

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica  
experimental em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*)**

Fernanda Regina Loss

Porto Alegre

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica  
experimental em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*)**

Autora: Fernanda Regina Loss

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

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

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

Porto Alegre

2013

FERNANDA REGINA LOSS

CIP - Catalogação na Publicação

Loss, Fernanda Regina

Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos Wistar / Fernanda Regina Loss. -- 2013.  
80 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, 2013.

1. cirurgia animal. 2. cicatrização cutânea. 3. reparo tecidual. 4. marcador de proliferação celular. 5. queimadura química. 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).

**Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos  
Wistar (*Rattus norvegicus*)**

Aprovado em 26 de abril de 2013.

APROVADO POR

---

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dra. ANA HELENA DA ROSA PAZ

Membro da Comissão (UFRGS-HCPA)

---

Profa. Dra. DOMINGUITA LUHERS GRAÇA

Membro da Comissão (UFSM)

---

Prof. Dr. CARLOS AFONSO DE CASTRO BECK

Membro da Comissão (UFRGS)

## RESUMO

Estudos sobre cronificação têm se mostrado cada vez mais importantes, visto que, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária, tem sido comum a ocorrência de lesões crônicas, que muitas vezes apresentam dificuldade de cicatrização com terapia convencional. Por este motivo, o presente trabalho tem por objetivo estabelecer modelo de ferida crônica em ratos Wistar, com o uso de agentes químicos, comumente utilizados na rotina clínica como antissépticos, em doses consideradas tóxicas ao leito da ferida. Para isso, foram utilizados 48 ratos Wistar, machos, divididos em quatro grupos de 12 animais cada. (Controle, Polivinilpirrolidona - PVPI 1%, Clorexidina 1% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%). Os animais foram submetidos a anestesia inalatória e sofreram lesão circular de 1cm de diâmetro, confeccionada com o uso de trépano corneal. Foram realizadas duas feridas simétricas paralelas e em seguida à confecção iniciou-se a aplicação tópica dos agentes químicos, com auxílio de pipeta de 50µl, sendo instilados duas vezes ao dia, durante 15 ou 30 dias. As avaliações macroscópicas das feridas induzidas cirurgicamente eram realizadas a cada dois dias, através de medição com paquímetro, além de observação quanto a presenças de sangramentos e outras secreções. Foram avaliadas também através de histologia e imunohistoquímica. Como resultados o grupo PVPI teve maior taxa de contração, cicatrizando em menor tempo que o grupo controle, embora essa diferença de tempo não tenha sido significativa estatisticamente; apesar das feridas se apresentarem cicatrizadas macroscopicamente, à avaliação histológica foi possível perceber que haviam alterações, dignas de processo cicatricial em curso; o grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcionou resultados positivos perante aquilo que foi proposto. Sugere-se que novos estudos sejam realizados, com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nos quais os períodos de uso do agente sejam prolongados, superiores aos usados no presente estudo, utilizando ainda material de silicone, fixado nas bordas da ferida, com o intuito de evitar cicatrização por contração. Sugere-se também o uso de doses elevadas de analgésicos durante todo o tempo de experimento.

**Palavras-chave:** angiogênese, epitelização, marcadores de proliferação celular, queimadura química, reparo, tecido fibrovascular.

## **ABSTRACT**

*Research on chronic lesions have been of increased interest in both human and veterinary medicine, as different conditions can delay and lead to difficulties on wound healing, even after conventional therapy has been instituted. Although there are several reports on experimental models for the study of acute wound healing, the establishment of chronic lesions using chemical agents, for scientific purposes, is scarce. This study pursued the development of a chronic skin wound model with chemical substances routinely used as antiseptics, in concentrations considered detrimental to injured tissue. For that, forty-eight Wistar rats were divided in four groups of 12 animals each, for of one of the topical treatments: povidone-iodine solution, 1% chlorhexidine, 35% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and control with 0.9% saline solution (NaCl). Under general anesthesia, two circular full skin defects, with 1cm diameter, were produced (with a corneal trephine) in the dorsal cervical region of all the animals. Immediately after the incisions, 50µl of one of the treatments were administrated twice daily, for either 15 or 30 days. Macroscopic evaluations were performed every other day, recording wound size (with a pachymeter) and occurrence of bleeding or exudates. Microscopically, at day 15 or 30, histologic and immunohistochemical studies were carried out with the complete removal of the wound or cicatricial region. Macroscopically, the povidone-iodine group showed faster wound contraction and healing rate than the control, yet, this difference was not statistically significant. Although, under clinical observation, the incised regions presented scar tissue, the histopathological evaluation of the respective specimens showed uncompleted healing process features. The hydrogen peroxide demonstrated promising results to the proposed intent. However, a bigger sample is needed to ascertain the found evidences. Furthermore, studies with longer or more frequent periods of substance exposure, along with devices to circumvent wound contraction and higher doses of analgesics, are recommended.*

**Key-words:** *angiogenesis, epithelization, cellular proliferation markers, chemical burn, repair, fibrovascular tissue.*

## **LISTA DE FIGURAS**

- FIGURA 1** Esquema da estrutura da pele humana. Capturado de: <http://www.auladeanatomia.com/tegumentar>. Modificado em 21/01/2013, por LOSS, F.R. ....21
- FIGURA 2** Fases da cicatrização. Capturado de Fonder *et al.*, 2008. Modificado em 21/01/2013. A) Fase inflamatória: aumento da permeabilidade vascular, migração de células inflamatórias por quimiotaxia, secreção de citocinas e fatores de crescimento e ativação da migração de células. B) Formação de tecido granulação . Consiste de leito capilar, fibroblastos, macrófagos, rede de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. C) Diminuição na quantidade e tamanho dos fibroblastos e histiócitos, aumento na resistência elástica da ferida devido ao acréscimo total de colágeno e interligação entre as fibras que aumentam a espessura e compactação.....29
- FIGURA 3** Modelo de ferida experimental em porção dorsal cranial de rato. Adaptado de Galiano *et al.* (2004). Modificado por LOSS, F.R., 2013 .....33
- FIGURA 4** Pele, rato Wistar. Avaliação macroscópica. Aspecto das lesões no pós-operatório imediato, já com a primeira aplicação dos agentes químicos. A) PVPI 1%, B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%, C) Clorexidina 1% e D) NaCl 0,9% .....39
- FIGURA 5** Pele, rato Wistar. Avaliação macroscópica. Aspecto final das lesões, grupo 15 dias, após a indução das lesões. A) PVPI 1%. B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%. Destaca-se a presença de crosta no local de aplicação dos agentes. C) Clorexidina 1% e D) NaCl 0,9% .....39
- FIGURA 6** Pele, rato Wistar. Avaliação macroscópica. Aspecto final das lesões, grupo 30 dias, após indução das lesões. A) PVPI 1%, B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%, C) Clorexidina 1% e D) NaCl 0,9% .....40
- FIGURA 7** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nota-se a presença de acantose (seta reta) e a presença de crosta superficial na derme espessada por tecido fibrovascular (seta curva). HE, 5X .....44

- FIGURA 8** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Epitelização com acantose, paraceratose e crosta abundante (setas). HE, 10X .....45
- FIGURA 9** Pele, rato Wistar, grupo PVPI. Nota-se fibrose intensa na derme, representada por fibras colágenas desorganizadas e fibroblastos (seta). HE, 10X .....46
- FIGURA 10** Pele, rato Wistar, grupo PVPI. Presença de angiogênese (vaso com hemácias no seu interior), na derme superficial (seta). HE, 10X .....47
- FIGURA 11** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Presença de úlcera, sem epitelização na área ulcerada (seta curva). Presença de fibrose moderada (seta). HE, 5X.....48
- FIGURA 12** Pele, rato Wistar, grupo PVPI. Presença de crosta no local da ferida (seta). HE, 5X .....48
- FIGURA 13** Pele, rato Wistar, grupo Controle. Epiderme. **A)** Presença de fibras colágenas na derme superficial (seta) e **B)** derme profunda (seta curva). Picosirius Red, 40X .....49
- FIGURA 14** Pele, rato Wistar , grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Epiderme. **A)** Presença de folículo piloso (seta). **B)** Nota-se a presença de fibras colágenas na derme superficial e profunda. Picosirius Red, 40X .....49
- FIGURA 15** Pele, rato Wistar, grupo PVPI. Epiderme. Presença de fibras colágenas na derme superficial (setas). Picosiriud Red, 40X .....50
- FIGURA 16** Pele, rato Wistar, grupo PVPI. Epiderme. Presença de fibras colágenas na derme superficial (setas). Picosiriud Red, 40X .....51
- FIGURA 17** Pele, rato Wistar, grupo Clorexidina. Epiderme, camada basal. Forte expressão nuclear de Ki-67. Imuno-histoquímica 40X .....52



**FIGURA 18** A) Pele, rato Wistar, grupo Controle. Marcação nuclear, fortemente expressada pela proteína Ki 67 em epiderme. B) Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Intensa marcação nuclear na epiderme. C) Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Presença de úlcera, ausência de epiderme. e D) Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Formação de epiderme e forte expressão de Ki-67 nas bordas da ferida. Imuno-histoquímica 40X .....52

**FIGURA 19** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Presença de numerosos fibroblastos. Forte expressão nuclear de Ki-67 (setas). Evidência de angiogênese demonstrada através de expressão de Ki-67 (setas curvas). Imuno-histoquímica, 20X ...53

**FIGURA 20** Pele, rato Wistar , grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Angiogênese intensa. Expressão de VEGF no citoplasma das células, na derme superficial e profunda. Imuno-histoquímica, 20X .....54

**FIGURA 21** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Angiogênese na derme superficial. Expressão de VEGF no citoplasma das células endoteliais. Imuno-histoquímica, 40X .....54

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA 1** Grupos x agentes indutores. Fonte: Loss, 2013 .....34

**TABELA 2** Relação da taxa de contração média, considerando apenas os lados das feridas (direito e esquerdo). Não houve diferença significativa entre as variáveis analisadas .....42

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** Taxa de contração. Relação da taxa de contração média considerando o grupo e o dia avaliados. O eixo X representa os valores médios das taxas e o eixo Y representa os dias avaliados .....41
- GRÁFICO 2** Graduação da Inflamação. O eixo X representa os diferentes grupos avaliados e o eixo Y representa a quantidade de animais (*n*). Observa-se que o grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou, desde ausência de inflamação, até inflamação considerada intensa .....42
- GRÁFICO 3** Tipo da Inflamação. O eixo X representa os diferentes grupos avaliados e o eixo Y representa a quantidade de animais (*n*). Observa-se que o grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou inflamação crônica na grande maioria dos animais pertencentes a esse grupo .....43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Modelo experimental</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Pele, feridas e os mecanismos de reparo tecidual</b>	<b>20</b>
3.2.1	Anatomia e fisiologia da pele	20
3.2.2	Feridas	21
3.2.3	Feridas agudas e crônicas	24
3.2.4	Processo de reparação tecidual	25
<b>3.3</b>	<b>Agentes químicos utilizados como anti-sépticos</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais experimentais</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Procedimento anestésico</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Procedimento cirúrgico</b>	<b>33</b>
<b>4.4</b>	<b>Obtenção das amostras</b>	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>Método de indução de morte</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação macroscópica</b>	<b>35</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação morfométrica</b>	<b>35</b>
<b>4.8</b>	<b>Avaliação microscópica</b>	<b>35</b>
<b>4.9</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Modelo experimental</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Procedimento anestésico</b>	<b>37</b>
<b>5.3</b>	<b>Procedimento cirúrgico</b>	<b>37</b>
<b>5.4</b>	<b>Aplicação dos agentes químicos</b>	<b>37</b>
<b>5.5</b>	<b>Procedimentos pós-operatórios</b>	<b>38</b>
<b>5.6</b>	<b>Avaliação macroscópica</b>	<b>38</b>
<b>5.7</b>	<b>Avaliação morfométrica</b>	<b>40</b>
<b>5.8</b>	<b>Avaliação microscópica</b>	<b>41</b>

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
	<b>APÊNDICE 1 – Aprovação de projeto sob número 12-0213 .....</b>	<b>74</b>
	<b>APÊNDICE 2 – Ficha de controle cirúrgico .....</b>	<b>75</b>
	<b>APÊNDICE 3 – Ficha de avaliação macroscópica .....</b>	<b>76</b>
	<b>APÊNDICE 4 - Ficha de biópsia .....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O PPGCV-UFRGS (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul), em parceria com o Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA tem trabalhando de forma ativa no que diz respeito à cicatrização de feridas cutâneas agudas experimentais associadas ao uso de terapia celular. Nesse sentido, dois projetos foram desenvolvidos: GPPG 10-011 – “Células-tronco mesenquimais e eletroacupuntura na cicatrização cutânea” e GPPG 11-0359 – “Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas na cicatrização cutânea”.

