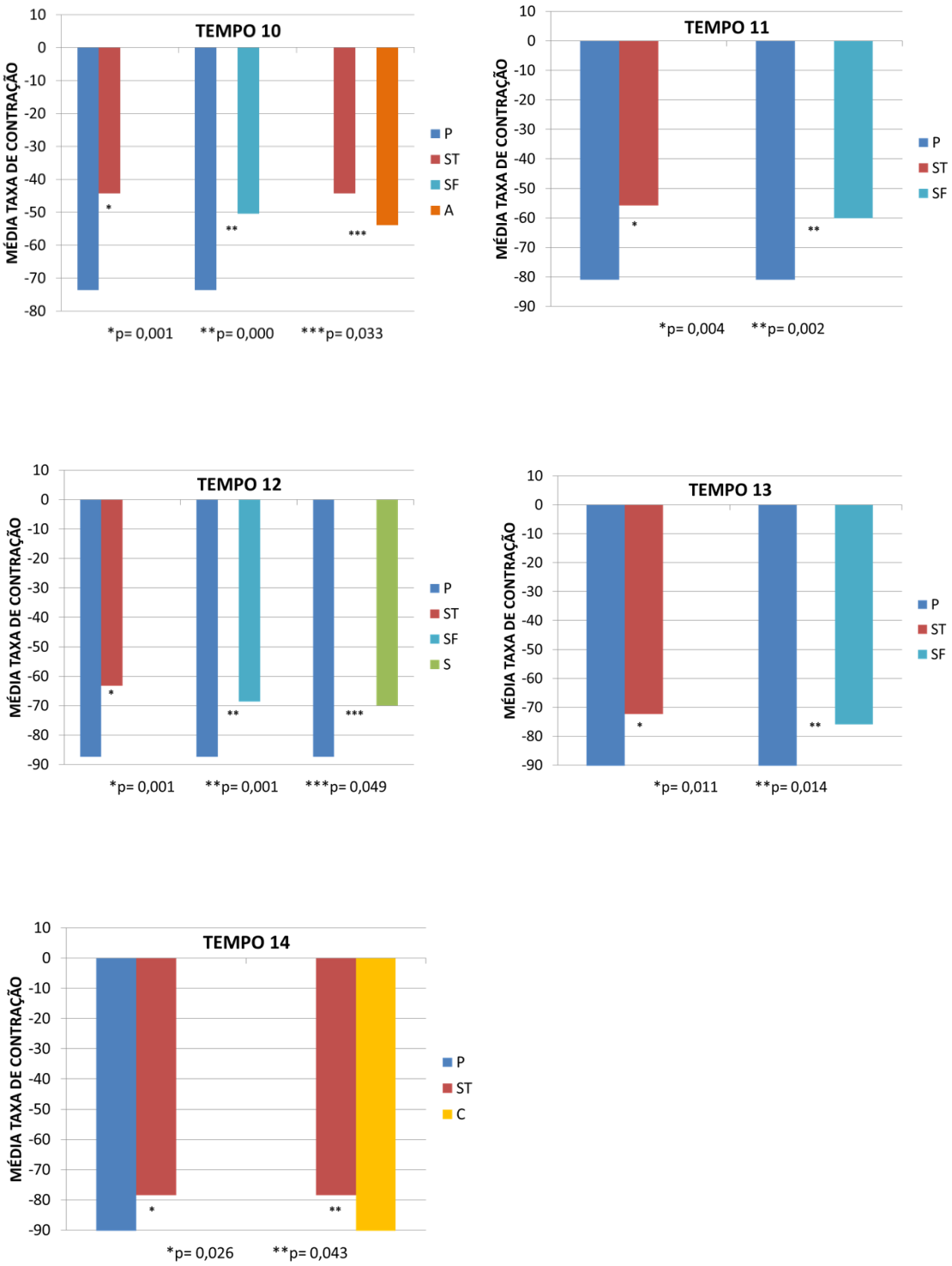

Figura 13 – Representação gráfica dos tempos de avaliação que tiveram diferença significativa ($p<0,05$) nas taxas de contração média entre os grupos analisados. Nesta figura estão abordados os tempos 10, 11, 12, 13 e 14, que correspondem ao 20º, 22º, 24º, 26º e 28º dias pós-cirúrgico, respectivamente. Nota: Os valores das diferenças estatísticas entre os grupos estão informados logo abaixo de cada gráfico. P = Própolis, ST = Sem Tratamento, SF = Solução Fisiológica 0,9%, S = Sulfadiazina de prata, V = Vaselina, C = Calêndula e A = Ácidos Graxos Essenciais.

5.8 Avaliação microscópica

Os parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos – intensidade de reação inflamatória, intensidade de deposição de colágeno, densidade de mastócitos, densidade de células marcadas pelo Ki-67 e angiogênese – não apresentaram diferença estatística significativa no teste empregado (Teste Exato de Fisher) entre os grupos avaliados nas amostras coletadas no 28º dia de pós-operatório. No entanto, foram listados os dados considerados importantes nesse estudo, conforme mostram as figuras a seguir.

5.8.1 Avaliação da coloração HE

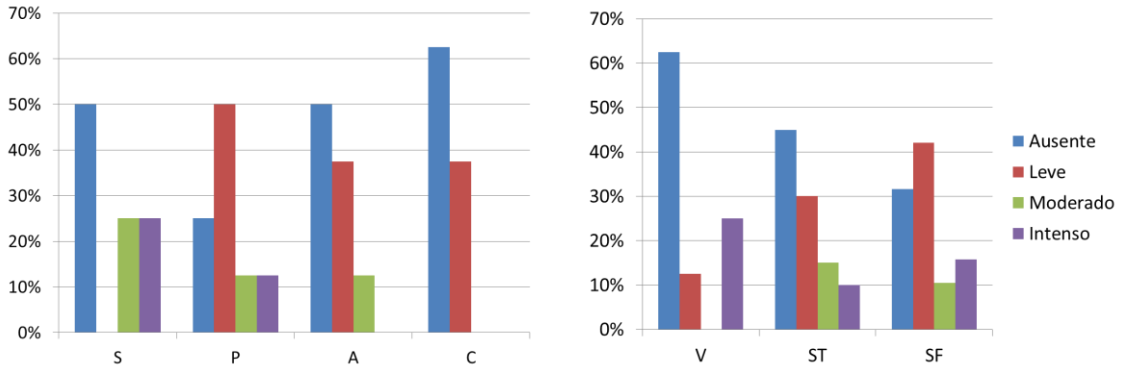

Figura 14 – Intensidade da inflamação. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de reação inflamatória dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9%.

5.8.1.1 Quanto à presença de hiperplasia da epiderme (Figura 15): 40% de todas as lesões apresentaram hiperplasia da epiderme. Nos grupos vaselina, sulfadiazina de prata e sem tratamento essa alteração foi observada em 50% das feridas; no grupo própolis ocorreu em 37,5%; no grupo solução fisiológica em 36,8% e nos grupos calêndula e ácidos graxos essenciais em 25% do total de lesões.

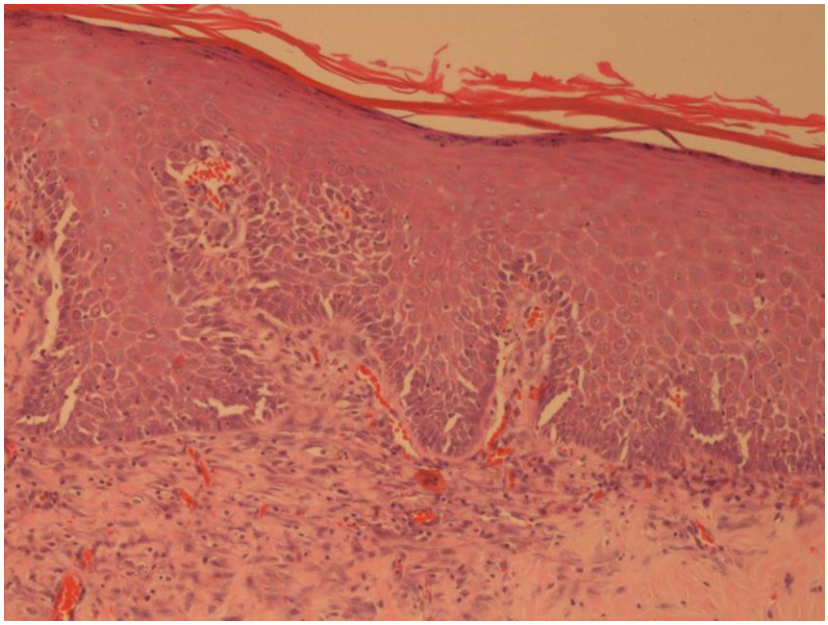

Figura 15 – Pele reparada, rato Wistar, grupo vaselina. Epiderme hiperplásica e derme com pequenos vasos e infiltrado inflamatório difuso discreto. HE, Obj. 10.

5.8.1.2 Quanto à presença de reepitelização completa (Figura 16): 43% do total de feridas apresentaram reepitelização completa. Nos grupos própolis e calêndula foi constatada em 62,5% de todas as lesões; no grupo sem tratamento ocorreu em 45%; nos grupos vaselina e ácidos graxos essenciais foi observada em 37,5%; no grupo solução fisiológica em 36,8% e no grupo sulfadiazina de prata em 25% do total de feridas.

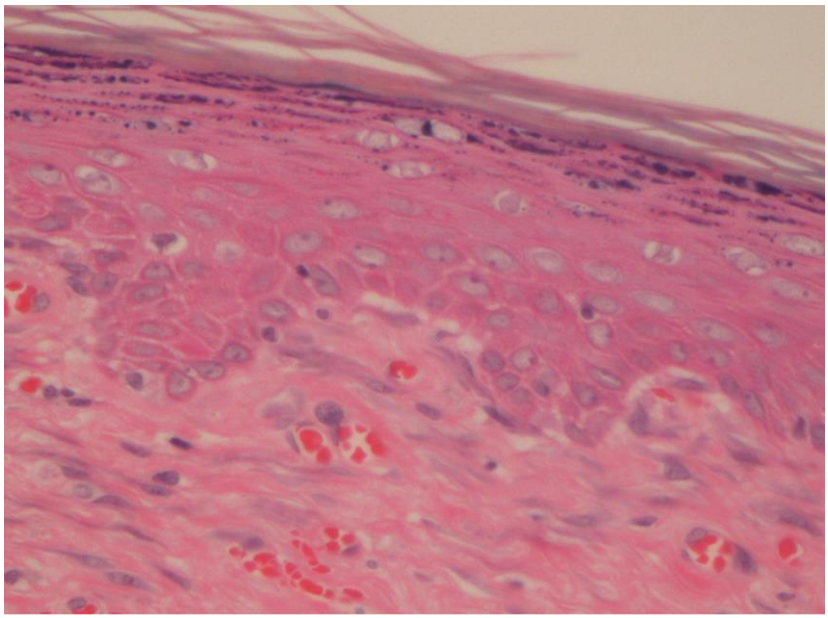

Figura 16 – Pele reparada, rato Wistar, grupo vaselina. Epiderme com camadas evidentes e derme superficial com poucos vasos. HE, Obj. 20.

5.8.1.3 Quanto à presença de úlcera (Figura 17): 25% de todas as feridas apresentaram ulceração. No grupo solução fisiológica essa alteração foi observada em 42% do total de lesões; no grupo sulfadiazina de prata ocorreu em 37,5%; nos grupos vaselina e sem tratamento em 25% e, nos grupos própolis e ácidos graxos essenciais em 12,5% de todas as feridas. No grupo calêndula essa alteração não foi observada.

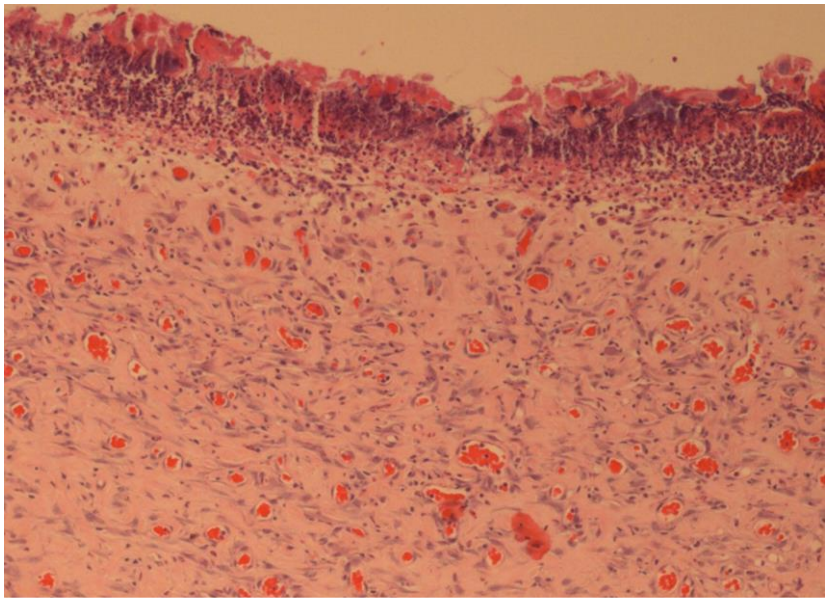

Figura 17 – Pele ulcerada, rato Wistar, grupo sulfadiazina de prata. Derme com rica neovascularização e infiltrado inflamatório difuso moderado. HE, Obj. 10.

5.8.1.4 Quanto à presença de crosta (Figura 18): 14% do total de lesões apresentaram essa alteração. Nos grupos sem tratamento e solução fisiológica foi constatada em 15%, enquanto nos grupos vaselina, sulfadiazina de prata, própolis, ácidos graxos essenciais e calêndula foi observada em 12,5% de todas as feridas.