No intuito de avançar essa linha de pesquisa, o grupo almeja estudar, também, o efeito da terapia celular em feridas cutâneas consideradas de caráter crônico. Diversas situações clínicas, dentre as quais queimaduras, traumatismos, infecções, doenças autoimunes e o que se classifica como feridas complexas, podem resultar na perda completa do revestimento cutâneo, acarretando predisposição a infecções, aumento das perdas insensíveis de água e hipotermia, podendo resultar ainda em feridas de difícil tratamento.

O estudo acerca da cronificação de feridas cutâneas tem se mostrado cada vez mais importante, visto que, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária, tem sido comum a ocorrência destas, que muitas vezes apresentam difícil tratamento com a terapia convencional.

Estudos têm sido realizados com diferentes protocolos de estabelecimento de modelos de feridas crônicas. Os modelos existentes até então são: isquemia tecidual (MOGFORD, et al., 2004; GOULD, et al., 2005; STEINBERG et al., 2012), uso contínuo de glicocorticóides (VASCONCELLOS et al., 2001; TENIUS et al., 2007), infecção de feridas (D'ACAMPORA et al., 2006; D'ACAMPORA et al., 2007) e até mesmo indução de diabetes (KIRSTEN et al., 2010; MA et al., 2012), todos visando o estabelecimento de uma ferida crônica. Entretanto, a maioria dos trabalhos não descreve, detalhadamente, o protocolo para indução da lesão, bem como os parâmetros de avaliação para que se possa considerar a ferida como crônica.

O presente estudo tem como objetivo a criação de um modelo experimental de ferida crônica com o uso de agentes químicos antissépticos em concentrações consideradas tóxicas. Dessa maneira, pretende-se maximizar o defeito cutâneo, produzindo uma lesão de difícil e prolongada cicatrização, visando aplicabilidade na medicina humana e na medicina veterinária.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estabelecer um modelo de ferida cutânea crônica em ratos Wistar, comparando o uso de agentes químicos, utilizados, comumente na rotina clínica, como antissépticos, em doses consideradas tóxicas, aplicadas no leito da ferida.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a área de contração da ferida cutânea através da medição com a utilização de paquímetro digital;
- Analisar os aspectos macroscópicos da lesão produzida aos 15 e 30 dias.
- Caracterizar os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos das lesões aos 15 e 30 dias.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O modelo experimental

O modelo experimental adotado para este estudo foi o rato Wistar, pertencente a linhagem albina, da espécie *Rattus norvegicus*, desenvolvida no Instituto Wistar na Filadélfia. Esta linhagem foi a primeira a ser utilizada como organismo-modelo em uma época na qual pesquisadores utilizavam, primariamente, camundongos da espécie *Mus musculus* (TUFIK *et al.*, 2004).

Esse modelo é utilizado para diversos propósitos, incluindo principalmente regeneração tecidual, reumatologia e endocrinologia (TUFIK *et al.*, 2004).

Como exemplo de estudo em cicatrização é possível citar o trabalho realizado por McFarlane e colaboradores em 1965, o qual objetivava a regeneração tecidual a partir de retalho cutâneo isquêmico, randômico, dorsal em ratos (*Rattus norvegicus*, *var. albinus*).

#### 3.2 Pele, feridas e mecanismos de reparo tecidual

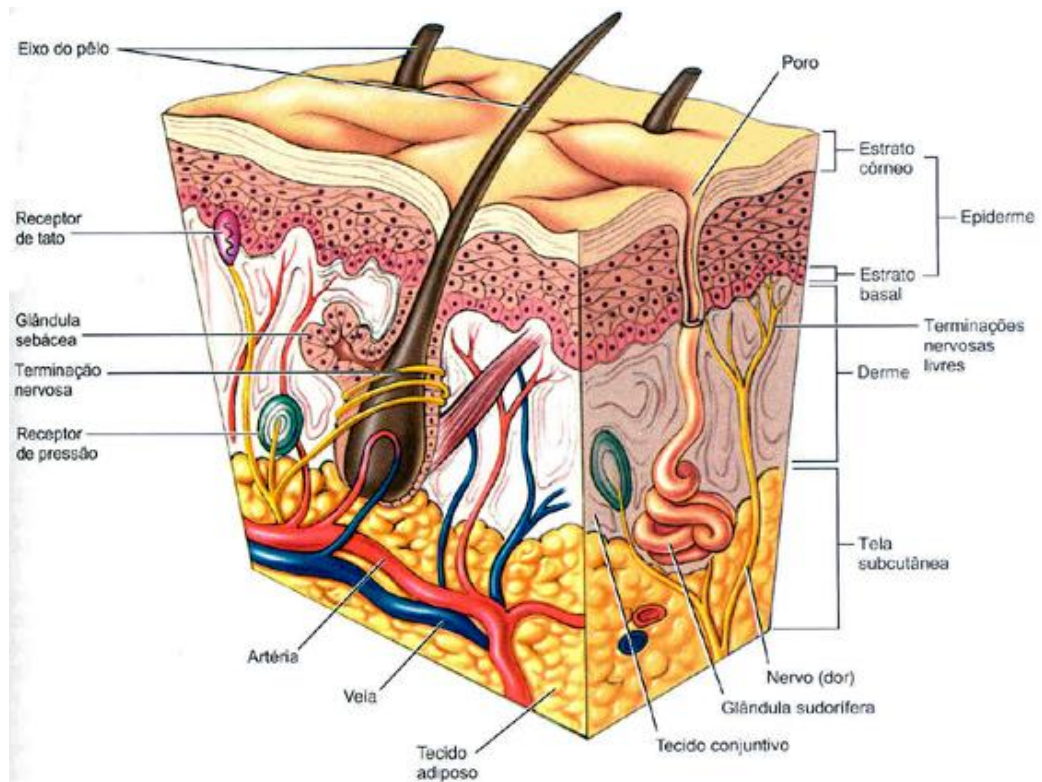
##### 3.2.1 Anatomia e Fisiologia da Pele

A pele é o maior órgão do corpo, recobrimdo-o em sua totalidade. É considerada a principal barreira do organismo e tem como funções básicas impedir a perda excessiva de líquidos; proteger da ação de agentes externos; manter a temperatura corpórea; sintetizar vitamina D, com a exposição aos raios solares; agir como órgão do sentido e participar da termorregulação (BLANES, 2004).

Histologicamente, a pele é dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme, firmemente unidas entre si. A epiderme é a camada mais externa, composta por quatro diferentes linhagens celulares: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células neuroendócrinas de Merkel. A derme é a camada mais profunda e é formada por tecido conjuntivo frouxo (camada papilar) e tecido conjuntivo denso (camada reticular) (Figura 1). A medida que camadas mais superficiais da epiderme são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular (BLANES, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; ALMEIDA, 2011).



A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo. Na derme situam-se os anexos da pele, muitos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Pode ser dividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais interna. 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. As fibras colágenas proporcionam grande força de tensão e as fibras elásticas dão flexibilidade à pele. Os plexos vasculares fornecem sangue para a epiderme, sem penetrá-la. O controle realizado pelo hipotálamo e pelas fibras nervosas simpáticas sobre o fluxo sanguíneo na derme, proporcionam um mecanismo de termorregulação (BLANES, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; ALMEIDA, 2011).



**Figura 1.** Esquema da estrutura da pele humana. Capturado de: <http://www.auladeanatomia.com/tegumentar>. Modificado em 21/01/2013, por LOSS, F.R.

### 3.2.2 Feridas

Ferida é considerada a lesão caracterizada pela ruptura da continuidade normal da estrutura do tecido (WALDRON & TREVOR, 1998).

Ferimentos cutâneos extensos podem ocorrer a partir de um traumatismo diretamente na pele ou em seu suprimento sanguíneo, secundários à dermatopatias necrosantes, e após a retirada em bloco de neoplasias cutâneas, subcutâneas ou de parede corporal. As considerações terapêuticas baseiam-se no tipo de ferimento cutâneo. Alguns desses ferimentos podem expor estruturas importantes ou serem de tal extensão, podendo causar morbidade no paciente, ou ainda, por estarem sobre articulações que devido à movimentação constante, tem sua cicatrização dificultada (PAVLETIC, 1999).

Os ferimentos basicamente são classificados como: a) abertos – lacerações ou perdas de pele; b) fechados- lesões por esmagamento e contusões. Feridas abertas podem ser classificadas pelo grau de contaminação em limpas e contaminadas. Limpas são aquelas criadas cirurgicamente. Contaminadas limpas têm contaminação mínima podendo ser efetivamente removida. Feridas contaminadas caracterizam-se pela intensa contaminação, e podem estar presentes corpos estranhos. Feridas sujas e infectadas são caracterizadas por processos infecciosos em curso. A infecção da ferida existe quando os microrganismos estabelecidos multiplicam-se no tecido do hospedeiro, considerando-se que uma ferida que contenha 10<sup>5</sup> microrganismos bacterianos por grama de tecido seja infectada (WALDRON & TREVOR, 1998; HOSGOOD, 2007).

A infecção retarda a cicatrização das feridas devido à separação física de suas superfícies, pelos processos exsudativos e, também, devido à produção de enzimas necrosantes, que fazem lise tecidual, afetam a atividade fibroblástica e diminuem a resistência da ferida. As mudanças de pH, induzidas por bactérias, também podem afetar os mediadores locais da cicatrização (BLANES, 2004).

Dealey (1996) e Borges *et al.* (2001) descrevem as formas de cicatrização de feridas e as denominam: de primeira intenção, quando não há perda de tecido e as extremidades da pele ficam justapostas uma à outra (feridas cirúrgicas); de segunda intenção, quando há perda de tecido e as extremidades da pele ficam distantes uma da outra, sendo necessária a formação de tecido de granulação, a contração e a reepitelização da lesão e de terceira intenção, quando há fatores como infecção da ferida, má nutrição, baixa perfusão de oxigênio nos tecidos, doença endócrina como o diabetes, obesidade, terapia em curso com glicocorticóides, radioterapia e quimioterapia, que retardam a cicatrização de uma lesão inicialmente submetida a um fechamento por primeira intenção. O processo cicatricial por primeira intenção geralmente ocorre dentro do tempo fisiológico esperado e, como consequência, deixa cicatriz mínima; o de segunda intenção envolve

extensa produção de tecido de granulação, requer maior tempo de reparo e produz uma cicatriz significativa e o de terceira intenção.

Em relação à extensão do defeito as feridas são classificadas como, superficiais quando restritas à epiderme, de perda parcial quando envolvem epiderme e parte da derme, e de perda total da continuidade do tecido quando há comprometendo da epiderme, derme completa e da tela subcutânea, podendo atingir músculos, tendões e ossos. De acordo com o tempo necessário para o reparo tecidual, estas, classificam-se em agudas, aquelas causadas por cirurgias ou traumas e com reparo em tempo adequado e sem complicações, ou crônicas, nas quais o reparo ocorre mais tardiamente, geralmente com complicações associadas e necessidade de intervenções mais complexas do que os métodos convencionais (BRYANT, 1992; MANDELBAUN *et al.*, 2003; BLANES, 2004).

Alguns autores propõem, ainda, uma subclassificação das feridas complexas. Estas seriam as feridas de difícil resolução, agudas ou crônicas, associadas a uma ou mais das situações seguintes: perda cutânea extensa, viabilidade dos tecidos comprometidos concomitante com isquemia e/ou necrose local, infecções agressivas e associação com doenças sistêmicas que causam prejuízo para os processos normais de cicatrização como diabetes e vasculopatias (HARDING *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2006).

Os primeiros cuidados com uma ferida devem ser a tricotomia ampla da área e a lavagem copiosa, com solução salina isotônica (NaCl 0,9%), ou solução de ringer lactato de sódio, para reduzir a quantidade de bactérias. Essas soluções são isotônicas, isosmóticas, estéreis e fisiológicas e não causam danos ao tecido. Entretanto, quando usadas em grandes quantidades para a lavagem da ferida, podem ocasionar uma certa reação tecidual semelhante ao edema. As soluções mencionadas não possuem ação antimicrobiana e dependem da ação mecânica proveniente do processo de lavagem para que ocorra a remoção das bactérias e *debris* celulares (SWAIN & HENDERSON, 1997; KNAPP, 2003).

Durante séculos, o tratamento de feridas variou com o objetivo de melhores resultados cicatriciais em um menor tempo. Com relação à conduta, as feridas podem ser submetidas ao tratamento conservador ou cirúrgico. A conduta conservadora é adotada nos pacientes sem condições clínicas, que indiquem tratamento cirúrgico, nas feridas pequenas e superficiais, e naquelas em estágios iniciais do seu desenvolvimento. A terapia conservadora compreende o uso de curativos e coberturas a exemplo do carvão ativado, do hidrocoloide, da sulfadiazina de prata, de debridantes tópicos como a papaína, a colagenase, o alginato de cálcio, e o hidrogel, de emolientes e de medidas sócio-educativas

como limpeza local da ferida e mudança dos hábitos de vida (MANDELBAUN *et al.*, 2003; BLANES, 2004).

O processo de cicatrização é contínuo, e cada fase é crucial para o resultado final, pois cada uma delas influencia o desenvolvimento e duração da fase seguinte. Portanto, o mais rápido reparo será o mais funcional e cosmeticamente aceitável (SWAIN & HEDERSON, 1997).

### 3.2.3 Feridas agudas e crônicas

Quanto ao desenvolvimento e duração, as feridas podem ser classificadas em agudas ou crônicas. A ferida aguda caracteriza-se pela ruptura da vascularização e, nessa reação, ocorrem modificações anatômicas predominantemente vasculares e exsudativas. Além disso, respondem de maneira rápida ao tratamento e cicatrizam sem maiores complicações. São exemplos de feridas agudas aquelas ocasionadas por queimaduras e por traumas (FONSECA, 2011).

Na ferida crônica, o processo de cicatrização se caracteriza por resposta inflamatória mais proliferativa (fibroblástica), do que exsudativa. A cicatrização é lenta, mais de quatro semanas, a inflamação é prolongada e desorganizada. Há deposição insuficiente de matriz celular, diminuição da neovascularização, demora na reepitelização e pode ser causada por injúria química ou física. Como exemplo, é possível citar: lesões por queimaduras graves, lesões em pacientes diabéticos, feridas com processo necrótico extenso, feridas crônicas relacionadas à vasculite e terapia imunossupressora. Essas tendem a se tornar infectadas e, normalmente, apresentam calor, rubor, dor, odor fétido, perda da tensão de oxigênio transcutânea, presença de tecido necrosado e retardo na cicatrização. Poderá haver, ainda, evolução para linfangite, aumento do tamanho da ferida com secreção purulenta, desvitalização do tecido de granulação e tecido de granulação friável (FONSECA, 2011).

Uma característica marcante da inflamação crônica é a proliferação de monócitos. Isso acontece quando há presença de um agente causador da lesão, de forma prolongada, como material ou corpo estranho ou até mesmo bactérias, desencadeando tal proliferação celular (HOSGOOD, 2007). De modo geral, as feridas agudas respondem de maneira rápida, cicatrizam sem maiores complicações. Enquanto as feridas crônicas são de longa duração, podendo reincidir, frequentemente (FONSECA, 2011).

Embora não se possa definitivamente acelerar o processo de cicatrização, vários fatores afetam adversamente sua taxa. Entre esses fatores estão a má nutrição, hipovolemia e hipotensão, hipóxia, hipotermia, infecção, trauma e o uso de medicamentos de ação anti-inflamatória, conforme descrito anteriormente. A adequada manipulação destes fatores contribui para a manutenção das condições ideais facilitando a cicatrização normal (NETO, 2011).

#### 3.2.4 Processo de Reparo Tecidual

O processo de reparo tecidual compreende dois mecanismos de restauração dos tecidos: a regeneração e a cicatrização (BLANES, 2004; ALMEIDA, 2011).

A cicatrização de uma ferida é uma designação usada de maneira genérica, para descrever os mecanismos do hospedeiro envolvidos no processo de restauração da continuidade dos tecidos. A cicatrização progride através das mesmas fases, na maioria dos tecidos acometidos. Em mamíferos, é um processo de reparo, por isso é mais apropriado denominar reparo da ferida (HOSGOOD, 2007).

O reparo da ferida envolve vários mecanismos básicos, inclusive a angiogênese, a deposição de matriz de tecido conjuntivo, a epitelização, o remodelamento e a contração da ferida (HOSGOOD, 2007; TOBIAS, 2011).

A regeneração ocorre com reposição tecidual "original". O trauma inicial gera uma resposta inflamatória aguda, manifestada através de edema e formação de exsudato seroso, rico em leucócitos e cessa em menos de 24 horas. As células epidérmicas, das margens da ferida, das invaginações epidérmicas dos folículos pilosos e das glândulas sudoríparas e sebáceas, começam a proliferar e migrar no leito da ferida, preenchendo rapidamente sua superfície. O processo de cicatrização de feridas é composto de uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, que são descritos em fases. Do ponto de vista morfológico, identificam-se três fases consecutivas, havendo um dinamismo com sobreposição entre elas (BLANES, 2004; ALMEIDA, 2011).

3.2.4.1 Fase inflamatória (0 a 3 dias): imediatamente após a lesão há vasoconstrição por 5 a 10 minutos, inicialmente reflexa, propiciando o fechamento dos vasos lesados. Em seguida, as células endoteliais retraem-se e perdem suas conexões, aumentando a permeabilidade vascular e permitindo a passagem dos elementos sanguíneos para a ferida como o plasma, eritrócitos e leucócitos, através do fenômeno de diapedese. A

vasodilatação com o 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 essas alterações, que correspondem à resposta vascular, existe uma resposta celular. Algumas células são importantes nesta fase como os neutrófilos, responsáveis pela digestão de bactérias e tecidos desvitalizados, bem como, os monócitos que transformam-se em macrófagos e auxiliam os macrófagos residentes na fagocitose de bactérias e de restos celulares. Após o trauma, são liberados mediadores celulares como a histamina, a serotonina, a bradicinina, os prostaglandinas e os tromboxanos, as linfocinas, e a interleucina 1 e 2, os quais estimulam a elaboração de substâncias, que desenvolvem o fenômeno inflamatório, o fator de crescimento é liberado pelas células epidérmicas e plaquetas. (BLANES, 2004; ALMEIDA, 2011) (Figura 2A).

3.2.4.2 Fase de proliferação, fibroblástica ou de reparo (1 a 14 dias): inicia por volta de seis horas pós-lesão tecidual, com aparecimento de neutrófilos polimorfonucleados e monócitos, que ficam até completarem a cicatrização, ocorrendo deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e a regressão endotelial. É a fase de limpeza da ferida, quando ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio. Na reparação do tecido conjuntivo ocorre a formação do tecido de granulação, com proliferação endotelial e fibroblastos. O fibroblasto surge por volta do segundo e terceiro dia após o trauma, sendo uma célula fusiforme, com núcleo oval. O fibrinogênio do exsudato inflamatório transforma-se em fibrina, formando uma rede, onde os fibroblastos depositam-se, passam a multiplicar-se e a secretar os componentes protéicos do tecido cicatricial (matriz e fibras). Concomitante a esta fibroplasia, ocorre intensa proliferação vascular. Este tecido formado por fibroblastos, substâncias produzidas por eles e vasos sanguíneos é denominado tecido de granulação, clinicamente apresentando-se com aspecto granular e avermelhado (SWAIM, 1997) (Figura 2B).

Os miofibroblastos estão presentes no tecido de granulação e conferem capacidade contrátil, reduzindo a área cruenta e facilitando a epitelização. A atividade mitótica dos fibroblastos praticamente desaparece em torno do 15º dia. Esses passam a secretar as proteínas presentes no tecido de granulação, produzindo componentes da substância fundamental amorfa e colágeno. A substância fundamental amorfa é formada por água, eletrólitos e glicosaminoglicanos, tem aspecto semelhante a um gel e está distribuída entre fibras do tecido conjuntivo. A formação do epitélio é outro fenômeno que ocorre nessa

fase. A epitelização faz-se pelo aumento de tamanho, da divisão e da migração das células da camada basal da epiderme por sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente. Nas feridas com perda total da derme, a epitelização se faz apenas nas margens da mesma, pois não há anexos cutâneos remanescentes, que fornecem as células para multiplicação (BLANES, 2004; ALMEIDA, 2011).

A remodelação do colágeno inicia-se na formação do tecido de granulação e mantém-se por meses após a reepitelização. As colagenases e outras proteases produzidas por macrófagos e células epidérmicas e os miofibroblastos dão direção correta às fibras colágenas difusas. Há diminuição de todos os elementos celulares, inclusive dos fibroblastos, bem como dos elementos do tecido conjuntivo. A regressão endotelial ocorre através da diminuição progressiva dos vasos neoformados. Assim, clinicamente a cicatriz se torna menos espessa, passando de uma coloração rosada para esbranquiçada (MURPHY e WARD, 2010).

Os fatores mais importantes que influenciam a epitelização são os de crescimento de macrófagos e de plaquetas. Os 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. As células endoteliais seguem os fibroblastos migrando para dentro da ferida. Esses “botões” capilares são responsáveis pelo brilho vermelho no tecido de granulação saudável (SWAIN, 1997).

As células epiteliais migram sobre a escara, para o centro da lesão, através da malha de fibrina-fibronectina. A fibrina desaparece com a deposição do colágeno, sendo que acumula-se durante as três primeiras semanas de cicatrização. O novo colágeno pode ser observado no segundo dia após o início da reparação, chegando a seu nível máximo de produção no quinto ou sétimo (ANDERSON, 1996).

Quando ocorre perda tecidual, a tensão nas bordas, pela elasticidade natural da pele, distende o coágulo de fibrina. Assim, permite a orientação dos componentes fibrinosos perpendiculares às bordas, e os fibroblastos seguirão essa orientação (RAISER, 1995a). Uma vez epitelizada a ferida, a angiogênese e a fibroplasia são inibidas pelas células epiteliais (THOMSON, 1983).

Os principais fatores que retardam a cicatrização são as infecções, tecido de granulação excessivo, as mudanças repetidas de curativos, hipotermia, hipoproteinemia, baixa tensão de oxigênio, dissecação da superfície da ferida, anemia, uremia, diabetes, hiperadrenocorticismismo, doença hepática, uso de fármacos citotóxicos, anti-inflamatórios

não-esteroidais (AINE'S) e corticoesteróides, (ANDERSON, 1996; HOSGOOD, 2007; TOBIAS, 2011).