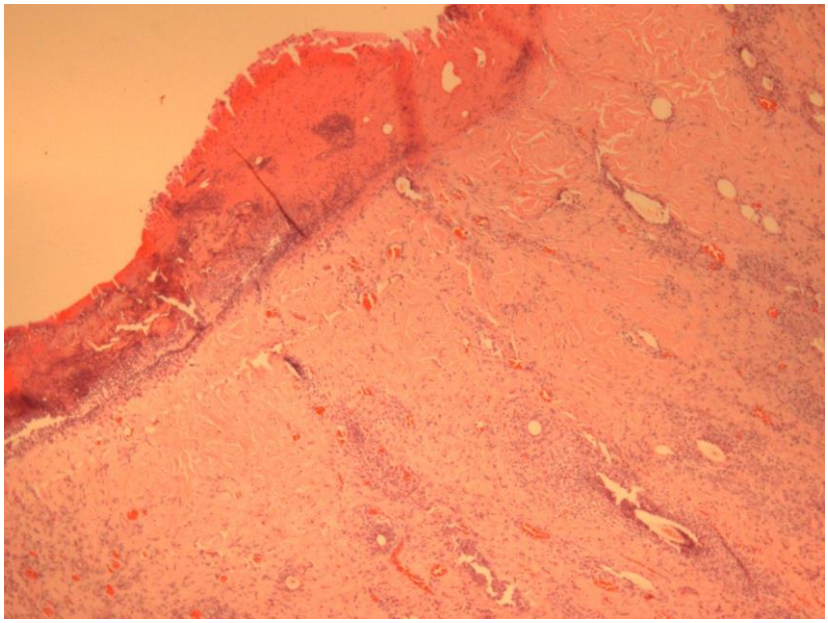

Figura 18 – Pele, rato Wistar, grupo própolis. Pele ulcerada recoberta por crosta espessa sobre infiltrado inflamatório intenso. HE, Obj. 10.

5.8.1.5 Quanto à presença de plasmócitos (Figura 19): 5% de todas as feridas apresentaram plasmócitos. No grupo própolis foi observada em 12,5%; em 10% do grupo sem tratamento e no grupo solução fisiológica em 5,3% do total de lesões. Nos demais grupos essa alteração não foi observada.

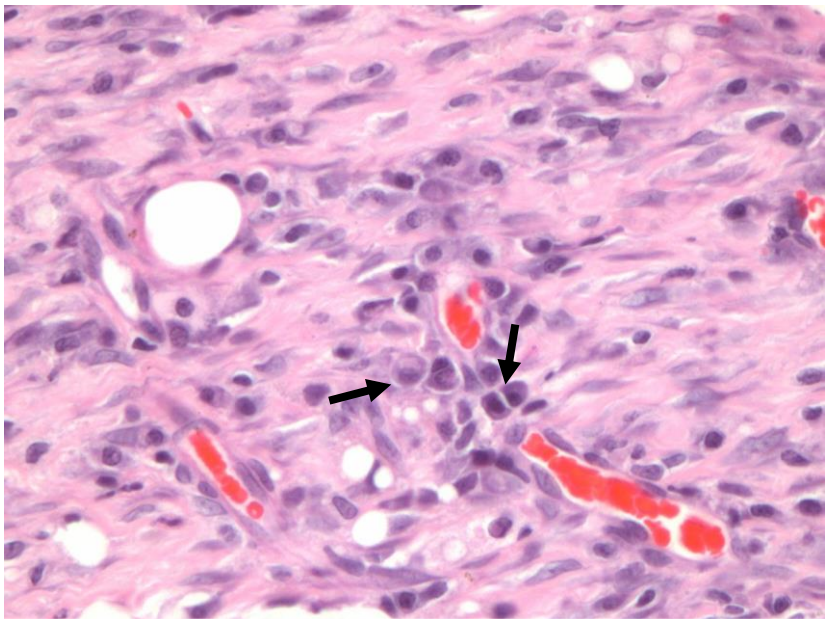

Figura 19 – Pele, rato Wistar, grupo sem tratamento. Derme profunda com infiltrado perivascular difuso e discreto, rico em plasmócitos (setas). HE, Obj. 40.

Tabela 4 – Quantidade de amostras (estimada em porcentagem) em cada grupo analisado quanto à presença de: hiperplasia da epiderme, reepitelização completa, úlcera, crosta e plasmócitos avaliadas pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). V = Vaselina, S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9%.

GRUPO	Hiperplasia da epiderme	Reepitelização completa	Úlcera	Crosta	Plasmócitos
V	50%	37,5%	25%	12,5%	0%
P	37,5%	62,5%	12,5%	12,5%	12,5%
S	50%	25%	37,5%	12,5%	0%
C	25%	62,5%	0%	12,5%	0%
A	25%	37,5%	12,5%	12,5%	0%
ST	50%	45%	25%	15%	10%
SF	36,8%	36,8%	42%	15%	5,3%

5.8.2 Avaliação da coloração TM

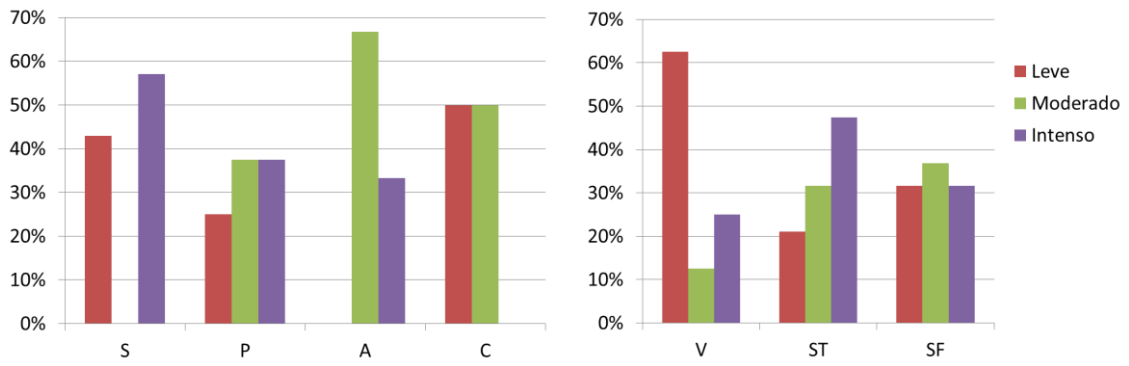

Figura 20 – Intensidade de deposição de colágeno. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de deposição de colágeno dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9%.

5.8.2.1 O grupo vaselina apresentou em cinco feridas (5/8) níveis leves de colágeno (até 33% de colágeno novo).

5.8.2.2 O grupo sulfadiazina de prata demonstrou em quatro feridas (4/8) níveis intensos de colágeno (superior a 68% de colágeno novo) (Figura 21).

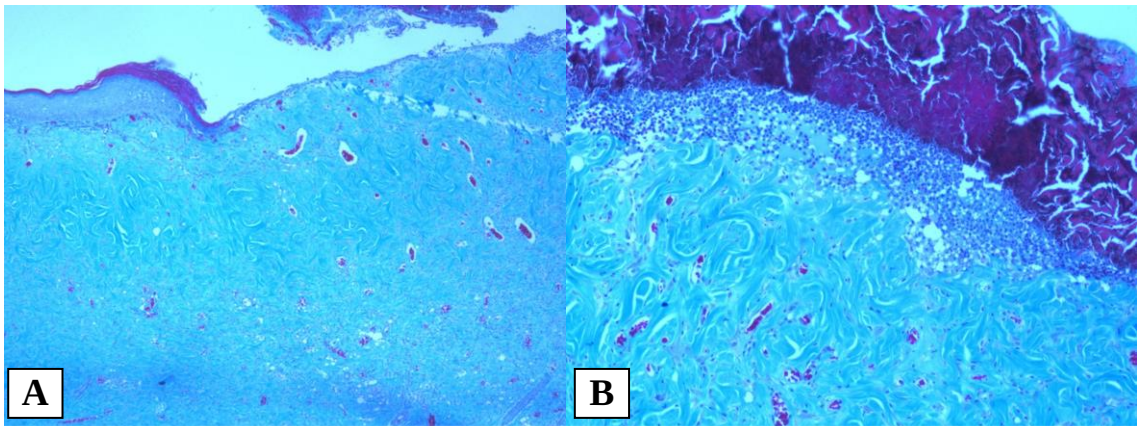

Figura 21 – Pele, rato Wistar, grupo sulfadiazina de prata. **A)** Pele parcialmente reparada, com área ulcerada à direita e feixes de fibras colágenas logo abaixo da derme superficial. Masson, Obj. 10. **B)** Pele ulcerada recoberta por crosta espessa sobre infiltrado inflamatório abundante e numerosos feixes de fibras colágenas. Masson, Obj. 10.

5.8.2.3 No grupo própolis, três feridas (3/8) apresentaram níveis moderados de colágeno (34% a 67% de colágeno novo), outras três (3/8) demonstraram níveis acentuados de colágeno e duas (2/8) tiveram níveis leves de colágeno.

5.8.2.4 A análise do grupo ácidos graxos essenciais evidenciou em cinco feridas (5/8), níveis moderados de colágeno.

5.8.2.5 No grupo calêndula foram observadas quatro lesões (4/8) com níveis discretos de colágeno e outras quatro (4/8) com níveis moderados de colágeno.

5.8.2.6 No grupo sem tratamento, quatro feridas (4/20) tiveram níveis discretos de colágeno, seis (6/20) níveis moderados de colágeno e nove lesões (9/20) níveis intensos de colágeno (Figura 22).

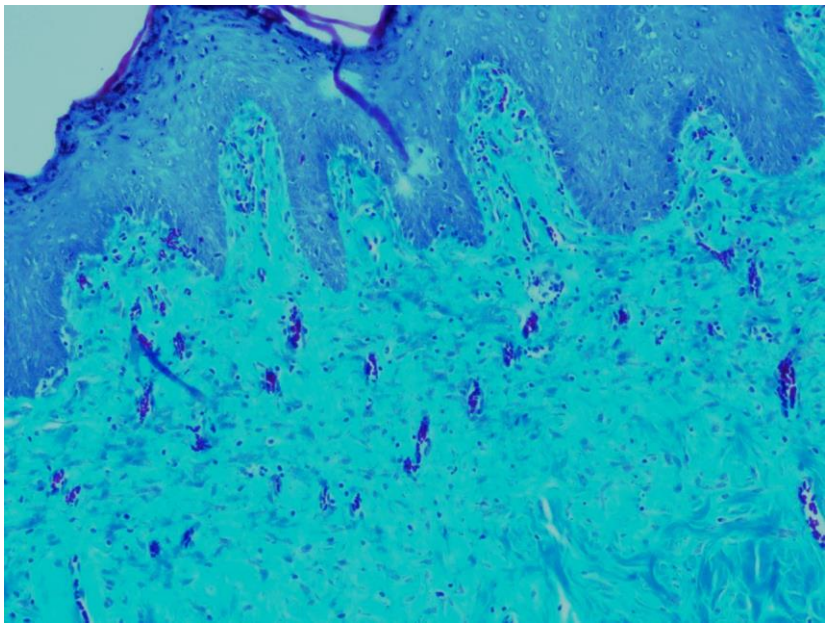

Figura 22 – Pele, rato Wistar, grupo sem tratamento. Pele reparada hiperplásica com derme rica em vasos e fibras colágenas. Masson, Obj. 10.

5.8.2.7 A análise do grupo solução fisiológica 0,9% evidenciou seis feridas (6/19) com níveis leves de colágeno, sete (7/19) com níveis moderados de colágeno e seis lesões (6/19) com níveis acentuados de colágeno (Figura 23).

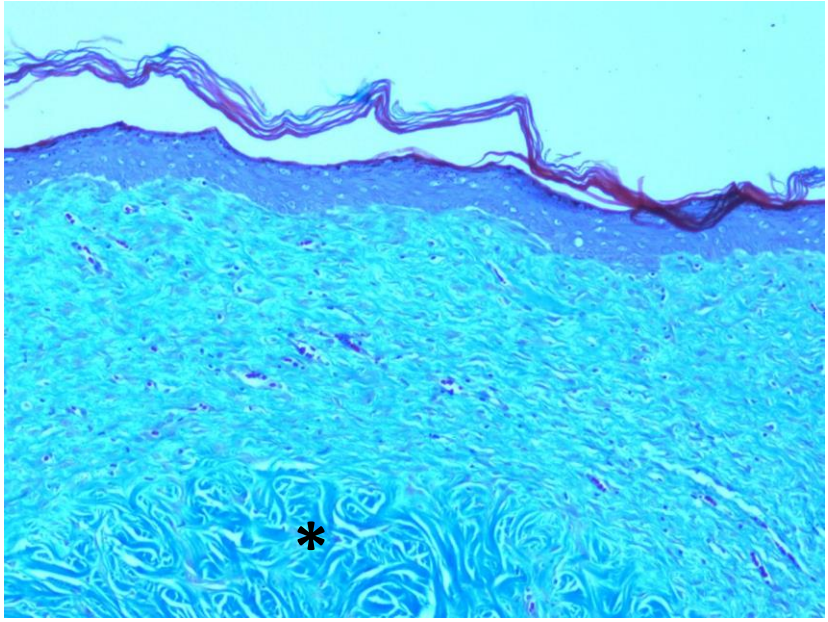

Figura 23 – Pele, rato Wistar, grupo solução fisiológica 0,9%. Pele reparada com derme rica em fibras colágenas que na profundidade formam feixes entrelaçados (*). Masson, Obj.10.