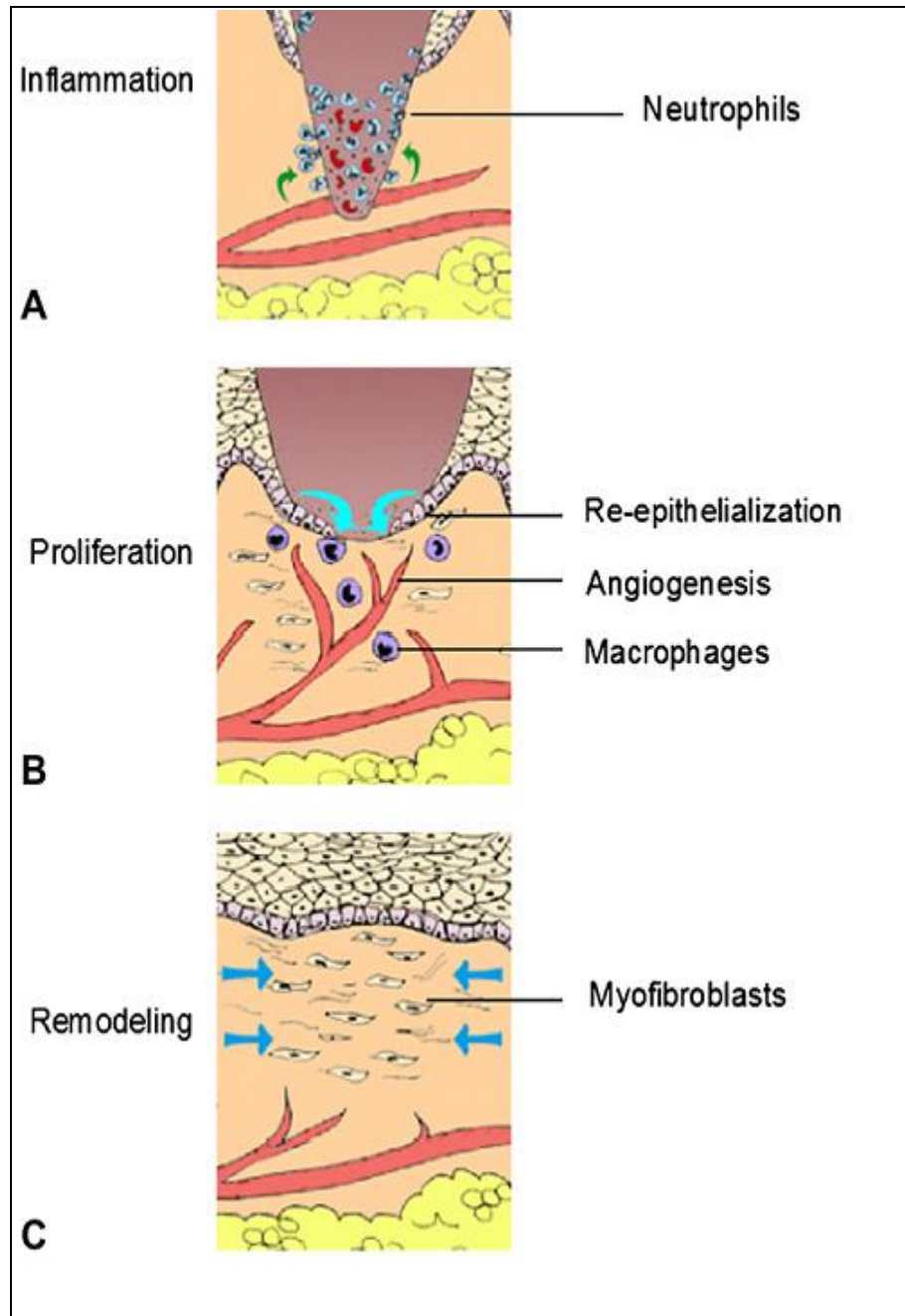
3.2.4.3 Fase de Maturação ou Remodelação (14 dias a 1 ano): representa a fase final da cicatrização para uma ferida que corresponde à remodelação e restauração da estrutura normal dos tecidos (ANDERSON, 1996).

Inicia-se após a proliferação celular, tendo relação com a diminuição na quantidade e no tamanho dos fibroblastos e histiócitos no tecido de granulação e à diminuição da formação de novos capilares. Consequentemente, diminui a síntese de colágeno, havendo maior equilíbrio na relação produção/lise de colágeno. Inicia-se, a seguir, um gradual aumento na resistência elástica da ferida, devido ao acréscimo total de colágeno e interligação entre fibras, que aumentam a espessura e a compactação. Sendo assim, os fibroblastos e as fibras vão alinhando-se ao longo das linhas de tensão, porém não serão como as originais, pois ficam de 15 a 20% mais fracas (RAISER, 1995a; ANDERSON, 1996).

A seguir, as colagenases começam a dissolver as fibras de colágeno não funcionais, enquanto que as funcionais predominam e, por inibição de contato, finaliza-se a migração epitelial (RAISER, 1995b; ANDERSON, 1996) (Figura 2C).

No fechamento das feridas, o processo ocorre por contração ativa de miofibroblastos com fibras de actino-miosina, que conectam-se com outras células. Na contração, as fibras de colágeno se sobrepõem. Esse processo inicia, aproximadamente, no terceiro ou quarto dia, concomitante à epitelização. A contração conduz a pele para o centro da ferida, levando à redução temporária da espessura com o aumento da tensão da pele adjacente (RAISER, 1995b; ANDERSON, 1996). A contração cessa quando um lado da ferida toca o lado oposto ou quando a tensão da pele ao redor iguala a tensão da atividade proveniente dos fibroblastos e miofibroblastos (FONSECA, 2011).





**Figura 2:** Fases da cicatrização. Capturado de Fonder *et al.*, 2008. Modificado em 21/01/2013. A) Fase inflamatória: aumento da permeabilidade vascular, migração de células inflamatórias por quimiotaxia, secreção de citocinas e fatores de crescimento e ativação da migração de células. B) Formação de tecido granulação . Consiste de leito capilar, fibroblastos, macrófagos, rede de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. C) Diminuição na quantidade e tamanho dos fibroblastos e histiócitos, aumento na resistência elástica da ferida devido ao acréscimo total de colágeno e interligação entre as fibras que aumentam a espessura e compactação.

### 3.3 Agentes químicos utilizados como antissépticos

A clorexidina foi descoberta no final de 1940 e pela sua eficiente ação antimicrobiana passou a ser usada como antisséptico. Pertence ao grupo das biguanidinas e, atualmente, o digluconato de clorexidina, por ser mais solúvel, é a preparação mais utilizada. Sua ação, praticamente imediata (cerca de 15 segundos após fricção), apresenta baixo potencial de toxicidade, atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, bem como baixa irritabilidade. A eficácia da clorexidina diminui, rapidamente, na presença de material orgânico como pus ou sangue. Apesar de trabalhos *in vitro* demonstrarem o efeito citotóxico da clorexidina, estudos em animais e em seres humanos demonstraram uma ação eficaz também, no processo de reparação tecidual em virtude, principalmente, de sua propriedade antibacteriana (SILVA *et al.*, 2000; CAVALCANTI NETO *et al.*, 2005).

Cavalcanti Neto *et al.* (2005) citam em seu estudo que feridas cutâneas tratadas com solução aquosa de digluconato de clorexidina a 0,12% apresentaram cicatrização mais rápida quando comparadas àquelas tratadas com fitoterápicos. Entretanto, Hosgood (2007) cita que concentrações de clorexidina superiores a 0,013% são citotóxicas para os fibroblastos caninos *in vitro*. No entanto, observou-se sobrevivência significativa de *Staphylococcus aureus* com concentrações inferiores a 0,05%. O referido autor cita, também, que a clorexidina em concentrações de 0,5 a 1% é considerada citotóxica, não sendo recomendado o contato prolongado desse antisséptico em tecidos lesados.

O polivinilpirrolidona (PVPI), composto do grupo dos halogênios, foi utilizado pela primeira vez em 1939, como antisséptico, na forma de tintura. Penetra na parede celular alterando a síntese de ácido nucléico através da oxidação. É indicado em pele íntegra e é contra indicado em feridas abertas, pois pode ocasionar queimadura química. Seu tempo de ação é quase imediato, devendo, entretanto, ser retirado da pele após secagem, uma vez que ocasiona irritação persistente e, por vezes, reação de hipersensibilidade. O poder bactericida do iodo baseia-se nas alterações do ácido nucléico e da síntese protéica bacteriana. Faz parte de sua composição o álcool etílico, que é um composto químico orgânico, com várias concentrações. A ação germicida é quase imediata, porém não possui ação residual (SILVA *et al.*, 2000; FERREIRA, *et al.*, 2003).

Hosgood (2007) cita que concentrações de iodo povidona superiores a 0,5% são citotóxicas para os fibroblastos caninos *in vitro*, mas para eliminar *Staphylococcus aureus*

são necessárias concentrações acima de 1%. O iodo com povidona inibe a migração de neutrófilos e é citotóxico para linfócitos e monócitos em concentrações superiores a 0,05%.

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é um oxidante bastante versátil, superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Através de catálise, o  $H_2O_2$  pode ser convertido em radical hidroxila (OH) com reatividade inferior apenas ao flúor. É utilizado de diferentes formas, em diversas áreas, como na de alimentos, medicamentos, para desinfecção e inibição de crescimento de bactérias. O  $H_2O_2$  está presente em inúmeras reações biológicas como principal produto de várias oxidases e tem importância significativa na quantificação desses bio-processos (MATTOS, *et al.*, 2003). Esse produto tem um efeito oxidante que destrói as bactérias anaeróbicas, mas perde seu efeito quando entra em contato com material orgânico como pus. Villa *et al.* (2003) citam em seu estudo sobre cicatrização de feridas cirúrgicas, que nos grupos experimentais, nos quais utilizou-se água oxigenada (10 volumes), os fenômenos biológicos ocorridos provocaram atraso no processo de cicatrização das feridas, quando comparado aos outros grupos.

Há grande controvérsia sobre a utilização desses agentes químicos em feridas cutâneas, quanto ao real benefício que possam trazer ao processo de reparo tecidual ou mesmo ao controle da infecção das lesões. A maioria dos estudos pesquisados recomenda que tais agentes, comumente empregados para higienização, limpeza e proteção das áreas periféricas das lesões não sejam aplicados no leito da ferida (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais experimentais

Foram utilizados 48 ratos Wistar, linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, machos, com sete semanas de idade, pesando em média 300-330g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas-RS. Os animais foram alojados em gaiolas retangulares de polipropileno, medindo 49x34x16cm, acomodando cinco animais em cada gaiola, durante dez dias, antes do início dos procedimentos, para adaptação dos mesmos na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA). A temperatura e a umidade do ar foram controladas (18°C e 68%, respectivamente) e a alimentação fornecida consistia de ração comercial peletizada específica para a espécie e água *ad libitum*.

Após o período de adaptação, os animais foram separados, aleatoriamente, mantidos nas mesmas gaiolas de acrílico, porém isolados individualmente. Para evitar o estresse, devido ao isolamento e manipulação diária, eram distribuídos, diariamente, porções de amendoim com casca e, também, papel toalha para que tivessem atividade de picotear o descascar, com a finalidade de enriquecimento ambiental.

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), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, respeitando a legislação vigente, Lei de Biossegurança número 11.105, aprovada em março de 2005. O presente projeto foi avaliado e, também, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCPA, onde está cadastrado sob o protocolo de número 12-0213 (Apêndice 1).

### 4.2 Procedimento anestésico

Em função do tempo cirúrgico ser de, aproximadamente, cinco minutos, verificado através de projeto piloto, optou-se por realizar anestesia inalatória com Isoflurano, antecedido de medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol (10mg.kg<sup>1</sup>), administrado por via intramuscular (IM).

Com os animais sob sedação, realizou-se ampla tricotomia na região dorsal, entre a região das escápulas, até o final das costelas. Em seguida, realizou-se antisepsia do local com digluconato de clorexidina a 0,2%.

A anestesia foi induzida e mantida com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100% administrado através de máscara facial. Durante o transoperatório os animais foram acompanhados com auxílio de monitor multiparamétrico, para registro da frequência cardíaca, frequência respiratória e oximetria.

### 4.3 Procedimento cirúrgico e agentes indutores

Com o animal sob anestesia geral inalatória, posicionado em decúbito ventral, delimitou-se, com o auxílio de um molde circular (trépano corneal 1cm), duas áreas circulares da pele, da região dorsal, aproximadamente 1cm da borda escapular, sendo uma no antímero direito e a outro no esquerdo, distantes uma da outra, cerca de 1cm (Figura 3). A pele das áreas demarcadas foi removida, com o auxílio de pinça Adson sem dente e tesoura de Matzembraum, através de dissecação. A profundidade da ferida incluiu a epiderme, a derme e a hipoderme até a superfície externa das fâscias musculares. O sangramento eventual foi controlado por meio de compressão local, com o auxílio de gases estéreis.



**Figura 3.** Modelo de ferida experimental em porção dorsal cranial de rato. Adaptado de Galiano *et al.* (2004). Modificado por LOSS, F.R., 2013.

As feridas confeccionadas permaneceram abertas e receberam duas doses locais diárias de 50µl dos agentes indutores digluconato de clorexidina 1%, PVPI 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%, e NaCl 0,9%, conforme Tabela 1, sendo instilados com o auxílio de uma pipeta.

**TABELA 1:** Grupos X agentes indutores

Agente indutor Grupo	NaCl 0,9%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35%	PVPI 1%	CLOREXIDINA 1%
<b>Controle</b>	+	--	--	--
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%</b>	--	+	--	--
<b>PVPI 1%</b>	--	--	+	--
<b>CLOREXIDINA 1%</b>	--	--	--	+

4 grupos n=(12) animais. Avaliação em tempo de 15 dias (6 animais) e 30 dias (6 animais).

Fonte: Loss, 2013.

#### 4.4 Obtenção das amostras

Decorridos os períodos preestabelecidos (15 e 30 dias), reoperaram-se os animais sob o mesmo protocolo anestésico descrito, anteriormente. Em seguida procedeu-se à remoção completa da ferida, incluindo 2 mm além da sua interface entre o tecido sadio e a cicatriz em toda a extensão das bordas das feridas, tanto do antímero direito, quanto do esquerdo.

Logo, os fragmentos foram biopsiados e identificados quanto ao lado, se direito ou esquerdo, e foram mantidos em formaldeído a 10% e posteriormente, incluídos em parafina e processados de forma rotineira para análise histopatológica.

#### 4.5 Método de indução de morte

Ao término dos períodos de avaliação (15 e 30 dias), todos os animais foram submetidos à eutanásia através de anestesia inalatória com isoflurano, seguida de método físico com o uso de guilhotina. Para isto, preencheu-se a ficha de biópsia (Apêndice 4).

#### 4.6 Avaliação macroscópica

Os animais foram avaliados diariamente e os dados do procedimento cirúrgico e análises macroscópicas colhidas através de ficha desenvolvida por GARCEZ (2012) e adaptada para este estudo (Apêndice 2 e 3). Foram os parâmetros clínicos como coloração, aspecto das bordas, presença de crostas, presença de tecido de granulação, sinais de dor local, sangramentos e secreções, todos graduados de acordo com sua gravidade em ausente, leve, moderado ou intenso.

#### **4.7 Avaliação morfológica**

As feridas foram mensuradas em duas direções, o maior comprimento (c= medição crânio-caudal) pela maior largura (l= látero-lateral), com o auxílio de um paquímetro digital, nos dias zero, dois, quatro, seis, sete, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 30. A partir destes dados foi possível calcular a área da lesão em cada avaliação. 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 (dois, quatro, seis, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 30), de forma que  $C = A_0 - A_1$ . A taxa de contração cicatricial (TC) foi avaliada a partir dos resultados prévios onde  $TC = C \times 100 / A_1$ .

#### **4.8 Avaliação microscópica**

Os fragmentos biopsiados foram fixados em formol tamponado a 10% e após 48 horas, as amostras foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Os cortes histológicos com espessura de 4-6 micrômetros foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), e avaliados globalmente, considerando as seguintes variáveis: epitelização, graduação da inflamação, tipo de reação inflamatória, fibrose e neovascularização. Foi realizada também coloração de Picrosirius Red, para avaliar a presença de fibras colágenas existentes nos locais de reparo.

Foi efetuada avaliação imuno-histoquímica, sendo utilizados os anticorpos Ki-67, marcador de proliferação celular positivo em núcleos comprometidos a entrar em mitose (BARRA, 2006; MOTTA, 2008) e o VEGF (vascular endothelial growth factor), para

observação de novos vasos sanguíneos (BARRA, 2006; MUTSCHALL, 2009). Foram consideradas, na HE, a presença de acantose, epitelização, graduação da inflamação, tipo de reação inflamatória, fibrose, neovascularização, ulceração e hemorragia.

As lâminas foram examinadas por um observador que, desconhecia a qual grupo pertencia cada material sob análise. Foram utilizadas, para essas avaliações, variáveis categóricas, classificadas em: ausente, mínimo, moderado e intenso, para avaliação das variáveis observadas na coloração HE e 0, 1 (até 25%), 2 (25%-50%), 3 (50%-75%) e 4 (>75%), adaptado de Allred (1998), para variáveis das colorações Picrosirius Red, Anti Ki-67 e VEGF.

#### **4.9 Análise estatística**

Após a tabulação dos dados obtidos na macroscopia, foi utilizada a metodologia de modelos de Equações de Estimação Generalizadas (EEG), que incorpora a estimativa dos dados provenientes da mesma unidade experimental ao longo do tempo (medidas repetidas). Esse tipo de modelagem não exige que haja independência entre os valores observados no experimento, tal como é pressuposto nos Modelos Lineares Generalizados. No entanto, na metodologia de EEG, pode-se estimar, por meio da Matriz de Correlação de Trabalho, a forma pela qual os dados repetidos se correlacionam ao longo do tempo (HARDIN e HILBE, 2003).

Para a avaliação dos resultados obtidos das avaliações microscópicas quanto à histopatologia e à imunoistoquímica, foi usada a metodologia do teste não paramétrico Qui-Quadrado, um teste de hipóteses, onde o objetivo é encontrar o valor da dispersão de duas ou mais variáveis e avaliar a associação entre elas.



## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Modelo experimental**

O modelo experimental adotado para esse estudo (ratos da colônia Wistar - *Rattus norvegicus*) mostrou-se adequado, cumprindo os objetivos aos quais foi desafiado. As etapas anestésicas e cirúrgicas transcorreram sem intercorrências. Para a execução da metodologia proposta, o modelo permitiu de forma acessível a padronização das feridas, além da indução de duas feridas simétricas paralelas.

### **5.2 Procedimento anestésico**

O protocolo anestésico empregado foi adequado para às necessidades inerentes à intervenção cirúrgica proposta, ou seja, rápida, não cruenta e de baixo nível algico. A recuperação pós-operatória dos animais, após a suspensão do anestésico volátil foi adequada, assim como a analgesia, podendo-se constatar o regresso às atividades logo que retornavam para o alojamento.

### **5.3 Procedimento cirúrgico**

O procedimento cirúrgico foi considerado rápido e de fácil execução, levando, em média, cinco minutos. Além disso, foi bem tolerado pelos animais, os quais permaneceram saudáveis, durante todo o período experimental.

### **5.4 Aplicação dos agentes químicos**

As aplicações dos agentes químicos, realizadas com o auxílio de micropipeta de 50µl, diariamente, duas vezes ao dia, proporcionou observar agressividade moderada, nos animais que receberam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao longo do experimento. Diferentemente dos outros grupos, os quais permaneceram dóceis ao longo do estudo.

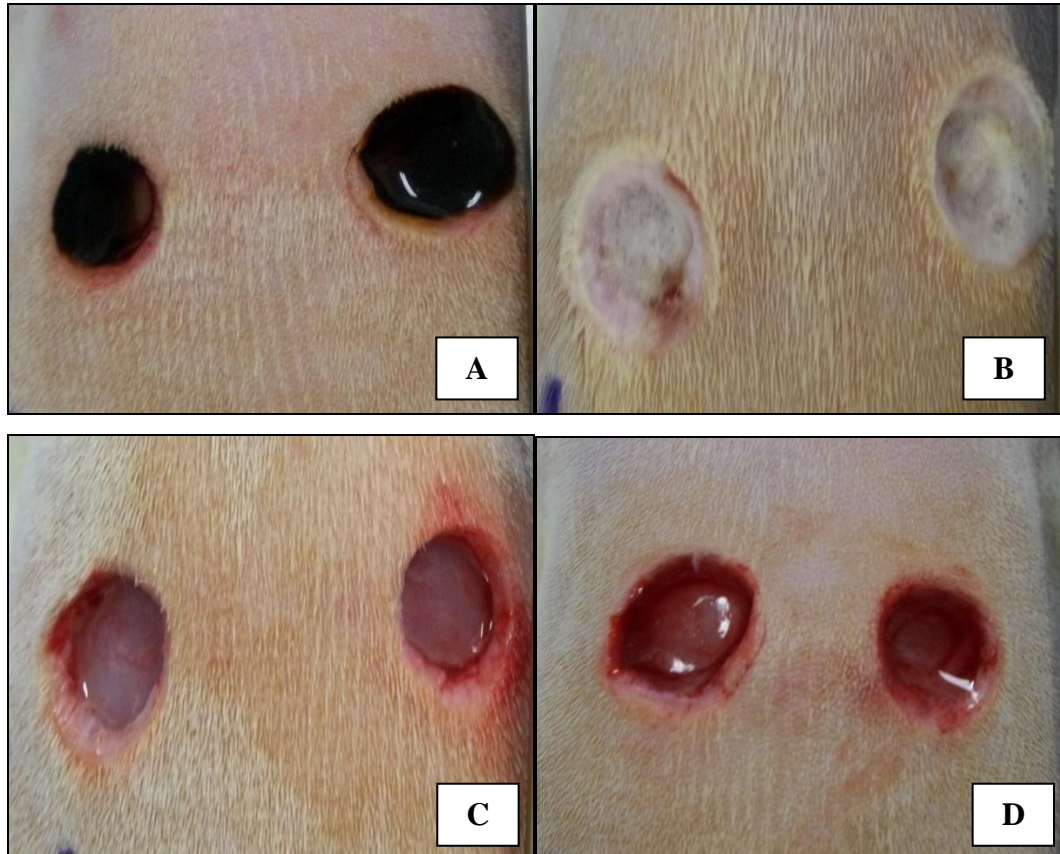
## 5.5 Procedimento pós-operatório

A utilização de analgesia (cloridrato de tramadol), duas vezes ao dia, durante três dias, após o procedimento de indução de feridas, demonstrou ser eficiente para o controle da dor. No entanto, os animais que receberam  $H_2O_2$ , demonstraram bastante desconforto local, após as aplicações, ao longo do tempo de experimento. Em virtude de permanecerem isolados, afim de evitar mutilações, os animais recebiam diariamente, amendoim torrado, com casca, e papel toalha, no intuito de enriquecer o ambiente e evitar o estresse por isolamento.

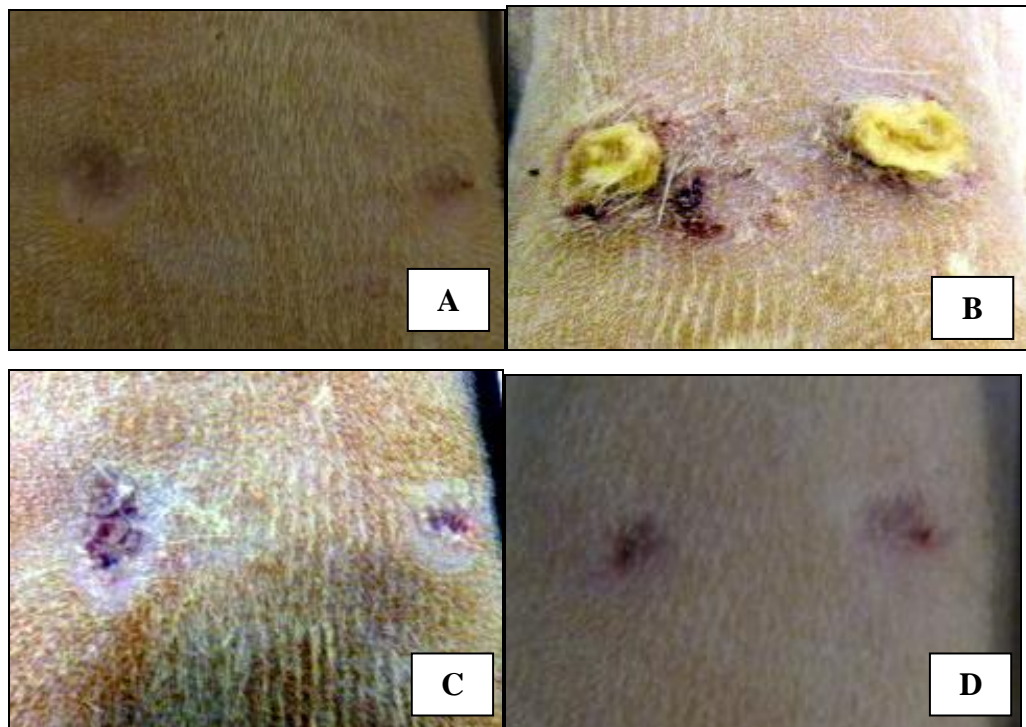
## 5.6 Avaliação macroscópica

Os animais foram avaliados, diariamente, e os dados macroscópicos colhidos foram organizados e formaram a tabela de parâmetros clínicos, incluindo a coloração, aspecto das bordas, presença de crostas, presença de tecido de granulação, sinais de dor local, sangramento e secreções, (Figuras 4, 5 e 6), foram avaliados através de graduação de acordo com a sua gravidade. Esta avaliação foi utilizada apenas como controle da evolução das feridas e possíveis alterações como contaminação, exsudação excessiva, auto-traumatismo e sinais de dor no pós-operatório.