5.8.3 Avaliação da coloração AT

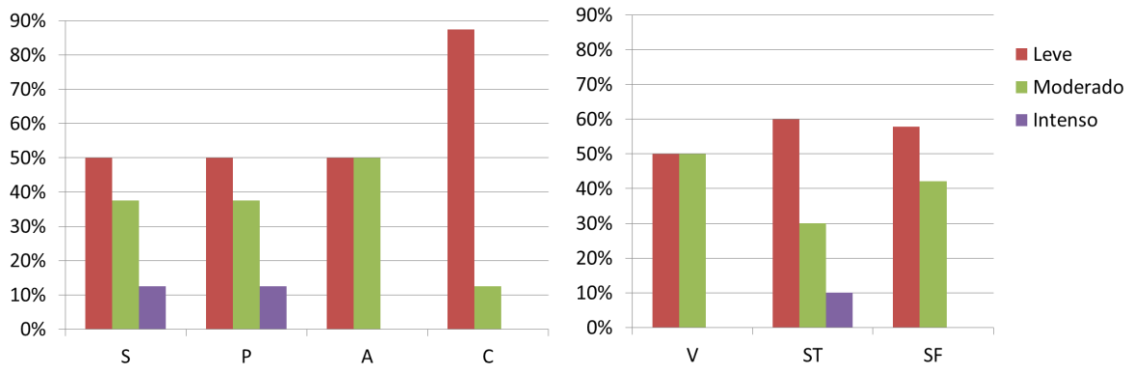

Figura 24 – Densidade de mastócitos. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de densidade de mastócitos dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9%.

Todos os grupos apresentaram densidade de mastócitos predominantemente nos níveis leve (média até 3,1 por cga) e moderado (média entre 3,2 e 6,3 por cga). O grupo calêndula demonstrou discrepância considerável entre esses dois níveis, com predomínio da categoria leve. Os grupos sulfadiazina de prata, própolis e sem

tratamento evidenciaram algumas feridas no nível intenso para densidade de mastócitos (média superior a 6,4 por cga), porém em menor quantidade do que nas categorias citadas anteriormente (Figura 25).

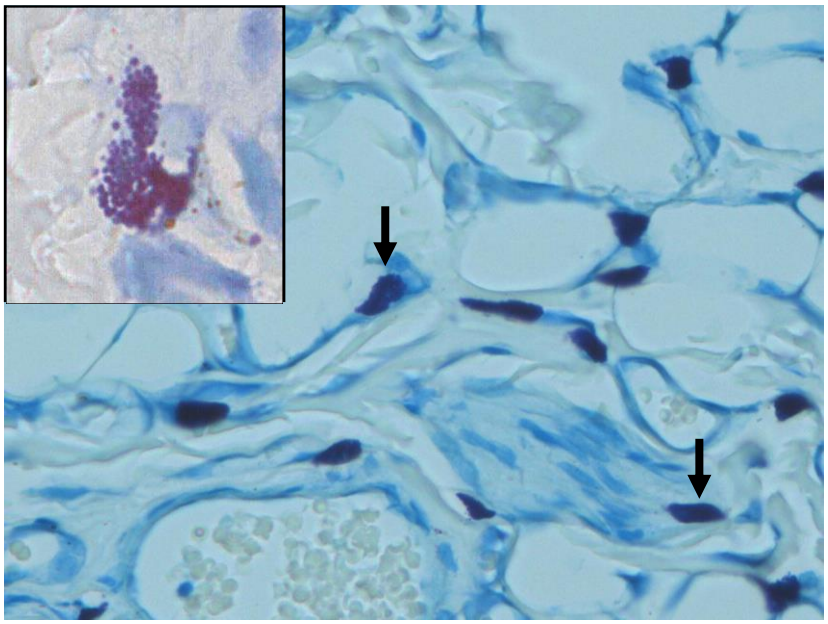

Figura 25 – Pele, rato Wistar, grupo sem tratamento. Numerosos mastócitos próximos a vasos sanguíneos na derme profunda (setas), evidenciados pelo azul de toluidina. AT, Obj. 40. Realce: mastócito metacromático desgranulando. AT, Obj. 100.

5.8.4 Avaliação da expressão do marcador Ki-67

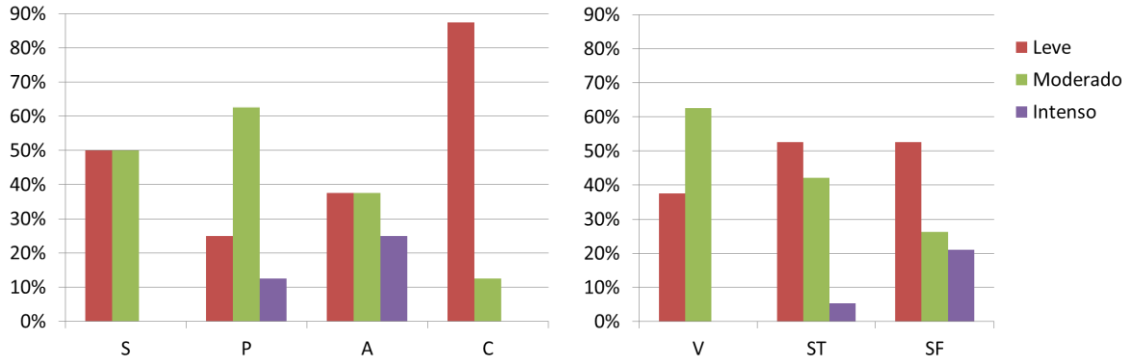

Figura 26 – Densidade de proliferação epitelial. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de densidade de células marcadas pelo Ki-67 dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9%.

Em todos os grupos ocorreu predominância dos níveis leve (média até 17,5 por cga) e moderado (média entre 17,6 e 35,1 por cga) para a densidade de células epiteliais marcadas pelo Ki-67. No entanto, no grupo calêndula houve uma diferença representativa entre esses dois níveis, com predomínio da categoria leve. Ainda, observou-se que os grupos própolis, ácidos graxos essenciais, sem tratamento e solução fisiológica 0,9% apresentaram algumas feridas no nível intenso para densidade de proliferação epitelial (média superior a 35,2 por cga), não ultrapassando os níveis prevalentes (Figura 27).

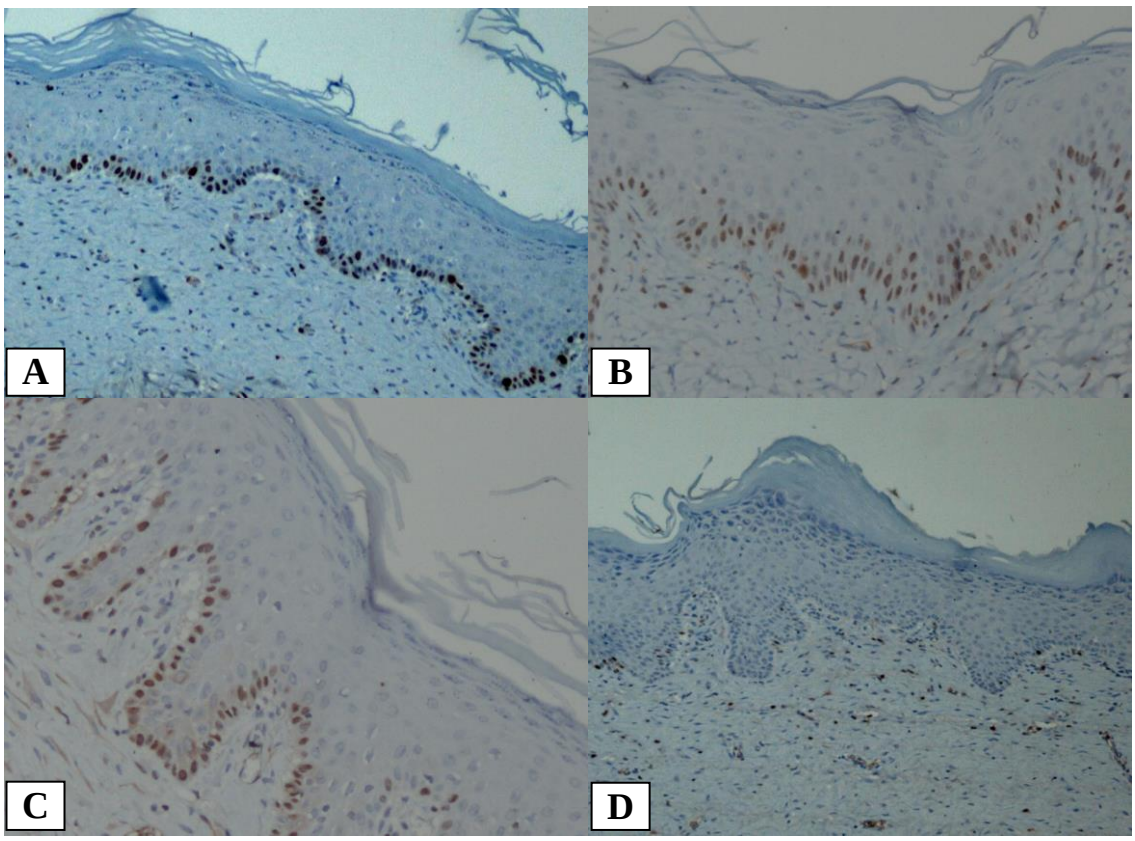

Figura 27 – Pele, rato Wistar, marcação de células epiteliais pelo anticorpo Ki-67. **A)** Grupo própolis. Pele reparada com várias células basais marcadas pelo anticorpo. IHQ, Obj. 10. **B)** Grupo sem tratamento. Pele reparada hiperplásica com numerosas células basais marcadas pelo anticorpo. Alguns fibroblastos da derme também apresentam marcação. IHQ, Obj. 20. **C)** Grupo ácidos graxos essenciais. Marcação uniforme de células basais em pele reparada hiperplásica. IHQ, Obj. 20. **D)** Grupo vaselina. Pele hiperplásica e hiperceratótica reparada em remodelação com marcação escassa de células basais. Há algumas células dérmicas marcadas pelo anticorpo. IHQ, Obj. 10.

5.8.5 Avaliação da expressão do VEGF

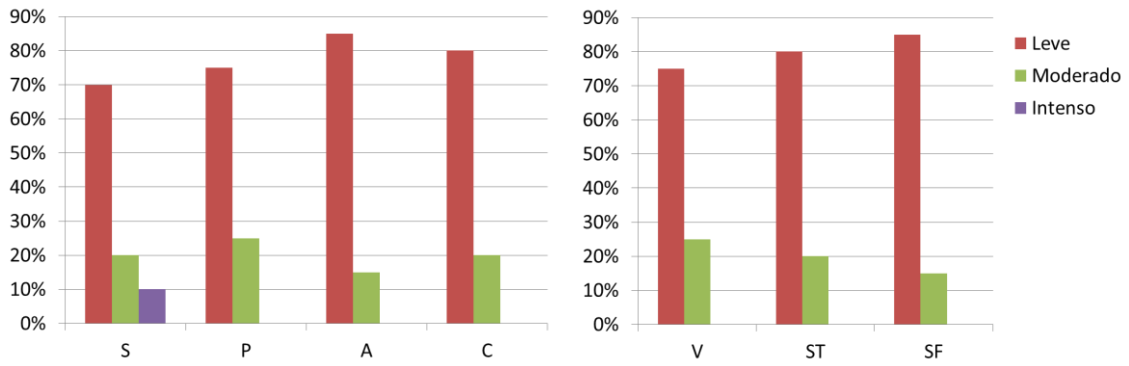

Figura 28 – Densidade de novos vasos sanguíneos. O eixo X representa os diferentes grupos e o eixo Y representa a porcentagem de cada categoria de densidade vascular dentro dos grupos avaliados. S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, V = Vaselina, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9%.

Quanto à presença de angiogênese, todos os grupos apresentaram predominância do nível leve (média até 43,4 por cga), seguido, em menor escala, do nível moderado (média entre 43,5 e 73,4 por cga). Apenas o grupo sulfadiazina de prata obteve nível intenso (média superior a 73,5 por cga) para a formação de novos vasos sanguíneos (Figura 29).

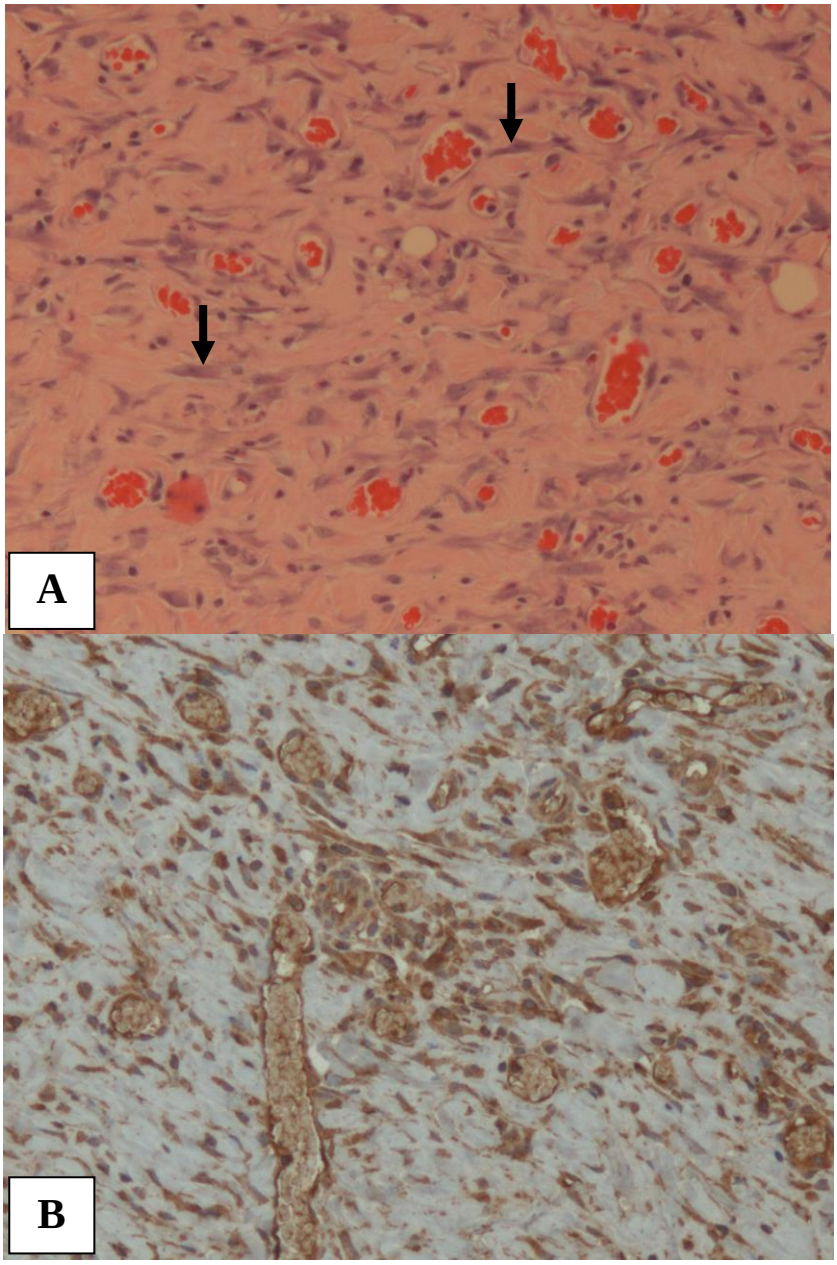

Figura 29 – Pele, rato Wistar, grupo sulfadiazina de prata. **A)** Vasos sanguíneos neoformados com numerosas hemácias no seu interior, juntamente com fibroblastos fusiformes (setas). HE, Obj. 20. **B)** Numerosos vasos sanguíneos são evidenciados pela marcação do VEGF. IHQ, Obj. 20.

Tabela 5 – Classificação dos dados microscópicos em relação à categoria predominante (ausente, leve, moderada, intensa) em cada grupo analisado quanto a: intensidade da inflamação, intensidade de deposição de colágeno, densidade de mastócitos, densidade de proliferação epitelial (expressão do marcador Ki-67) e angiogênese (densidade de novos vasos sanguíneos). V = Vaselina, S = Sulfadiazina de prata, P = Própolis, A = Ácidos Graxos Essenciais, C = Calêndula, ST = Sem Tratamento e SF = Solução Fisiológica 0,9%.

GRUPO	Inflamação	Deposição colágeno	Densidade mastócitos	Ki-67	Angiogênese
V	Ausente	Leve	Leve = Moderada	Moderada	Leve
P	Leve	Moderada = Intensa	Leve	Moderada	Leve
S	Ausente	Intensa	Leve	Leve = Moderada	Leve
C	Ausente	Leve = Moderada	Leve	Leve	Leve
A	Ausente	Moderada	Leve = Moderada	Leve = Moderada	Leve
ST	Ausente	Intensa	Leve	Leve	Leve
SF	Leve	Moderada	Leve	Leve	Leve

6 DISCUSSÃO

O animal experimental adotado para esse estudo (rato *Rattus norvegicus*) atendeu às expectativas e necessidades propostas. Além disso, devido ao seu pequeno porte e facilidade de aquisição e manejo, os gastos foram menores no que diz respeito à manutenção diária quando comparado a outras espécies utilizadas na experimentação animal. A característica de fácil adaptação à manipulação e docilidade durante o manuseio adequado foi bastante relevante nessa pesquisa, pois em estudos sobre cicatrização é primordial que os animais sejam tranquilos o suficiente para que, somado à terapia analgésica, não causem interferência no processo cicatricial por automutilação e estresse. De acordo com Lapchik *et al.* (2009), o rato tem muitas vantagens como um animal de pesquisa, pois está facilmente disponível, é barato, de fácil criação, adaptação e manuseio, é inteligente e tende a ser dócil. Ademais, o tamanho maior dos ratos, em comparação aos camundongos, faz deles um modelo cirúrgico mais adequado. Tufik *et al.* (2004) e Ferreira *et al.* (2005) afirmaram que o *Rattus norvegicus* é uma opção de uso como modelo cirúrgico induzido, sendo amplamente utilizado para estudos com pele. É possível encontrar na literatura diversos trabalhos realizados na área de cicatrização de feridas e regeneração tecidual, os quais utilizaram esse animal em estudos experimentais (BRITO *et al.*, 2001; CAVALCANTI NETO *et al.*, 2005; NITZ, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2009; PIMENTEL, 2011; BATISTA *et al.*, 2012; LOSS, 2013).

A adoção desse animal experimental permitiu, também, a padronização das feridas e redução do número de animais necessários, pois possibilitou a indução de duas lesões simétricas paralelas, diminuindo, assim, os viesses relacionados aos fatores individuais (como nível nutricional, possíveis comorbidades não detectadas, entre outros), além dos anatômicos (como o padrão de feixes vasculares, elasticidade e distribuição das linhas de tensão cutânea) (PAVLETIC, 2010). Optou-se pelas feridas lado a lado para que se mantivesse a irrigação sanguínea local na tentativa de minimizar as possíveis diferenças individuais no processo cicatricial, corroborando com os estudos realizados por Gianotti (2011), Garcez (2012) e Loss (2013). Ainda, para efeito de padronização foram escolhidos animais de mesmo sexo e idade.

Levando em consideração que a apreensão e o estresse produzidos pela manipulação e pelo procedimento de indução das feridas poderiam iniciar uma

variedade de reações neuro-humorais, potencialmente deletérias e passíveis de sensibilizar tanto o sistema nervoso central quanto o periférico elevando a sensibilidade à dor, optou-se pelo uso do opióide cloridrato de tramadol, na dose de 5 $mg.kg^{-1}$, administrado por via intraperitoneal, previamente ao procedimento criocirúrgico, conforme proposto por Andrade (2002). Para a manutenção, fez-se uso do anestésico inalatório isoflurano, o qual demonstrou ser muito eficiente e seguro para a espécie em questão, pois os animais apresentaram um retorno anestésico rápido e tranquilo, e não houve óbitos durante as intervenções (SCHANAIDER & SILVA, 2004). O tempo médio do procedimento anestésico variou entre oito e 11 minutos e foi considerado satisfatório, uma vez que incorporou o tempo necessário à tricotomia, antissepsia, demarcação no dorso dos locais onde se provocariam as feridas, indução e descongelamento das duas lesões e aplicação dos agentes tópicos, sendo considerado concluído apenas quando se visualizava o retorno anestésico completo do animal.

O tempo requerido para o procedimento criocirúrgico variou entre três e cinco minutos. O tempo da indução de cada lesão foi de exatamente um minuto, dividido em 15 segundos para atingir o halo desejado e os 45 segundos restantes para manter o halo de congelamento, tal como descrito por Maia & Ribeiro (1997), Dawber (2002), Lucas (2004) e Pimentel (2011). O tempo de descongelamento das feridas variou entre dois e quatro minutos, estando de acordo com Maia & Ribeiro (1997), Dawber (2002) e Kuflik (2004), os quais sugerem que o tempo ideal de descongelamento total deve ser igual ou maior a duas vezes o tempo de congelamento total. O procedimento cirúrgico foi considerado rápido, não cruento e de baixo nível álgico.

O método escolhido para a indução das feridas foi o congelamento por meio do *spray*. A grande maioria dos autores considera esse o método mais rápido, mais destrutivo e letal para o tecido alvo, além de ser considerado aquele que atinge a maior profundidade durante o procedimento criocirúrgico (PODKONJAK, 1982; WITHROW, 1989; KORPAN, 2001; DAWBER, 2002). A utilização da técnica do *spray* (sistema aberto) associado ao cone de neoprene (sistema confinado) para direcionar o jato e controlar o diâmetro de congelamento desejado foi satisfatória, pois possibilitou a padronização quanto ao tamanho e aspecto das lesões. Mesmo assim, houve alguma variabilidade na determinação da área das lesões no momento imediato à sua realização, fato inerente à elasticidade da pele de cada indivíduo em estudo. A mesma dificuldade foi encontrada nos experimentos de Hossein *et al.* (2008), Garcez (2012) e Loss (2013). No entanto, nesse trabalho e nos citados anteriormente não houve diferença que

interferisse significativamente nas análises posteriores. Apenas uma, das 80 feridas propostas, precisou ser descartada, pois durante sua indução ocorreu um congelamento excessivo da superfície cutânea devido a um problema na manipulação do aparelho de criocirurgia e, dessa forma, provocou uma lesão de diâmetro muito superior às demais, não podendo ser considerada nas avaliações macro e microscópicas. Segundo Castro *et al.* (2013), efeitos indesejados estão associados à escolha de técnica inadequada e congelamento excessivo, o que conduz à estenose cicatricial, destruição tecidual e deformidades.

O tamanho do Cryocone® utilizado foi considerado adequado para a espécie uma vez que permitiu a confecção de duas feridas paralelas no dorso do animal, cada uma com 15 mm de diâmetro e, ainda, conservou-se um espaçamento de 20 mm entre elas. Pimentel (2011) induziu duas feridas de aproximadamente 10 mm de diâmetro no dorso de ratos e concluiu que a reepitelização de ambas ocorreu de forma semelhante, tanto nos casos tratados com criocirurgia como nos controles. Uma vez que as lesões cutâneas nesses animais tendem ao rápido fechamento, o tamanho das feridas provocadas favoreceu uma rápida resolução (PIMENTEL, 2011). Por isso, optou-se por provocar, nesse experimento, lesões de diâmetro maior, a fim de tornar mais difícil o processo cicatricial e evidenciar diferenças entre os grupos analisados.

Os agentes tópicos foram aplicados com o auxílio de medidor de um grama, mostrando-se um método bastante satisfatório. Além da facilidade de manuseio, todos os animais receberam exatamente a mesma quantidade do produto, de modo que não ocorreu perda da pomada e a quantidade era suficiente para recobrir toda a ferida. Como todos os princípios ativos se apresentaram no mesmo veículo (vaselina sólida) não houve diferença quanto ao volume e peso das preparações tópicas aplicadas nos diferentes grupos. Não foram encontrados dados na literatura pesquisada que tivessem utilizado material semelhante como opção para aplicação das pomadas.

O enriquecimento ambiental através de amendoim torrado com casca, toalha de papel e semente de girassol auxiliou favoravelmente no entretenimento e distração dos animais após cada aplicação das pomadas e minimizou o estresse causado pelo isolamento. Segundo Lapchik *et al.* (2009), o enriquecimento ambiental objetiva proporcionar aos animais em cativeiro um ambiente rico em estimulação sensorial, que pode ser criado de diversas maneiras. Ainda, o enriquecimento alimentar, no caso de roedores, pode ser feito administrando sementes e alimentos com grau de dureza mais elevado, possibilitando o desgaste dos incisivos. Utilizou-se, também, uma técnica após

a aplicação dos tratamentos tópicos que foi manter as grades das gaiolas viradas por um período de 30 minutos. Com isso, não houve perda significativa das pomadas quando os animais se movimentaram, fornecendo o tempo necessário para que elas fossem absorvidas e, ainda, eles conseguiram adotar a posição em pé, estimulando o comportamento de exploração do ambiente. Na literatura pesquisada, os autores não citam os métodos utilizados para favorecer a absorção dos agentes tópicos estudados ou conter as lambeduras logo após a aplicação das pomadas. Durante todo o experimento foi mantida a preocupação com o bem-estar dos animais em estudo, conforme descrito por Lapchik *et al.* (2009): "O bem-estar dos animais em cativeiro não é apenas dependente da ausência de dor e de angústia ou de comportamentos anormais, mas também impor o mínimo de restrição às necessidades fisiológicas e etológicas dos animais".

A utilização do cloridrato de tramadol (derivado opióide) como analgésico, aplicado por via intraperitoneal, na dosagem de 5 $mg.kg^{-1}$, duas vezes ao dia, por dois dias após a indução das feridas, se mostrou um método eficiente no controle da dor pós-cirúrgica, sem, contudo apresentar interferência no processo cicatricial, que poderia ter ocorrido com o emprego de drogas antiinflamatórias (BALBINO *et al.*, 2005). Os animais retomaram precocemente às atividades, não apresentando sinais de dor quando manipulados, mantendo-se dóceis durante os procedimentos terapêuticos diários e com disposição alimentar normal, o que pode ser comprovado ao final do experimento quando obtiveram um incremento médio de 20 g nos seus pesos corporais comparado ao início do estudo.

Em todos os grupos, sem exceção, ocorreram casos de escoriações, devido a lambeduras ou mesmo prurido próximo ao local das feridas, sendo mais observado no período inicial até a metade do experimento, aproximadamente. O prurido é um sintoma que se manifesta essencialmente na pele e/ou membranas mucosas e pode variar desde leve a intenso, localizado a generalizado e intermitente a persistente (prurido crônico). Ele provoca uma sensação desagradável na pele que promove o ato ou o desejo de coçar (CUNHA & FILHO, 2012).

Nos animais que receberam a pomada de própolis, esse sinal clínico ficou mais evidente, sendo observado prurido intenso e até mesmo alguns casos de autotraumatismo, que se acredita ter ocorrido devido a uma reação alérgica. Segundo Orsi *et al.* (2005), alguns casos de alergia devido a componentes da própolis têm sido relatados, mas os possíveis mecanismos e os compostos responsáveis por essa reação

alérgica ainda não foram elucidados. Também, Angelini *et al.* (1987) afirmaram que embora a própolis apresente propriedades antiinflamatórias, há poucos relatos de seus efeitos secundários, tais como a dermatite alérgica de contato. Hausen *et al.* (1987) observaram que constituintes da própolis são potentes sensibilizadores de contato quando administrados na pele de cobaias, sendo o ácido caféico 1,1-dimetilalil éster o principal agente responsável pelo processo alérgico. Corroborando os resultados encontrados nesse estudo e com o já descrito na literatura, Orsi *et al.* (2005) descreveram que a própolis, em altas concentrações, pode ativar os mastócitos, promovendo a liberação de mediadores inflamatórios por mecanismos citotóxicos. Porém, quando utilizada em baixas concentrações, a própolis não apresentou nenhum efeito na liberação de histamina. Também, sugerem que esses resultados podem estar relacionados com o processo alérgico desencadeado pela própolis em pessoas sensíveis.