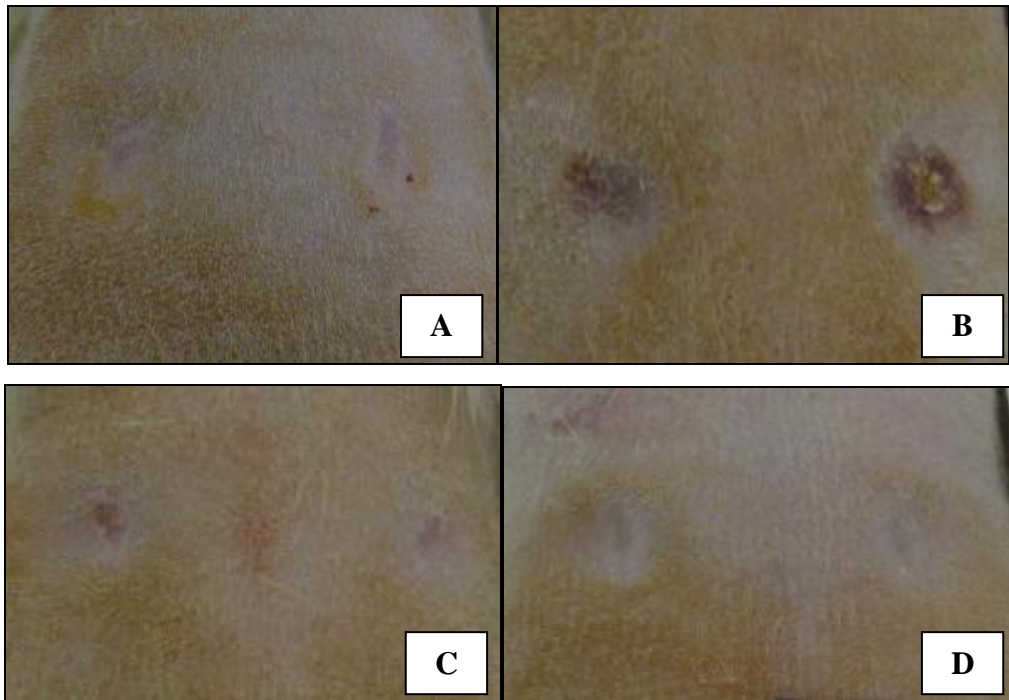
As lesões induzidas, de maneira geral, não apresentaram exsudação, não tendo ocorrido nenhum caso de contaminação bacteriana. Da mesma forma, não houve nenhum caso de sangramento. Entretanto, ocorreram, apenas algumas poucas escoriações, provenientes de lambedura ou prurido, próximos ao local da ferida, em alguns animais que receberam  $H_2O_2$ , os quais demonstravam desconforto pós a aplicação do agente indutor. Foi verificada a presença de crosta no local da ferida, no grupo  $H_2O_2$ .



**Figura 4:** Pele, rato Wistar. Avaliação macroscópica. Aspecto das lesões no pós-operatório imediato, após a primeira aplicação dos agentes químicos. A) PVPI 1%, B)  $H_2O_2$  35%, C) Clorexidina 1% e D) NaCl 0,9%.



**Figura 5:** Pele, rato Wistar. Avaliação macroscópica. Aspecto final das lesões, grupo 15 dias, após a indução das lesões. A) PVPI 1%. B)  $H_2O_2$  35%. Destaca-se a presença de crosta no local de aplicação dos agentes. C) Clorexidina 1% e D) NaCl 0,9%.

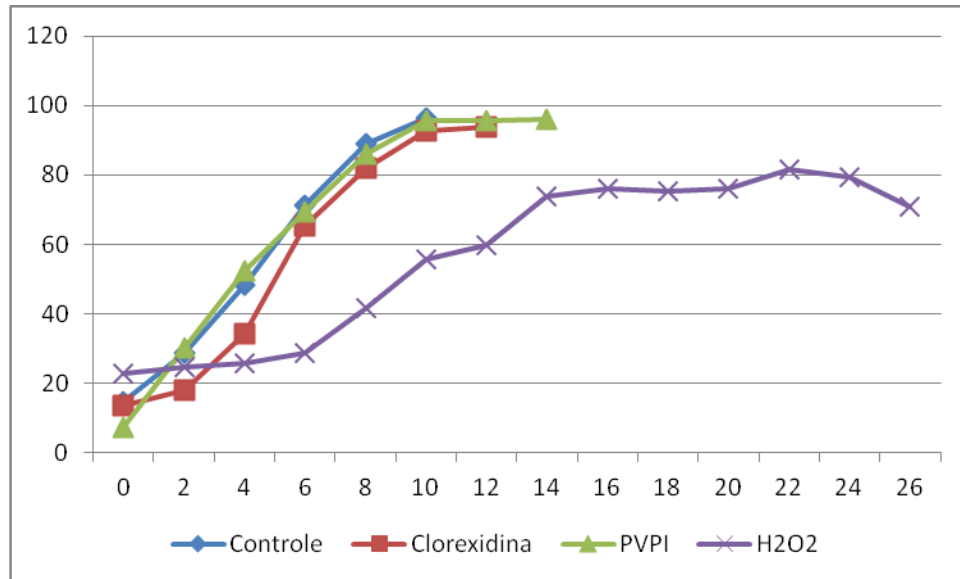


**Figura 6:** Pele, rato Wistar. Avaliação macroscópica. Aspecto final das lesões, grupo 30 dias, após indução das lesões. A) PVPI 1%, B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%, C) Clorexidina 1% e D) NaCl 0,9%.

### 5.7 Avaliação Morfométrica

A partir das mensurações realizadas nos dias zero, dois, quatro, seis, sete, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 30 foi calculada a área da lesão (maior comprimento pela maior largura) e a área de contração da ferida (C). A taxa de contração cicatricial (TC) foi avaliada. Os dados obtidos foram avaliados pelo teste de EEG para normalidade, e, após, submetidos ao teste de modelos mistos. Os resultados da taxa de contração da ferida podem ser melhor entendidos no Gráfico 1.

**Gráfico 1:** Taxa de contração. Relação da taxa de contração média considerando o grupo e o dia avaliados. O eixo X representa os valores médios das taxas e o eixo Y representa os dias avaliados.



O gráfico 1 mostra a taxa de contração da ferida de cada grupo em função dos dias avaliados. Pode-se notar que o grupo PVPI teve maior taxa de contração entre os dias dois e seis, quando comparado ao grupo controle. Porém ao longo do tempo, o grupo controle teve taxa de contração da ferida de aproximadamente 100% até o dia 10, enquanto que o grupo PVPI 1%, também atingiu contração da ferida, aproximada dessa máxima por volta dos 10 a 12 dias, levando em consideração a média obtida no período experimental entre os dias zero e 30. Houve significância estatística entre as médias obtidas nos grupos controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao longo do tempo, de acordo com os testes empregados ( $P > 0,05$ ).

## 5.8 Avaliação Microscópica

Com base na menor diferença de contração média, embora não apresentasse significância estatística macroscopicamente, optou-se por biopsiar as feridas dos antímeros esquerdos, conforme demonstrado na Tabela 2.

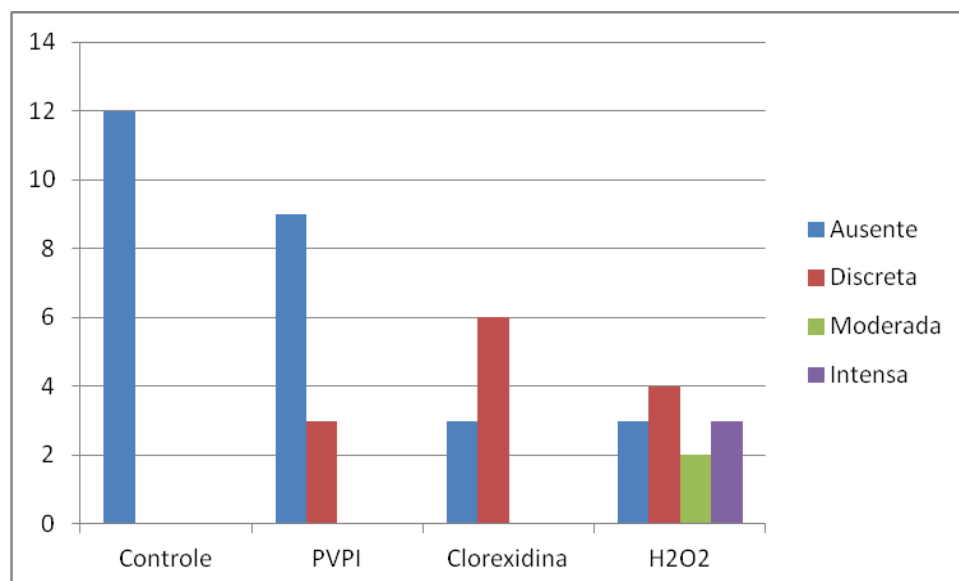
**Tabela 2:** Relação da taxa de contração média, considerando apenas os lados das feridas (direito e esquerdo). Não houve diferença significativa entre as variáveis analisadas.

<b>Ferida</b>	<b>Média</b>	<b>Erro</b>	<b>Sig.* P</b>
Direita	51,4065	1,76044	0
Esquerda	49,5083	1,46895	0

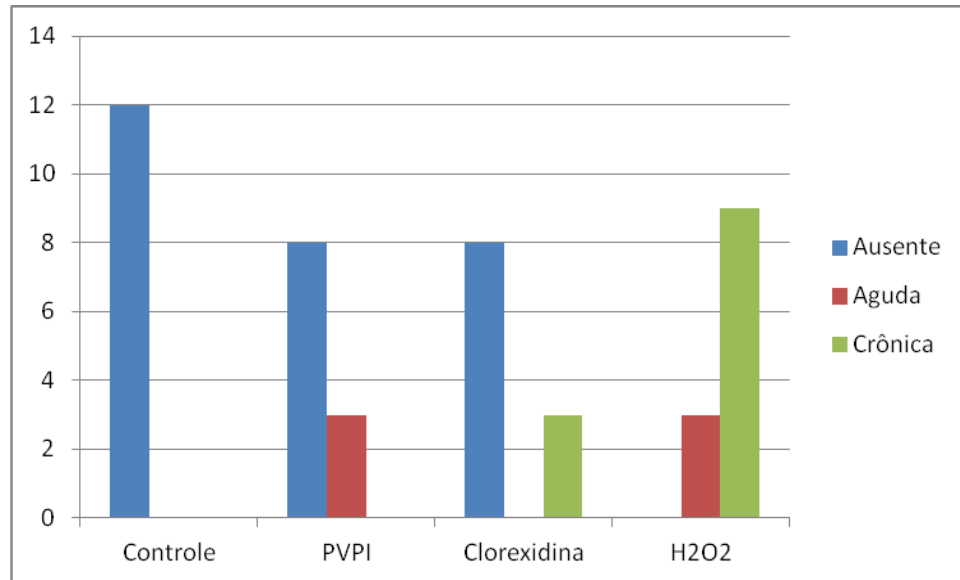
Os parâmetros histológicos avaliados foram a presença de acantose, epitelização, graduação da inflamação, tipo de reação inflamatória, fibrose, neovascularização, úlcera e hemorragia.