Uma propriedade organoléptica muito evidente da pomada de própolis foi o seu odor. Como os ratos possuem um olfato altamente desenvolvido, essa característica pode ter sido muito forte ou irritante para eles, promovendo o ato de coçar e lamber com o intuito de remover a pomada. Assim, sugere-se outra hipótese para as escoriações mais intensas que, em alguns animais desse grupo, chegaram ao autotraumatismo. Farias *et al.* (2013) avaliaram três formulações com o extrato de própolis, um creme, um gel e um unguento com vaselina, e demonstraram que em nenhuma dessas preparações ocorreu alteração quanto ao odor característico da própolis, confirmando o observado nesse estudo.

Nos animais que receberam a pomada composta por ácidos graxos essenciais, observou-se a presença de eritema generalizado de intensidade moderada no período inicial até quase a metade do experimento. A única referência encontrada na literatura que faz menção a esse achado foi de Mandelbaum *et al.* (2003), os quais afirmaram que os AGE podem provocar hipersensibilidade.

As crionecroses provocadas pelo procedimento criocirúrgico começaram a desprender suas bordas entre o 10º e 12º dia pós-cirúrgico. A partir do 14º dia após a indução das feridas, as crionecroses começaram a cair completamente e esse processo de queda continuou até o final do experimento (28º dia), discordando do descrito por Castro *et al.* (2013). De acordo com esses autores, a maior parte das lesões se apresenta no pós-cirúrgico como escaras secas que se destacarão do tecido sadio em quatro ou cinco dias, caindo entre o 10º e 14º dia. Quando a parte necrosada se destaca e cai, o tecido de granulação começa a se fechar por contração e epitelização e o processo

cicatricial se completa entre 14 e 21 dias (WITHROW, 1980). Nesse experimento, a maioria das lesões não estava completamente cicatrizada ao final dos 28 dias de avaliações, provavelmente devido ao grande tamanho das feridas conforme citado por Withrow (1980) e Lucas & Larsson (2007). As lesões induzidas pelo procedimento criocirúrgico tendem a cicatrizar por segunda intenção mais lentamente que outras feridas limpas, nas quais não ocorre a formação de uma necrose exacerbada, sendo que quanto mais precoce for a queda dessa, mais rapidamente se completará o processo de cicatrização e o aparecimento de uma cicatriz. A média (em dias) do início da queda das crostas nos grupos avaliados foi muito semelhante, à exceção do grupo própolis que apresentou média significativamente inferior e obteve a queda de todas as crionecroses de forma mais precoce.

No que se refere às taxas de contração média das feridas, observou-se que o grupo própolis foi o que obteve as maiores taxas, seguido, em ordem descrescente, pelos grupos calêndula, vaselina, ácidos graxos essenciais, solução fisiológica 0,9%, sulfadiazina de prata e sem tratamento. As feridas que cicatrizam por segunda intenção possuem a capacidade de contração devido à ação dos miofibroblastos, que dotados de grande quantidade de filamentos de actina, são responsáveis por esse fenômeno (MONTENEGRO & FRANCO, 1999). A contração da ferida é considerada um indicativo do potencial de cicatrização, ou seja, quanto melhor a cicatrização maior é a porcentagem da contração (BRITO *et al.*, 2001; MIRANDA, 2001).

Contrariamente ao observado nesse experimento, Rahal *et al.* (2003) afirmaram que não foi possível observar diferença significativa entre as taxas de contração média de feridas tratadas com própolis, mel e solução cloreto de sódio 0,9% e atribuíram isso ao fato das feridas serem limpas e não infectadas ou de difícil cicatrização, como em outros relatos. Também, Nitz (2005) não encontrou diferença estatisticamente significante nas taxas de contração de lesões tratadas com calêndula, mastruz e solução cloreto de sódio 0,9%, imputando esse fato à variabilidade intrínseca dos animais dentro de cada grupo. Ainda, Marques *et al.* (2004) utilizaram óleo de semente de girassol e vaselina sólida para aplicação tópica em feridas e observaram aumento na velocidade cicatricial do primeiro com relação ao segundo, concluindo que a vaselina não possui atividade cicatrizante, diferentemente do observado nesse trabalho. Já, Mishra & Simonson (2008) sugerem que as altas taxas de contração das feridas tratadas com ácidos graxos essenciais se devem ao fato desses induzirem a síntese de TGF-β e,

estimularem a expressão de antígenos contráteis nos fibroblastos, diferenciando-os em miofibroblastos.

As menores taxas de contração média foram observadas nos grupos sulfadiazina de prata e sem tratamento. Concordando com esse estudo, Soengil *et al.* (2000) também observaram a reepitelização mais evidente com o uso de própolis em relação à vaselina sólida ou sulfadiazina de prata, em lesões induzidas em coelhos. As feridas que receberam apenas a limpeza com solução cloreto de sódio 0,9%, obtiveram médias de contração superiores às que ganharam sulfadiazina de prata ou nenhum tratamento. De acordo com Batista *et al.* (2012) um dado interessante e já bastante conhecido é a importância de se manter a ferida limpa no processo de cicatrização, visto que as lesões tratadas com solução cloreto de sódio 0,9%, cicatrizam na mesma proporção das feridas tratadas com as pomadas testes em muitos estudos.

O grupo própolis apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo sem tratamento em relação às taxas de contração média desde o 6º dia pós-cirúrgico (3ª avaliação) até o 28º dia após o procedimento criocirúrgico (14ª avaliação). Os demais grupos analisados, em algum dos tempos avaliados, também obtiveram diferença estatisticamente significativa frente ao grupo sem tratamento. Os agentes tópicos são aqueles aplicados diretamente sobre o leito da ferida ou destinados a sua limpeza, com o objetivo de favorecer o processo de cicatrização, mantendo-a úmida. Ao contrário do que diz a crença popular de que “ferida seca cura mais rápido”, os estudos demonstram que as feridas abertas formam crosta e sofrem epitelização mais lentamente, enquanto as tratadas com terapia tópica ou curativos, que proporcionam um ambiente úmido, melhoram em 35% a 45% a taxa de reepitelização de feridas profundas (MANDELBAUM *et al.*, 2003). Diante disso, em lesões provocadas pela criocirurgia, a utilização de um tratamento tópico parece ser ainda mais relevante, uma vez que, segundo Castro *et al.* (2013), a necrose do tecido leva à descamação e a secagem da ferida, fazendo com que a cura se torne mais lenta do que em feridas por excisão cirúrgica.

Com base nos resultados mencionados anteriormente, pode-se inferir que qualquer um dos tratamentos tópicos realizados foi superior em relação à velocidade de cicatrização do que o grupo que não recebeu agentes tópicos ou limpeza em suas lesões. Ou seja, em uma análise mais direta, a aplicação de própolis, calêndula, vaselina sólida, ácidos graxos essenciais, sulfadiazina de prata ou solução cloreto de sódio 0,9%, seja ela qual for, desconsiderando suas características particulares, ainda são superiores, no

que diz respeito à rapidez do reparo por segunda intenção, do que simplesmente não se interferir no processo de cicatrização após um procedimento criocirúrgico cutâneo. Não foram encontrados na literatura pesquisada, trabalhos publicados que comparem terapias tópicas em feridas após a realização de criocirurgia, nem tão pouco indicações de agentes tópicos que pudessem ser utilizados para tratar tais lesões. O único trabalho que faz referência a isso é de Castro *et al.* (2013), afirmando que a maioria das lesões pós-criocirurgia cicatrizam naturalmente e, se necessário, pode ser feita apenas uma suave limpeza da área de necrose.

As variáveis avaliadas, microscopicamente, não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos no dia avaliado. A metodologia empregada ou as categorias utilizadas nas avaliações histológicas, bem como o teste estatístico aplicado para a análise dos dados microscópicos, podem não ter sido suficientemente sensíveis para detectar pequenas variações entre os grupos e, talvez, por isso não se tenham encontrado diferenças significativas.

Houve predomínio das amostras com reação inflamatória considerada ausente ou discreta e menor número de feridas classificadas como moderada e acentuada. Esse resultado pode ser explicado levando-se em consideração o tempo em que foram realizadas as biópsias. No 28º dia pós-cirúrgico, é esperado que as células de defesa não se encontrem mais em abundância no foco da lesão, uma vez que a fase inflamatória tem, em condições normais, duração de 48 a 72 horas (HATANAKA & CURI, 2007). O infiltrado inflamatório observado nas amostras era composto, predominantemente, ora por células polimorfonucleares (neutrófilos), ora por células mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos) e, por vezes, apresentava ambos os tipos, sendo classificado como infiltrado inflamatório misto. A reação inflamatória aguda é caracterizada pela curta duração, aumento da permeabilidade vascular, exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. A reação inflamatória crônica depende da não resolução do processo de fase aguda e, geralmente, possui longa duração. Caracteriza-se pela persistência de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese, proliferação de tecido conjuntivo e dano tissular, frequentemente resultando em reparo excessivo (KUMAR *et al.*, 2005; SEPHEL & WOODWARD, 2006). As feridas, ao término do período de avaliação, não se encontravam cicatrizadas de forma homogênea e, por isso, houve diferença intra e entre os grupos quanto à presença, densidade e o tipo de células do infiltrado inflamatório e, consequentemente, na intensidade da inflamação. De acordo com Silva (2007), as lesões

causadas pela criocirurgia apresentam uma pequena reação inflamatória e, a recuperação dessas é caracterizada pelo aumento de espessura da camada epidérmica e ausência de estruturas anexas como as glândulas e os folículos. Nesse estudo, também, foi observada hiperplasia da epiderme e ausência dos anexos cutâneos no local da lesão, em algumas amostras de todos os grupos avaliados.

Os grupos própolis e calêndula apresentaram o maior número de lesões com reepitelização completa ao final do experimento. Conforme também observado por Rahal e colaboradores (2003), a própolis levou a uma reepitelização mais precoce de feridas limpas induzidas em ratos Wistar, em relação aos animais tratados com mel e solução cloreto de sódio 0,9%. Ainda, Rao (1991) demonstrou que a aplicação externa do extrato de calêndula acelerou a reepitelização de feridas cirúrgicas em ratos.

A presença de úlcera foi constatada em algumas feridas de todos os grupos, à exceção da calêndula. Esse resultado corrobora Pimentel (2011) que verificou a presença de ulcerações nas áreas submetidas à criocirurgia em biópsias coletadas no 14º dia pós-cirúrgico. A formação de úlcera é um aspecto patológico do reparo, podendo ser resultado de vascularização insuficiente durante o processo cicatricial (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Os plasmócitos são células derivadas de linfócitos tipo B, pouco numerosos no tecido conjuntivo normal, mas abundantes em locais sujeitos à penetração de bactérias (como intestino e pele) e nos locais onde existe inflamação crônica (BANKS, 1992). Foram observados em poucas amostras de apenas três grupos (própolis, sem tratamento e solução fisiológica 0,9%), evidenciando uma reação inflamatória intensa e crônica, corroborando Pimentel (2011) que demonstrou a ação prejudicial do frio na pele, em fragmentos submetidos à criocirurgia e coletados no sétimo dia pós-operatório, os quais mostraram destruição celular acentuada. No presente estudo, não foi realizada avaliação microbiológica das feridas, apenas análises macroscópicas, nas quais não foram detectados sinais de infecção (como exsudação, acúmulo de pus, etc).

Quanto à intensidade de deposição de colágeno houve predominância dos níveis moderado e intenso, com exceção do grupo vaselina. A maioria das amostras coletadas dos grupos sulfadiazina de prata e sem tratamento foram incluídas na categoria acentuada para deposição de colágeno. Discordando do observado nesse experimento, Soengil *et al.* (2000) relataram que as taxas de fibras colágenas no grupo tratado com própolis excederam àquelas dos grupos que receberam vaselina sólida e sulfadiazina de prata.

Uma relação importante constatada nesse trabalho foi que a maioria das amostras, de todos os grupos, foram classificadas nos níveis ausente ou leve para reação inflamatória, enquanto um grande número delas foram incluídas nas categorias moderada ou intensa para a intensidade de deposição de colágeno, ratificando o suposto por Perez-Tamayo (1987). A cicatrização das feridas está diretamente relacionada com o processo inflamatório e, se esse é menos acentuado, permite maior deposição de feixes de fibras colágenas. É possível que a inflamação prolongada desencadeie necrose acentuada, causando mais danos ao tecido e tornando o processo de cura mais difícil (PEREZ-TAMAYO, 1987).

Os fibroblastos são células mesenquimais muito importantes durante o reparo tecidual. A fibroplasia se caracteriza por proliferação e migração dos fibroblastos no local da lesão e pela produção de colágeno tipo III e outros componentes de matriz como glicosaminoglicanos e fibronectina, que contribuem para a formação de tecido de granulação (LI *et al.*, 2007). Percebeu-se, nesse estudo, a formação do tecido de granulação exuberante, bem como o tempo de cicatrização mais longo do que em uma ferida gerada por cirurgia convencional, conforme descrito por Giampapa *et al.* (1981), Gage & Baust (1998) e Pimentel (2011). Durante o período de fibroplasia o colágeno é produzido de forma crescente, continuamente, até aproximadamente 21 dias, quando a homeostase é alcançada e a taxa de degradação do colágeno equilibra-se com a sua síntese (STADELMANN *et al.*, 1998). Os grupos sulfadiazina de prata e sem tratamento apresentaram algumas amostras nos níveis moderado e intenso de reação inflamatória e ao término do experimento, grande parte de suas feridas se encontravam em fase de proliferação, demonstrando exuberante tecido de granulação e taxas de contração média inferiores aos demais grupos. Diante disso, pode-se inferir que o prolongamento da fase inflamatória da cicatrização influenciou na fase de fibroplasia, ou seja, quanto mais duradoura a primeira fase, mais tarde começa a deposição dos fibroblastos na região, coincidindo com os resultados encontrados por Coelho *et al.* (2010).

Os mastócitos são células multifuncionais que participam desde o processo de inflamação aguda até a reparação tecidual (RECH & GRAÇA, 2006). Participam nos processos de inflamação, angiogênese, degradação de matriz e remodelação dos tecidos. Os mastócitos contêm uma variedade de potentes mediadores, tais como a histamina, heparina, proteinases e citocinas multifuncionais, sendo que muitos desses (histamina, heparina e TNF-α) são capazes de estimular a proliferação de fibroblastos e síntese de

colágeno (RIMKEVICIUS & MACKIEWICZ, 2006). Nesse estudo, a densidade de mastócitos observada pela técnica do azul de toluidina foi classificada como leve e moderada, predominantemente, em todos os grupos. Ocorreu diferença quanto à localização de concentração dessas células na derme, sendo observada na maioria das amostras uma concentração superior na derme profunda quando comparada à derme superficial. Esses resultados diferem dos encontrados por Cowen *et al.* (1979), que ao estudarem a distribuição dos mastócitos na pele humana normal em duas regiões de profundidade diferente na derme, observaram que ambos os locais tinham populações de mastócitos de tamanho e distribuição semelhante com uma densidade máxima imediatamente abaixo da junção dermo-epidérmica, diminuindo gradualmente a uma densidade mínima nas camadas mais profundas da derme. Ainda, Eady *et al.* (1979) afirmaram que os mastócitos tendem a se agregar em torno dos vasos e apêndices. Vários trabalhos têm observado que a densidade populacional de mastócitos varia consideravelmente, não apenas entre espécies e entre diferentes tecidos da mesma espécie, mas também de uma região para outra no mesmo tecido (COWEN *et al.*, 1979). Majeed (1994) em um estudo sobre a distribuição de mastócitos em ratos, afirmou que houve aumento do número dessas células em lesões inflamatórias da pele, mas concluiu que a presença de mastócitos é incidental e não indica qualquer anormalidade.

Outro dado interessante encontrado, em grande parte das amostras, foi a relação inversamente proporcional entre a deposição de colágeno e a quantidade de mastócitos, ou seja, nos locais onde havia grande quantidade de feixes de colágeno eram observados poucos mastócitos. Corroborando esse achado, Ettinger & Feldman (2005) sugeriram que a histamina se liga a receptores H_1 e H_2 dos macrófagos, resultando na liberação de um fator supressor de fibroblastos que diminui a fibroplasia normal e provoca retardo na cura da ferida. Contrariamente, Metcalfe *et al.* (1997) afirmaram que a histamina e a heparina podem estimular o crescimento dos fibroblastos, a síntese de colágeno e a formação da cicatriz. Não foi possível estabelecer uma relação direta entre a densidade de mastócitos e a cicatrização das feridas, visto que alguns grupos que se enquadraram nas categorias leve ou moderada (vaselina e calêndula, por exemplo), apresentaram taxas de contração média superiores, bem como uma cicatrização mais rápida de suas feridas, em relação à outros grupos que também foram classificados, predominantemente, nos níveis leve e moderado para densidade de mastócitos (sulfadiazina de prata e sem tratamento).

O grupo tratado com sulfadiazina de prata obteve uma parcela de suas amostras classificadas no nível intenso para a densidade de mastócitos e também para a densidade de novos vasos sanguíneos, confirmando o descrito por Metcalfe *et al.* (1997). Os mastócitos se acumulam em situações dependentes da angiogênese como na cicatrização de feridas. Dentre as substâncias que estimulam a angiogênese direta ou indiretamente destacam-se a heparina, a histamina e o TGF-β (Metcalfe *et al.*,1997). Ainda, corroborando esse dado observado, alguns trabalhos mostraram uma importante correlação entre a concentração de mastócitos e a microdensidade vascular em lesões pré-neoplásicas, sugerindo que os mastócitos podem controlar a resposta angiogênica pela liberação do VEGF (Sawatsubashi *et al.*, 2000; Iamaroon *et al.*, 2003). De acordo com Parizi *et al.* (2010) a triptase dos mastócitos foi identificada como potente fator proangiogênico nos tumores.

A angiogênese é um processo fisiológico que envolve o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. É um processo normal e vital no crescimento e desenvolvimento, bem como na cicatrização de feridas e nas inflamações crônicas (ROBBINS & COTRAN, 2010; SEPHEL & WOODWARD, 2010). O grupo sulfadiazina de prata foi o único que apresentou, parcialmente, nível acentuado de neoformação vascular. Esse fato pode ser explicado porque as lesões tratadas com esse agente apresentaram taxas de contração média inferiores aos demais grupos que também receberam pomadas. Dessa forma, ao término do período de avaliação, as feridas não estavam completamente cicatrizadas, apresentando em sua maioria, tecido de granulação exuberante e, consequentemente, maior número de vasos sanguíneos. À semelhança disso, Brito *et al.* (2001) e Miranda (2001) observaram, no tecido de granulação, vasos sanguíneos dispostos perpendicularmente ao epitélio e com a evolução do processo de reparação, esses vasos foram se dispondo paralelamente e diminuíram de quantidade. Um estudo desenvolvido por Coelho *et al.* (2010) avaliou a sulfadiazina de prata em feridas cutâneas e concluiu que os maiores escores de proliferação vascular foram encontrados no 7º dia pós-cirúrgico, com diminuição progressiva no 14º e no 30º dia. Também, Nascimento e colaboradores (2009) observaram que as feridas tratadas com sulfadiazina de prata apresentaram maior produção de fibroblastos e melhor angiogênese.

Em relação à avaliação de formação da epiderme, por meio da imuno-histoquímica, observou-se predomínio das categorias leve e moderada quanto à densidade de proliferação epitelial. Os grupos própolis, ácidos graxos essenciais, sem

tratamento e solução fisiológica 0,9% apresentaram o nível intenso em algumas amostras. Em contrapartida, o grupo calêndula apresentou, predominantemente, nível leve. Esse dado pode ser explicado pelo fato das lesões se encontrarem em fases diferentes do processo de cicatrização. O anticorpo Ki-67 reage com antígenos presentes no núcleo das células da camada basal do epitélio, a qual tem capacidade proliferativa, e origina os queratinócitos que migram constituindo as outras camadas epidérmicas. Assim, a expressão do marcador Ki-67, típico de epitélio em hiperproliferação, demonstra que as amostras obtidas estavam sofrendo o processo de cicatrização, ou seja, em fase de proliferação celular (GIANOTTI, 2011; GARCEZ, 2012; LOSS, 2013). As amostras cujas feridas já se encontravam na fase de remodelação, foram menos marcadas pelo anticorpo Ki-67. Isso porque, na fase de maturação, não ocorre mais proliferação celular intensa de fibroblastos e queratinócitos para o reparo do tecido conjuntivo e do epitélio, processos esses inerentes à fase de proliferação (SEPHEL & WOODWARD, 2006).

Pode-se definir cicatriz como sendo o resultado da reparação tecidual que ocorre após um ferimento. Esse processo fisiológico começa após a lesão e tem como finalidade a formação de um novo tecido. O processo cicatricial pode resultar em cicatrizes inestéticas ou funcionalmente limitantes, repercutindo emocionalmente nos pacientes (PEREIRA, 2003). Em se tratando de animais, embora esses não sofram diretamente o impacto emocional de uma cicatriz esteticamente inaceitável, os seus proprietários, com frequência, atribuem importância considerável ao tamanho e à forma das cicatrizes, bem como ao tempo necessário para se completar a cicatrização de ferimentos cutâneos por segunda intenção.

A análise macroscópica das lesões evidenciou um resultado clinicamente relevante quanto ao aparecimento da cicatriz, mais precocemente nos grupos que receberam as pomadas compostas por própolis, calêndula ou apenas vaselina sólida. Embora os grupos tratados com ácidos graxos essenciais, sulfadiazina de prata ou somente limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% não terem apresentado um resultado final semelhante aos grupos anteriormente citados, ainda assim demonstraram um aspecto clínico mais aceitável esteticamente em relação ao grupo que não recebeu qualquer tratamento após a indução das feridas. Deve-se a isso, o fato da aplicação das pomadas e a limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% proporcionarem ao leito das lesões um ambiente úmido, o qual favoreceu e acelerou o processo de reepitelização e consequentemente de cicatrização, concordando com Hedlund (2005).

Com esses resultados, foi possível inferir que a utilização de agentes tópicos nas lesões causadas por criocirurgia minimizam a disfunção estética relevante mencionada por Marciani & Trodahl (1975). Mesmo assim, como complicações e efeitos adversos do procedimento criocirúrgico, foi observado, nesse estudo, a cicatrização lenta e a presença de cicatrizes extensas conforme descrito por Marciani & Trodahl (1975). Dawber (2002), Kuflik (2004) e Pimentel (2011) também relataram cicatrizes atróficas após a criocirurgia, do ponto de vista morfológico e funcional.

É importante ressaltar a dificuldade de comparação entre os dados obtidos na literatura e os resultados desse experimento, uma vez que nenhum dos artigos analisados obteve exatamente as mesmas condições experimentais. Existe uma grande discrepância entre os estudos, pois não há ainda trabalhos com cicatrização de lesões resultantes de procedimentos criocirúrgicos e a influência de agentes tópicos que poderiam ser utilizados em tais feridas provocadas por congelamento.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento e com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

1) O grupo própolis apresenta a maior taxa de contração média das feridas, demonstrando diferença estatística significativa em relação ao grupo sem tratamento nas avaliações a partir do 6º dia pós-cirúrgico. O grupo que não recebeu tratamento adicional obteve as menores taxas de contração média das feridas, demorando um tempo superior aos demais para concluir a cicatrização;

2) Não se observa diferenças estatísticas significativas entre os grupos pesquisados quanto a proliferação epitelial, neovascularização e deposição de colágeno, nas avaliações histopatológicas e imuno-histoquímicas aos 28 dias de pós-operatório;

3) A terapia com sulfadiazina de prata, própolis, ácidos graxos essenciais e calêndula, ou, apenas, com o veículo vaselina sólida ou, ainda, com a limpeza com solução cloreto de sódio 0,9% proporciona uma relevante evolução clínica das feridas frente a não intervenção no processo cicatricial, podendo ser constatada durante as avaliações macroscópicas e nas imagens fotográficas, especialmente no 28º dia após o procedimento criocirúrgico.

Ademais, pode-se afirmar que o grupo própolis expressa uma melhora estatisticamente significativa quanto ao tempo de cicatrização de feridas cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido, comprovando a eficiência do tratamento.

Sugere-se a necessidade de novos estudos com cicatrização de lesões causadas pela criocirurgia, no que diz respeito às ferramentas que podem ser usadas com o intuito de acelerar esse processo e melhorar a qualidade das cicatrizes. Ainda, propõem-se a realização de biópsias e análises histopatológicas em períodos de tempo anteriores aos realizados nesse estudo, com a finalidade de detectar e compreender diferenças em todas as fases do processo de reparo de feridas causadas pelo nitrogênio líquido (queimaduras frias), desde a promoção da crionecrose até sua queda e formação da cicatriz.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. Wound management in small animal practice. **In Practice**, v. 18, n. 3, p. 115-129, 1996.

ANDRADE, S. F. Analgésicos. In: _____. **Manual de terapêutica veterinária.** 2 ed. São Paulo: Roca, 2002.

ANGELINI, G.; VENA, G. A.; MENEGHINI, C. L. Psoriasis and contact allergy to propolis. **Contact Dermatitis**, v. 17, p. 251-253, 1987.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BANKS, W. **Histologia veterinária aplicada.** 2 ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.

BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.

BATISTA, L. L. V. et al. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 6, p. 515-520, 2012.

BAUM, C.; ARPEY, C. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, v. 31, p. 674-686, 2005.

BAXTER, J. S. The machinery of veterinary cryosurgery. **Journal of Small Animal Practice**, v. 19, p. 27-34, 1977.

BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 857 p.

BLANES, L. Tratamento de feridas. In: BAPTISTA-SILVA, J. C. C. (Ed.). **Cirurgia vascular: guia ilustrado.** São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.baptista.com>.

BOJRAB, M. J. Veterinary cryosurgery: an overview. **Norden News**, v. 53, p. 16-20, 1978.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução RE nº 89 de 16 de março de 2004 – Dispõe sobre o registro de fitoterápicos simplificado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2004.

BRITO, N. M. B. et al. Avaliação macroscópica de feridas cutâneas abertas, em ratos, tratadas com óleo de andiroba. **Revista Paraense de Medicina**, v. 15, n. 2, p. 17-22, 2001.

BUTTS, K. et al. Diffusion-weighted MRI after cryosurgery of the canine prostate. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 1, p. 131-135, 2003.

CAMPOS, M. C. et al. Tratamento de feridas infectadas utilizando *Calendula officinalis*. **Homeopatia Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 22-28, 2000.

CASTRO, J. L. C. et al. Criocirurgia – revisão de literatura. **Medvep Dermato – Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, v. 3, n. 6, p. 11-25, 2013.

CAVALCANTI NETO, A. T. et al. Análise comparativa entre o óleo-resina de copaíba e o diglucona clorexidina no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 34, n. 2, p. 107-112, 2005.

COELHO, J. M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.

COOPER, I. S. Criogenic surgery: a new method of destruction or extirpation of benign and malignant tissue. **The New England Journal of Medicine**, v. 268, p. 743, 1963.

COWEN, T.; TRIGG, P.; EADY, R. A. Distribution of mast cells in human dermis: development of a mapping technique. **British Journal of Dermatology**, v. 100, n. 6, p. 635-640, 1979.

CUNHA, P. R.; FILHO, O. D. Pruritus: still a challenge. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 5, p. 735-741, 2012.

DAMYANLIEV, R. et al. The treatment of suppurative surgical wounds with propolis. **Folia Medica**, v. 24, n. 2, p. 24-27, 1982.

DAWBER, R. **Criocirurgia cutânea princípios e prática clínica.** 2 ed. São Paulo: Manole, 1999, 135 p.

DAWBER, R. Cryosurgery: unapproved uses, dosages, or indications. **Clinics in Dermatology**, v. 20, p. 563-570, 2002.