O teste utilizado (Qui-quadrado), demonstrou que não houve diferença significativa na maioria dos parâmetros avaliados. No entanto, foram listados os dados considerados importantes nesse estudo, conforme pode ser observados nos Gráficos 2 e 3. O tipo da reação inflamatória foi definida como predominância de neutrófilos caracterizando inflamação como aguda e predominância de macrófagos, caracterizando a inflamação como crônica.

**Gráfico 2:** Graduação da Inflamação. O eixo X representa os diferentes grupos avaliados e o eixo Y representa a quantidade de animais (*n*). Observa-se que o grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou, desde ausência de inflamação, até inflamação considerada intensa.

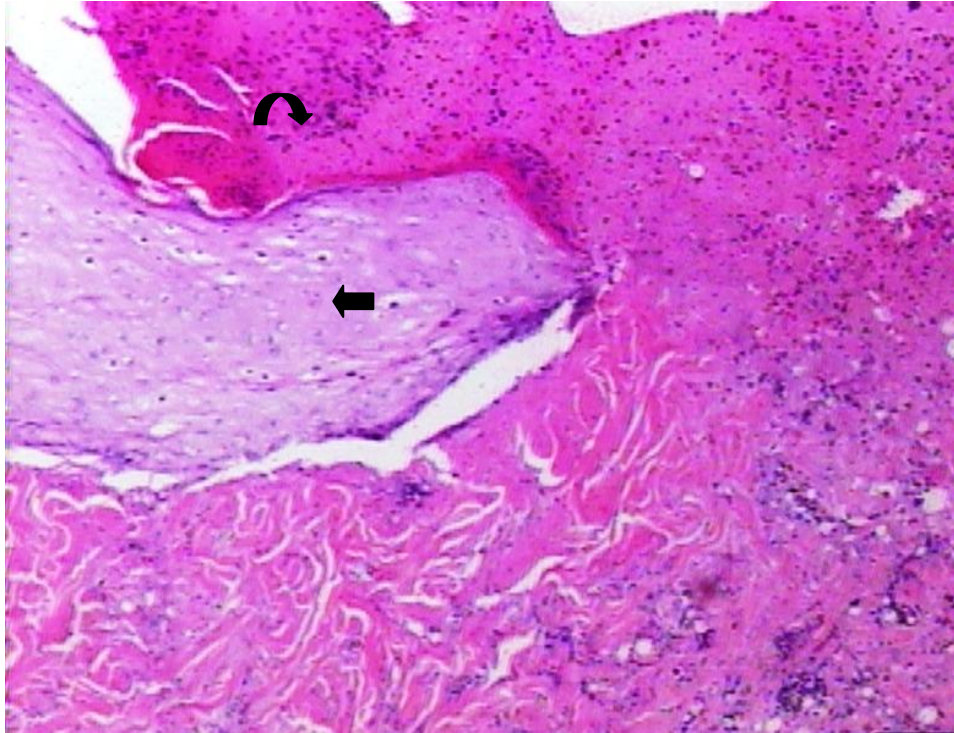


**Gráfico 3:** Tipo da Inflamação. O eixo X representa os diferentes grupos avaliados e o eixo Y representa a quantidade de animais (*n*). Observa-se que o grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentou inflamação crônica na grande maioria dos animais pertencentes a esse grupo.



### 5.8.1 Avaliação da coloração de HE

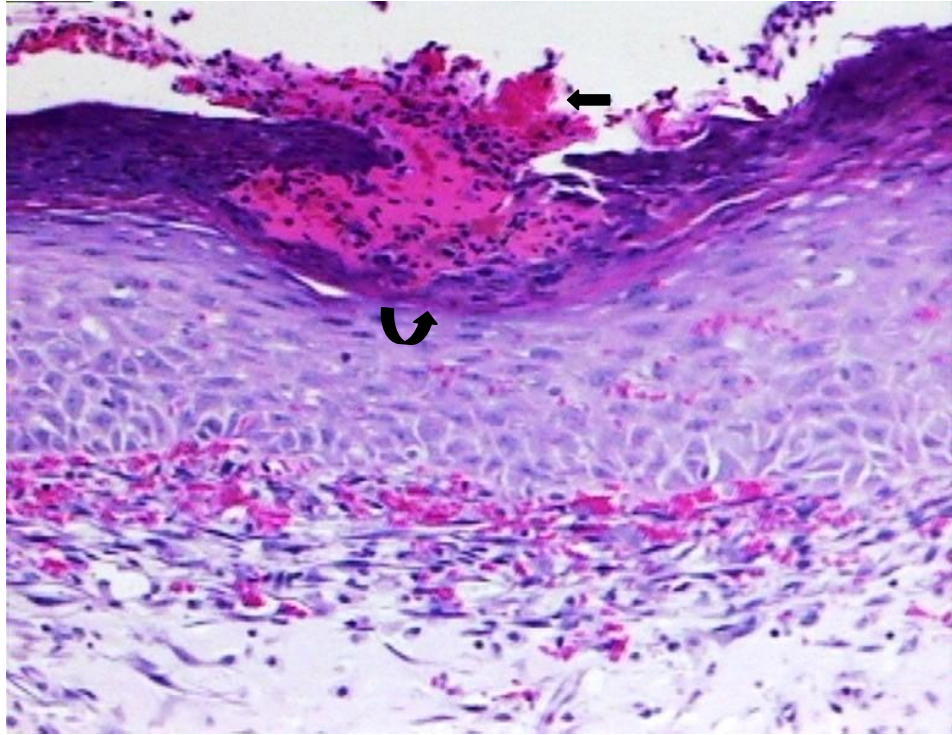
5.8.1.1 Quanto à presença de acantose: no grupo controle, prevaleceu ausência de acantose, sendo observada em apenas três animais. No grupo PVPI prevaleceu ausência de acantose, sendo observada em apenas quatro animais (4/12). No grupo clorexidina, da mesma forma como no grupo controle, observou-se, também, apenas três casos de presença de acantose na epiderme (3/12). No grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a presença da alteração foi observada em 7 animais (7/12) (Figura 7).



**Figura 7:** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nota-se a presença de acantose (seta reta) e a presença de crosta superficial sobre derme espessada por tecido fibrovascular (seta curva) na epiderme. HE, 5X.

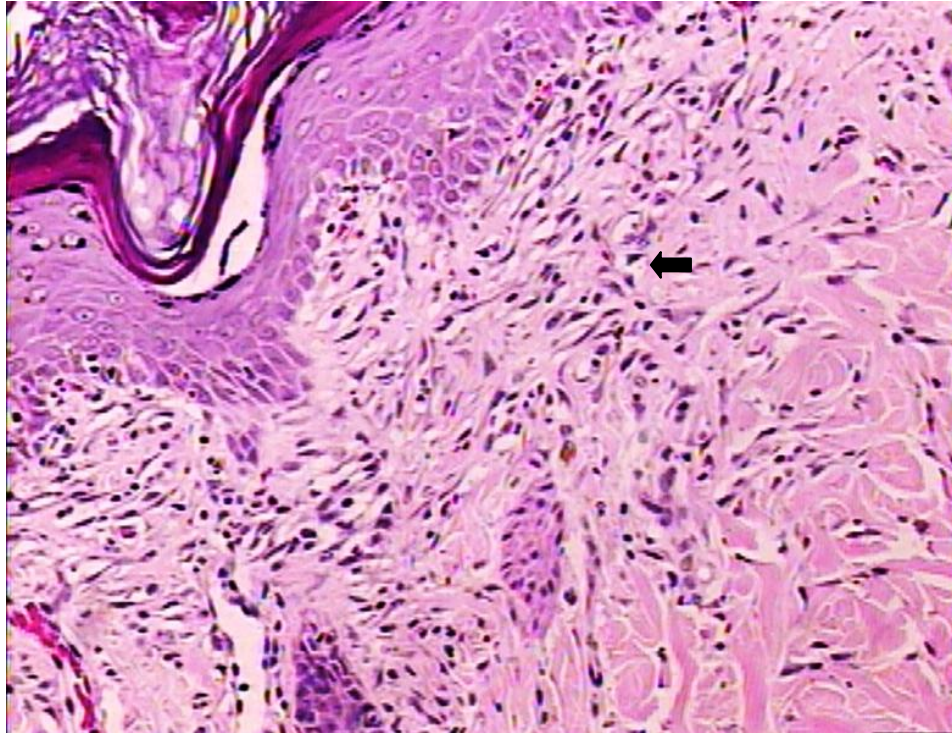
5.8.1.2 Quanto à presença de epitelização: a grande maioria dos animais dos diferentes grupos tiveram epitelização adequada, porém o grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, demonstrou ter esse índice menor, devido a presença de úlcera no local avaliado em sete animais (7/12) (Figura 8).





**Figura 8:** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Epitelização com acantose, paraceratose e crosta abundante (setas). HE, 10X.

5.8.1.3 Quanto à presença de fibrose: no grupo controle não houve fibrose. Nos grupos PVPI e clorexidina, a presença da fibrose foi considerada mínima. No grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, houve fibrose em diferentes níveis, prevalecendo a intensidade máxima (Figura 9).



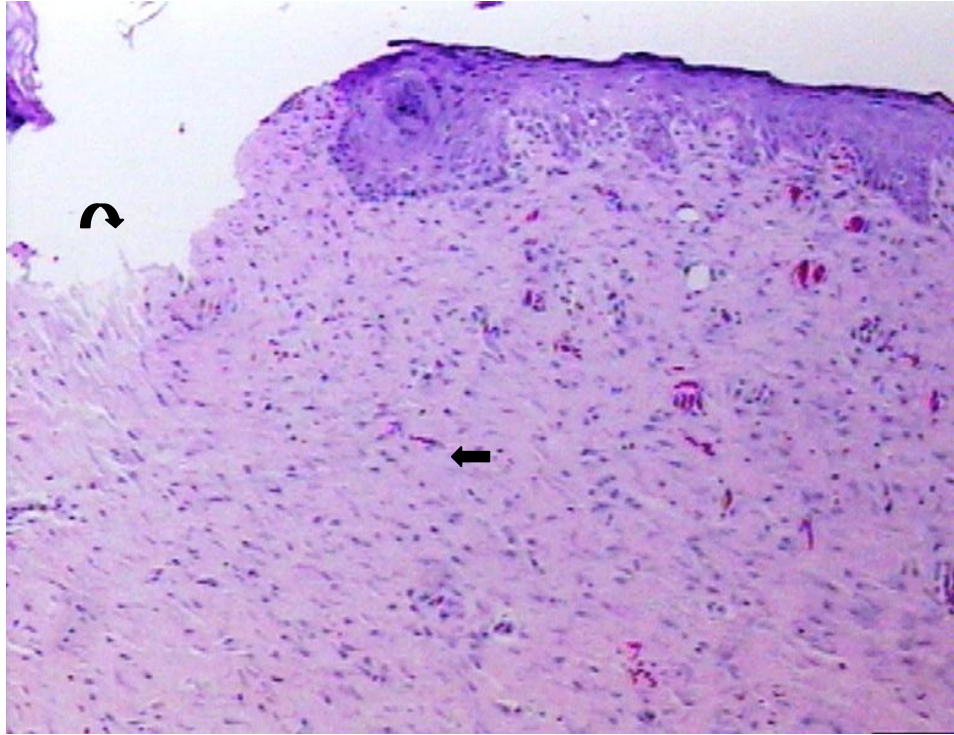
**Figura 9:** Pele, rato Wistar, grupo PVPI. Nota-se fibrose intensa na derme, representada por fibras colágenas desorganizadas e fibroblastos. HE, 10X.

5.8.1.4 Quanto à presença de angiogênese: no grupo controle, apenas um animal teve neovascularização considerada mínima (1/12) e dois animais (2/12) tiveram esta variável considerada moderada. No grupo PVPI, dois animais (2/12) tiveram neovascularização considerada como intensa, dois animais (2/12) como moderada e três animais (3/12), como mínima. O grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teve dois animais (2/12) com proliferação endotelial considerada intensa, quatro animais (4/12) com angiogênese considerada moderada e apenas um animal (1/12) com índice considerado mínimo (Figura 10).