DELLA LOGGIA, R. et al. The role of triterpenoids in the tropical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flower. **Planta Medica**, v. 60, p. 516-520, 1994.

DYCE, J. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. I. G. **Tratado de anatomia veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 233-238, 1990.

DYSON, M. Advances in wound healing physiology: the comparative perspective. **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 4, p. 227-233, 1997. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com>. Acesso em: 28 nov. 2012.

EADY, R. A. et al. Mast cell population density, blood vessel density and histamine content in normal human skin. **British Journal of Dermatology**, v. 100, p. 623-633, 1979.

ESCUDERO, A. B.; RODRIGUEZ, R. R. P.; FUNEZ, F. A. Princípios técnicos de la cirurgía prostática (1° Parte). **Archivos Espanoles de Urologia**, v. 59, n. 10, p. 1089-1109, 2003.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine.** 6 ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005, v. 1, p. 774.

FARIAS, L. A. et al. Stability Evaluation of Propolis Topical Bases for Veterinary Use. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 8, p. 1-6, 2013.

FERNANDES, J. A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.

FERREIRA, A. M. et al. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Revista da Escola de Enfermagem USP**, v. 46, n. 3, p. 752-760, 2012.

FERREIRA, E. et al. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Revista da Escola de Enfermagem USP**, v. 37, n. 1, p. 44-51, 2003.

FERREIRA, L.; HOCHMAN, B.; BARVOSA, M. V. J. Experimental models in research. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 28-34, 2005.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 203-206, 2008.

GAGE, A. A.; BAUST, J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. **Cryobiology**, v. 37, n. 8, p. 171-186, 1998.

GARCEZ, T. N. A. **Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas como adjuvantes na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos Nova Zelândia.** 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

GIAMPAPA, V. C; OH, C.; AUFSES, A. H. The vascular effect of cold injury. **Cryobiology**, v. 18, p. 49-54, 1981.

GIANOTTI, W. K. B. **Células-tronco mesenquimais e eletrocupuntura na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos.** 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GILBERT, J. C. et al. Temperature determination in the frozen region during cryosurgery of rabbit liver using MR image analysis. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 15, n. 6, p. 657-667, 1997.

GOLDSTEIN, R. S.; HESS, P. W. Cryosurgical treatment of cancer. **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, n. 1, p. 51-64, 1977.

GREINER, T. P. et al. Cryosurgery. **Veterinary Clinics of North America**, v. 5, n. 3, p. 565-581, 1975.

HAMÚ, Z. C.; PINTO, M. M.; CHAGAS, L. A. F. Ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E e lecitina de soja: uma nova opção no tratamento de lesões graves com perda de substância com ou sem presença de infecção. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 56, n. 1, p. 5-12, 1999.

HANKS, J.; SPODNICK, G. Wound healing in veterinary rehabilitation patient. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 35, n. 6, p. 1453-1471, 2005.

HARTLAPP, I. et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2215-2224, 2001.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HAUSEN, B. M. et al. Propolis allergy. Origin, properties, usage and literature review. **Contact Dermatitis**, v. 17, p. 163-170, 1987.

HEDLUND, C. S. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais.** 2 ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 135-230.

HOFFMANN, N. E.; BISCHOF, J. C. The cryobiology of cryosurgical injury. **Urology**, v. 60, n. 2, p. 40-49, 2002.

HONG, J. S.; RUBINSKY, B. Patterns of ice formation in normal and malignant breast tissue. **Cryobiology**, v. 31, p. 109-120, 1994.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 36, n. 4, p. 667-685, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 10 mar. 2013.

HOSGOOD, G. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** 3 ed. São Paulo: Manole, 2007. v. 1.

HOSSEIN, K. M. et al. Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) Activated By Thromboplastin-D on the Repair and Regeneration of Wounds in Dogs. **Iranian Journal of Veterinary Surgery**, v. 3, n. 4, p. 19-30, 2008.

IAMAROON, A. et al. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, p. 195-199, 2003.

KEMPER, K. J. Calêndula. **Longwood Herbal Task Force**, p.1-13, 1999. Disponível em: <http//www.mcp.edu/herbal/default.htm>. Acesso em: 10 ago. 2013.

KLOUCHEK-POPOVA, E. et al. Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. **Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica**, v. 8, p. 63-67, 1982.

KORPAN, N. N. Cryosurgery in the 21st Century. In: _____. **Basics of Cryosurgery.** Slovenia: Springer Wien New York, p. 3-8, 2001.

KUFLIK, E. G. et al. History of dermatologic cryosurgery. **Dermatologic Surgery**, v. 26, p. 715-722, 2000.

KUFLIK, E. G. Cryosurgery for skin cancer: 30-year experience and cure rates. **Dermatologic Surgery**, v. 30, n. 2, p. 297-300, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran - Bases patológicas das doenças.** 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 49-124.

LANE, J. G. Practical cryosurgery: an introduction for small animal Clinicians. **Journal of Small Animal Practice**, v. 15, p. 715-725, 1974.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório.** São Paulo: Atheneu, 2009. 708 p.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 9-18, 2007.

LIPTAK, J. M. An overview of the topical management of wounds. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 6, p. 408-413, 1997. Disponível em: <http://animalcancersurgeon.com>. Acesso em: 10 set. 2013.

LOSS, F. R. **Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos Wistar.** 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

LUCAS, R. **Monitorização e mensuração tomográfica de diferentes técnicas de crioterapia em pele de cães da raça Beagle, e sua relação com as medidas da necrose estimada pela histopatologia.** 2004. 102 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LUCAS, R.; LARSSON, C. E. Crioterapia na clínica veterinária: avaliação da praticabilidade, exequibilidade e efetividade em dermatoses de caninos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 3, p. 291-299, 2002.

LUCAS, R.; LARSSON, C. E. O uso da criocirurgia na dermatologia veterinária. **Clínica Veterinária**, n. 69, p. 74-84, 2007.

MAIA, M.; RIBEIRO, A. E. **Curso de criocirurgia.** São Paulo: centro de estudos dermatológicos Adolpho Carlos Linderberg - clínica de dermatologia da Santa Casa de São Paulo, 1997. 19 p. (Apostila)

MAJEED, S. K. Mast cell distribution in rats. **Arzneimittelforschung Drug Research**, v. 44, n. 3, p. 370-374, 1994.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.

MARCIANI, R. D.; TRODAHL, M. J. Postoperative sequelae of cryosurgery. **Journal Oral Surgery**, v. 33, n. 6, p. 458-461, 1975.

MARINHO, A. M. Atenção nos cuidados de enfermagem das escaras quanto às associações terapêuticas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 50, n. 2, p. 257-274, 1997.

MARQUES, L. A. C. **Criocirurgia: nossa experiência.** 1989. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1989.

MARQUES, S. R. et al. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 196-209, 2004.

MENDONÇA, R.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.

MIRANDA, L. T. G. S. **Uso da tintura de arnica em feridas cutâneas abertas em ratos.** 2001. 108 f. Dissertação (Mestrado em Medicina). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2001.

MISHRA, R.; SIMONSON, M. S. Oleate Induces a Myofibroblast-Like Phenotype in Mesangial Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, p. 541-547, 2008.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais.** 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 146-150.

NASCIMENTO, E. G. et al. Evaluation of chitosan gel with 1% silver sulfadiazine as an alternative for burn wound treatment in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 6, p. 460-465, 2009.

NEEL, H. B. et al. Requisites for successful cryogenic surgery of cancer. **Archives of Surgery**, v. 102, p. 45-52, 1971.

NISHIDA, H. et al. Cryoimmunology for malignant bone and soft-tissue tumors. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 16, p. 109-117, 2011.

NITZ, A. C. **Estudo morfométrico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, utilizando *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*.** 2005. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NWOMEH, B. C. et al. Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 6, n. 2, p. 127-134, 1998.

ORSI, R. O. et al. Effect of propolis extract on guinea pig lung mast cell. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 76-83, 2005.

PARIZI, A. C. G. et al. Comparação entre a concentração de mastócitos em carcinomas espinocelulares da pele e da cavidade oral. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 6, p. 811-818, 2010.

PATRICK, K. F. M.; KUMAR, S.; EDWARDSON, P. A. D. The inducion of vascularization by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis.* **Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 11-18, 1996.

PAVLETIC, M. M. **Atlas of small animal reconstructive surgery.** 3 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 679 p.

PEREIRA, J. R. C. Tratamento de cicatrizes patológicas com a associação de cepalin, heparina e alantoína. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 8, p. 603-608, 2003.

PEREZ-TAMAYO, R. **Introduccion a la patologia.** Buenos Aires: Editoria Médica Panamericana, 1987. p. 670.

PERUCHI, C. M. S. et al. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estúdio histológico. **Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile**, v. 19, n. 2, p. 23-34, 2001.

PIMENTEL, C. B. **Estudo dos efeitos celulares e vasculares da criocirurgia com nitrogênio líquido, na pele de ratos, por método histopatológico.** 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

PODKONJAK, K. R. Veterinary cryotherapy. A comprehensive look at uses, principles, and successes. **Veterinary medicine & small animal clinician**, v. 77, p. 51-64, 1982.

QUEIROZ, G. F. et al. Clinical study of cryosurgery efficacy in the treatment of skin and subcutaneous tumors in dogs and cats. **Veterinary Surgery**, v. 37, p. 438-443, 2008.

RAHAL, S. C. et al. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 61-67, 2003.

RAISER, A. G. Feridas. In: **Patologia Cirúrgica Veterinária.** 1 ed. Universidade Federal de Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, 1995. v. 2, cap. 6, p. 137-156.

RAO, S. G. Calêndula and Hypericum: two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. **Fitoterapia**, v. 62, p. 508, 1991.

RECH, R. R.; GRAÇA, D. L. Mastócitos em condições normais e patológicas – revisão. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 1, p. 51-60, 2006.

RIMKEVICIUS, A.; MACKIEWICZ, Z. Mast cells in the inflammatory connective tissue diseases. **Acta Medica Lituanica**, v. 13, n. 2, p. 77-82, 2006.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Renovação, regeneração e reparo dos tecidos. In: **Patologia: bases patológicas das doenças.** 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ROH, C.; LYLE, S. Cutaneous Stem Cells and Wound Healing. **Pediatric Research**, v. 59, n. 4, p. 100-103, 2006.

RUBINSKY, B. Cryosurgery. **Annual Reviews of Biomedical Engineering**, v. 2, p. 157-187, 2000.

SANDISON, G. A. Future directions for cryosurgery computer treatment planning. **Urology**, v. 60, n. 2, p. 50-55, 2002.

SAWATSUBASHI, M. et al. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Virchows Archiv**, v. 436, p. 243-248, 2000.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, 2004.

SEIM, H. B. Mechanisms of cold-induced cellular death. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 4, p. 755-762, 1980.

SEPHEL, G. C.; WOODWARD, S. C. Reparação, regeneração e fibrose. In: RUBIN, E. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 89-120.

SILVA, M. S. B. **Criocirurgia cutânea e sua relação com a epinefrina na anestesia local em cães: alterações histopatológicas.** 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

SILVERMAN, S. G. et al. MR imaging-guided percutaneous cryotherapy of liver tumors: initial experience. **Radiology**, v. 217, p. 657-664, 2000.

SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. **Brunner & Suddarth: Tratado de enfermagem médico-cirúrgica.** 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

SOENGIL, J. et al. Effect of propolis on healing of fullthickness skin wound in rabbits. **Korean Journal of Veterinary Clinical Medicine**, v. 17, n. 1, p. 62-70, 2000.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, n. 2, p. 26-38, 1998.

STOCUM, L. Repair of skin wounds by fibrosis. **Regenerative biology and medicine.** New York: Elsevier, 2006. p. 21-39.

SUTTA, J. et al. Experimental and clinical experiences in the treatment of wounds in domestic animals by local application of an alcoholic solution of propolis. **Folia Veterinaria**, v. 18, p. 143-147, 1974.

SWAIN, S. F.; HENDERSON, R. A. **Small Animal Wound Management.** 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. 444 p.

TANAKA, S.; OHKUMA, T.; ISHII, Z. Experimental Cryoimmunology. In: KORPAN, N. N. **Basics of cryosurgery.** Slovenia: Springer Wien New York, 2001. p. 31-39.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Herbarium: compendio de fitoterapia.** 3 ed. Curitiba: Editora Herbarium, 1995. p. 66-68.

THEORET, L. The pathophysiology of wound repair. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 21, p. 1-13, 2005.

TUFIK, S. et al. **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação.** São Paulo: Unifesp – Universidade Federal de São Paulo, 2004.

VIEIRA, A. P. et al. Ação dos flavonoides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008.

WARD, R. S.; SAFLLE, J. R. Topical agents in burn and wound care. **Physical Therapy Reviews**, v. 75, n. 6, p. 526-538, 1995.

WITHROW, S. J.; GREINER, T. R.; LISKA, W. D. Cryosurgery: veterinary considerations. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 11, p. 271-282, 1975.

WITHROW, S. J. General principles of cryosurgical technique. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 4, p. 779-786, 1980.

WITHROW, S. J. **Clinical veterinary oncology.** Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1989. p. 107-111.

ZACARIAN, S. A. Cryogenics: the cryolesion and the pathogenesis of cryonecrosis. In: _____. **Cryosurgery for skin cancer and cutaneous disorders.** St. Louis: C.V. Mosby Company, 1985. p. 1-30.

APÊNCICE A - Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2014)

FICHA CONTROLE CIRÚRGICO

Animal: _____ Peso: _____ g

Data da indução da ferida (CRIOCIRURGIA): _____/_____/_____

Grupo: ( ) VASELINA (**V**) ( ) CALÊNDULA (**C**) ( ) PRÓPOLIS (**P**)

( ) SULFADIAZINA DE PRATA (**S**) ( ) ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS (**A**)

Protocolo anestésico: ( ) Isoflurano ( ) Outro Qual? _____

Tempo anestésico: Início: _____Fim:_____Total:_____

Tempo de congelamento – JATO CONTÍNUO: _____

Tempo de congelamento – JATOS INTERMITENTES: _____

Tempo de descongelamento: _____

Tempo cirúrgico: Início: _____Fim: _____Total:_____

Intercorrência(s)? Qual(is)? _____

FERIDA DIREITA:

Extensão da Ferida: Crânio-caudal_____mm Látero-lateral _____mm

FERIDA ESQUERDA:

Extensão da Ferida: Crânio-caudal_____mm Látero-lateral _____mm

Tratamento: ( ) LIMPEZA COM NaCl 0,9%

( ) NENHUM TRATAMENTO

Número do Registro Fotográfico: _____

Observações:

APÊNCICE B - Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2014)

FICHA AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS

Animal: _____

Grupo: ( ) VASELINA (**V**) ( ) CALÊNDULA (**C**) ( ) PRÓPOLIS (**P**)

( ) SULFADIAZINA DE PRATA (**S**) ( ) ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS (**A**)

FERIDA DIREITA:

Extensão: Crânio-caudal_____mm Látero-lateral _____mm

1. Crosta (crionecrose): ( ) Não ( ) Sim ( ) Pouco aderida ( ) Muito aderida
2. Tecido de Granulação: ( ) Não ( ) Sim + ( ) Sim ++ ( ) Sim +++
3. ( ) Eritema ( ) Edema ( ) Prurido ( ) Secreção/Exudato ( ) Sangramento
   A) Localização na lesão: ( ) Margens ( ) Central ( ) Generalizado
   B) Localizado ao redor da lesão ( )
   C) Grau: ( ) Ausente ( ) Pouco ( ) Moderado ( )Acentuado
4. Dor local/Escore: ( ) Ausente ( ) Pouco ( ) Moderado ( ) Acentuado
5. Observações:

FERIDA ESQUERDA:

Extensão: Crânio-caudal_____mm Látero-lateral _____mm

1. Crosta (crionecrose): ( ) Não ( ) Sim ( ) Pouco aderida ( ) Muito aderida
2. Tecido de Granulação: ( ) Não ( ) Sim + ( ) Sim ++ ( ) Sim +++
3. ( ) Eritema ( ) Edema ( ) Prurido ( ) Secreção/Exudato ( ) Sangramento
   A) Localização na lesão: ( ) Margens ( ) Central ( ) Generalizado
   B) Localizado ao redor da lesão ( )
   C) Grau: ( ) Ausente ( ) Pouco ( ) Moderado ( )Acentuado
4. Dor local/Escore: ( ) Ausente ( ) Pouco ( ) Moderado ( ) Acentuado
5. Observações:

Data: _____ Examinadora: _____

Legenda: (0) Ausente (+) Pouco (++) Moderado (+++) Acentuado

APÊNCICE C - Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2014)

FICHA CONTROLE BIÓPSIA

Animal: _____ Peso: _____ g

Data da indução da ferida (CRIOCIRURGIA): _____/_____/_____

Data da biópsia: _____/_____/_____

Grupo: ( ) VASELINA (**V**) ( ) CALÊNDULA (**C**) ( ) PRÓPOLIS (**P**)

( ) SULFADIAZINA DE PRATA (**S**) ( ) ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS (**A**)

Extensão da Ferida DIREITA:

Crânio-caudal_____mm Látero-lateral _____mm

Extensão da Ferida ESQUERDA:

Crânio-caudal_____mm Látero-lateral _____mm

Número do Registro Fotográfico:_____

Destino do material:_____

Observações:

ANEXO A - Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2014)

HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 130376
Data da Versão do Projeto: 02/09/2013

Pesquisadores:
ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA
EMERSON ANTONIO CONTESINI
TUANE NERISSA ALVES GARCEZ
FERNANDA SOLDATELLI VALENTE

Título: TERAPIA TÓPICA NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS PROVOCADAS POR CONGELAMENTO COM NITROGÊNIO LÍQUIDO EM RATOS WISTAR

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 10 de outubro de 2013.

Dr. Alessandro Osvaldt
Coordenador CEUA/HCPA

ANEXO B - Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2014)

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO
HEMATOXILINA-EOSINA (HE)

Solução A: HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina ..... 0,5 g
Álcool absoluto ..... 5 ml
Alúmen de potássio ou amônio ..... 10 g
Óxido vermelho de mercúrio ..... 0,25 g
Água destilada ..... 100 ml

Preparo: Dissolver a hematoxilina no álcool, e o alúmen a quente na água. Misturar as duas soluções. Levar a mistura à ebulição o mais breve possível; depois de remover do fogo, juntar o óxido vermelho de mercúrio. Aquecer novamente a solução até ficar vermelha escura durante 1 minuto; em seguida, remover do fogo o recipiente e deixá-lo esfriar rapidamente em água fria ou na geladeira. A solução depois de esfriada está pronta para uso.

Solução B: EOSINA

Eosina Y (amarela hidrossolúvel) ..... 0,5 g
Água destilada ..... 10 ml
Álcool a 95% ..... 90 ml
Ácido acético (optativo) ..... 1 gota

Preparo: Dissolver a eosina Y em água destilada e depois juntar o álcool a 95%. A adição do ácido acético aumenta a intensidade da coloração, mas diminui a durabilidade do corante.

Solução C: DIFERENCIADOR

Álcool a 95% ..... 100 ml
Ácido clorídrico ..... 5 gotas

TÉCNICA:

1. Desparafinizar, alcoolizar e hidratar;
2. Hematoxilina durante 10 minutos;
3. Lavar em água corrente até azulecer os cortes;
4. Diferenciar rapidamente em álcool-ácido;
5. Lavar em água corrente, por 5 a 10 minutos;
6. Lavar rapidamente em álcool a 95%;
7. Eosina durante 1 a 2 minutos;
8. Diferenciar em álcool a 95%;
9. Desidratar, diafanizar e montar.

Fixação: Formol, Bouin, Duboscq-Brasil, Helly
Cortes: parafina ou congelação

ANEXO C - Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2014)

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO
TRICÔMICO DE MASSON (TM)

HEMATOXILINA DE WEIGERT

Solução A
Hematoxilina ..... 1 g
Álcool 95% ..... 100 ml

Solução B
Cloreto Férrico 30% ..... 4 ml
Ácido Clorídrico ..... 1 ml
Água destilada ..... 100 ml

Solução de trabalho: Juntar na hora do uso partes iguais da solução A e B.

CLORETO FÉRRICO 30%
Cloreto Férrico ..... 30 g
Água destilada ..... 100 ml

ÁCIDO ACÉTICO 1%
Ácido acético glacial ..... 1 ml
Água destilada ..... 100 ml

PONCEAU XILIDINE 1%
Ponceau Xilidine ..... 1 g
Ácido acético ..... 1 ml
Água destilada ..... 100 ml

FUCSINA ÁCIDA 1%
Fucsina ácida ..... 1 g
Ácido acético ..... 1 ml
Água destilada ..... 99 ml

Solução de trabalho: PONCEAU XILIDINE 1% ..... 1 ml
FUCSINA ÁCIDA 1% ..... 2 ml
(Não reaproveitar essa solução.)

ÁCIDO FOSFOMOLIBDICO 1%
Ácido fosfomolibdico ..... 1 g
Água destilada ..... 100 ml

LIGHT GREEN 2% (estoque)
Light Green ..... 2 g
Ácido acético ..... 1 ml
Água destilada ..... 99 ml

LIGHT GREEN 20% (uso)
Light Green 2% (estoque) ..... 20 ml
Água destilada ..... 100 ml

TÉCNICA:

1. Desparafinizar e hidratar;
2. Hematoxilina de Weigert (férrico), durante 5 minutos;
3. Lavar em água corrente, durante 5 minutos;
4. Ponceau Xilidine 1% + Fucsina ácida, durante 5 minutos;
5. Lavar em água destilada;
6. Ácido Fosfomolibdico 1%, durante 5 minutos;
7. Lavar em água destilada;
8. Light Green (solução uso – 20%), durante 15 minutos;
9. Lavar em água destilada;
10. Ácido acético 1%, durante 1 minuto;
11. Desidratar, clarificar e montar a lâmina.

ANEXO D - Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2014)

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO

AZUL DE TOLUIDINA (AT)

1. Azul de Toluidina ..... 1 g
2. Água destilada ..... 100 ml

TÉCNICA:

1. Desparafinizar e hidratar em água destilada;
2. Colocar na solução Azul de Toluidina a 1% (durante 2 minutos);
3. Lavar em água destilada;
4. Cobrir com lamínula;
5. Examinar o corte logo após a preparação.

ANEXO E - Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2014)

PROTOCOLO TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Fixação

Fixadores: substâncias químicas que mantém a integridade do tecido após a morte, sem alteração da estrutura celular, na unidade de Patologia Experimental (UPE) é utilizado o formol 10 % tamponado preparado da seguinte forma:

900 ml de água destilada;
100 ml de formalina 37%;
1 frasco de tampão PBS;

Em um frasco de vidro ou de plástico que comporte 20x do volume da amostra que não pode ser de espessura maior que 5mm.
O tempo de fixação é em média de 24h à 72h.

Descalcificação

Para que possa examinar o tecido ósseo ou tecido com área calcificada, este deve ser descalcificado, neste caso é utilizado na unidade de Patologia Experimental (UPE) o ácido nítrico 10% preparado da seguinte forma:

900 ml de água destilada;
100 ml de ácido nítrico;

Trocamos diariamente até obter o resultado desejado.

Processamento

Desidratação: processo de retirada da água do interior do tecido utilizando uma série gradativa de 8 alcoóis etílicos.
Uma rápida lavada em água 1° e 2° (50%), 3° e 4° (70%), 5° e 6º (80%), 7° (90%) e 8° absoluto.
Sendo uma hora em cada.

Diafanização

Entre a desidratação e a impregnação é necessário diafanizar a parafina, pois álcool e parafina não são miscíveis, o qual usamos o xilol em uma sequência de 2.

Impregnação em parafina

É utilizada duas parafinas a 65°C por uma hora cada, para que a peça possa passar para a inclusão em parafina.
O fragmento (peça) será retirado da cápsula e colocado em forma com parafina 65°C, seguindo a devida orientação de posição, considerando a área que será analisada na lâmina, identificando o bloco de parafina com a numeração previamente realizada e colocada dentro da cápsula respectiva.
Desenformar após o resfriamento.

Microtomia

Os cortes são realizados no micrótomo com a espessura e o ângulo convenientes ao tecido a ser trabalhado.

Lavagem de lâminas para sinalização

1. Colocar em cestos;
2. Colocar em cesto com lâminas em cuba com acetona;
3. Colocar em cestos com lâminas em cuba com organo-silano 10% por 1 min;
4. Colocar em cesto com lâminas em cuba com acetona;
5. Colocar em cesto com lâminas em cuba com acetona;

Imuno Histoquímica

1. Médico Patologista solicita imuno em um formulário específico (IHQ-MOD);
2. Técnica recolhe o material na sala de microscopia, leva até a área técnica onde se providencia blocos em parafina;

Corte de bloco de parafina

1. Realizar cortes de 3 micras em um bloco pré-preparado em organo-silano;
2. Centralizar o selo com o fragmento na lâmina;
3. Após identificação, colocar em um cesto para que seja desparafinizado;

Desparafinização e Hidratação

1. Colocar em estufa por 12 horas à 60°C ou por 40 minutos à 80°C;
2. Passar os cestos com as respectivas lâminas em cubas com:
3. Xilol por 5 minutos;
4. Xilol por 5 minutos;
5. Álcool;
6. Álcool;
7. Álcool;
8. Álcool;
9. Água destilada;
10. PBS, por 5 minutos;

Recuperação Antigênica

1. Lâminas em cuba frisada horizontal;
2. Incubação em tampão citratro pH 6 (0,02g de ácido cítrico em 1 L de água destilada, usando hidróxido de sódio para ajustar o pH);
3. 2 gotas de Tween;
4. Banho-Maria de 95°C, por 20 minutos;
5. Descansa por 10 minutos, com o Banho-Maria desligado;
6. Água destilada por duas vezes;
7. Em PBS, por 5 minutos;

Bloqueio da Peroxidase Endógena

1. Lâmina em imersão em cuba frisada, em sentido horizontal;
2. Fazer duas vezes o mesmo processo: deixar com peróxido de hidrogênio a 5% em metanol por 10 minutos;
3. 2x água destilada;
4. PBS, por 5 minutos;

Bloqueio das reações inespecíficas

1. Circular o corte das lâminas com caneta Dakopen;
2. Protein Block REF DPB-125 por 10 minutos;
3. PBS por 5 minutos;

Anticorpo Primário

1. Anticorpo específico diluído em PBS;
2. Pingar o anticorpo primário no centro do circulo;
3. Câmara por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente ou overnight em geladeira à 4°C;

Flash

1. Remoção do anticorpo primário;
2. Lavar lâmina por lâmina em água corrente 1x;
3. PBS, por 5 minutos 3x;

Anticorpo Secundário

1. Pingar na lâmina o anticorpo secundário;
2. Incubar por 30 minutos em câmara escura;
3. PBS, 3x por 5 minutos;

Streptavidina (Ligar Ac 1° e Ac 2°)

1. Pingar na lâmina a streptavidina em câmara escura;
2. Incubar por 30 minutos;
3. PBS, 3x por 5 minutos;

Revelação

Kit Dab:

1. 1,5 mL do diluente com 1 gota de cromógeno, pingar na lâmina, se positivo esperar, em média, por 1 minuto até obter um resultado em cor caramelo;
2. Água destilada;
3. Lâmina em cestos na cuba;

Contra coloração:

1. Hematoxilina de Harris por 20 segundos (contra coloração);
2. Água corrente;
3. Água amoniacal (amônia 2% em água destilada) para azular;
4. Água corrente;
5. Álcool por 3 vezes;
6. Xilol por 3 vezes;
7. Montagem de lâminas;