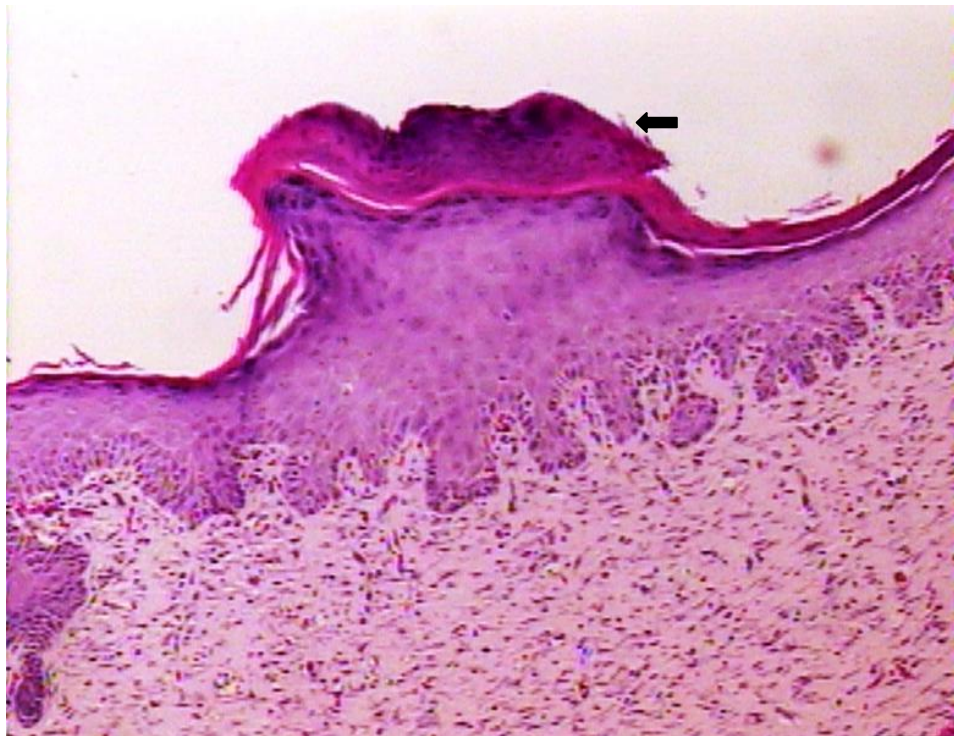
**Figura 10:** Pele, rato Wistar, grupo PVPI. Presença de angiogênese (vaso com hemácias no seu interior), na derme superficial (seta). HE, 10X.

5.8.1.5 Quanto à presença de úlcera: apenas dois animais (2/12) dos grupos PVPI e clorexidina apresentaram úlcera. No grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cinco animais (5/12) apresentaram úlcera no local de aplicação dos agentes químicos (Figura 11).



**Figura 11:** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Presença de úlcera, sem epitelização na área ulcerada (seta curva). Presença de fibrose (seta). HE, 5X.

5.8.1.6 Quanto à presença de crosta: seis animais (6/12) do grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram crostas no local da lesão. No grupo PVPI, apenas um animal (1/12) teve formação de crosta (Figura 12).



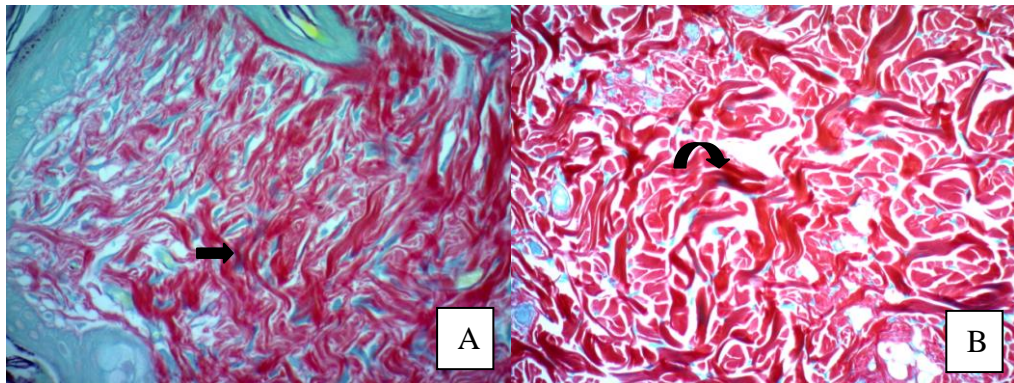
**Figura 12.** Pele, rato Wistar, grupo PVPI. Presença de crosta no local da ferida; epiderme acantótica (seta). HE, 5X.

5.8.1.7 Quanto à presença de hemorragia: apenas um animal (1/12) de cada grupo apresentou hemorragia em subcutâneo e/ou na camada muscular.

As alterações discutidas foram consideradas apenas nos locais de lesão, onde foram aplicados os agentes químicos, possíveis indutores de ferida crônica.

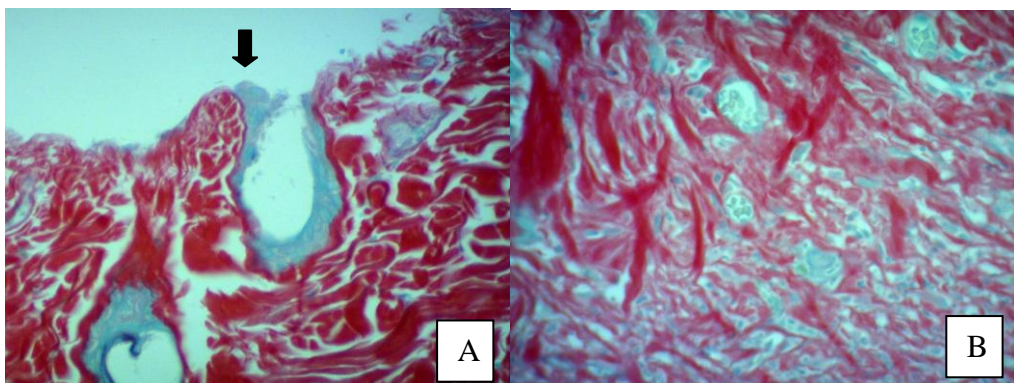
## 5.8.2 Avaliação da coloração de Picrosirius Red

5.8.2.1 O grupo controle demonstrou ter na metade dos animais deste grupo (6/12), níveis 4 de colágeno (mais de 75%) (Figura 13).



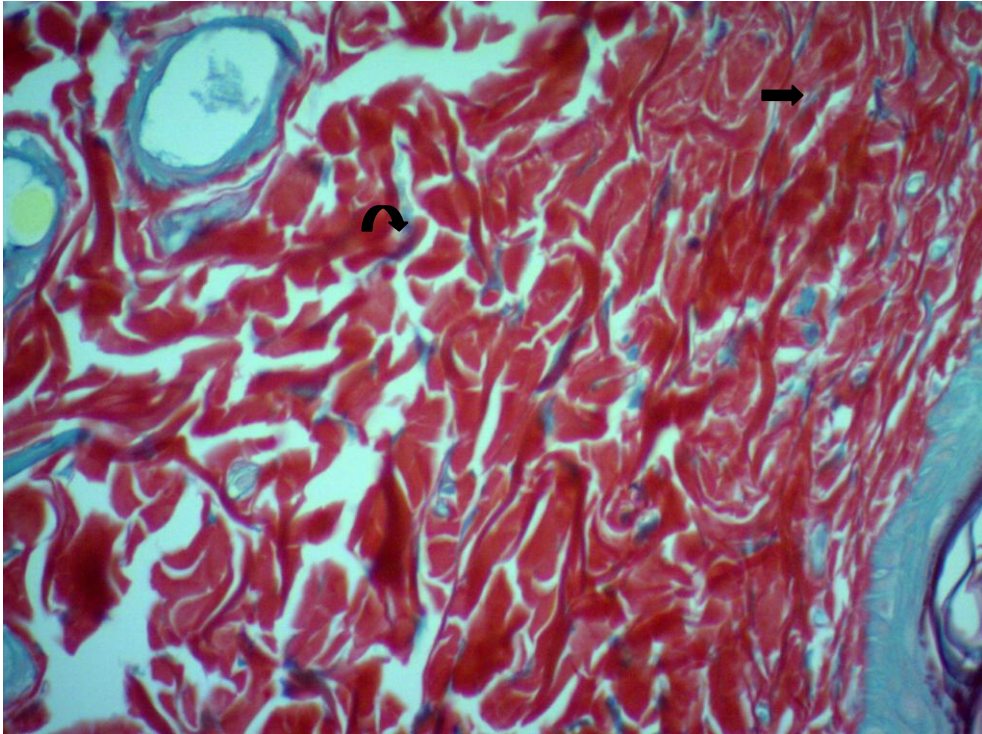
**Figura 13:** Pele, rato Wistar, grupo Controle. Epiderme. **A)** Presença de fibras colágenas na derme superficial (seta) e **B)** derme profunda (seta curva). Picrosirius Red, 40X.

5.8.2.2 O grupo  $H_2O_2$ , apresentou níveis 2 de colágeno (25% a 50%) em cinco animais (5/12) (Figura 14).



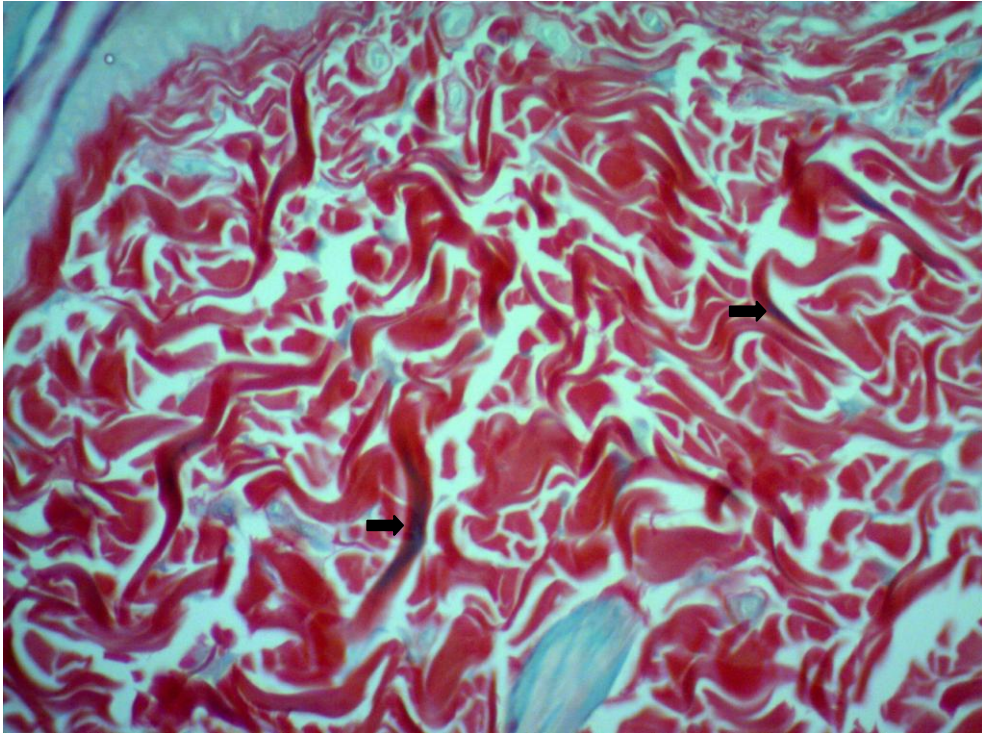
**Figura 14:** Pele, rato Wistar, grupo  $H_2O_2$ . Epiderme. **A)** Presença de folículo piloso (seta). **B)** Nota-se a presença de fibras colágenas na derme superficial e profunda. Picrosirius Red, 40X.

5.8.2.3 A análise do grupo clorexidina apresentou na maioria dos animais deste grupo (7/12), níveis 4 de colágeno (mais de 75%) (Figura 15).



**Figura 15:** Pele, rato Wistar, grupo Clorexidina. Epiderme. Presença de fibras colágenas na derme superficial (seta) e derme profunda (seta curva). Picrosirius Red, 20X.

5.8.2.4 A análise do grupo PVPI demonstrou que cinco animais (5/12) tiveram níveis 4 de colágeno (mais de 75%) e outros cinco (5/12), tiveram níveis 2 de colágeno (25% a 50%) (Figura 16).

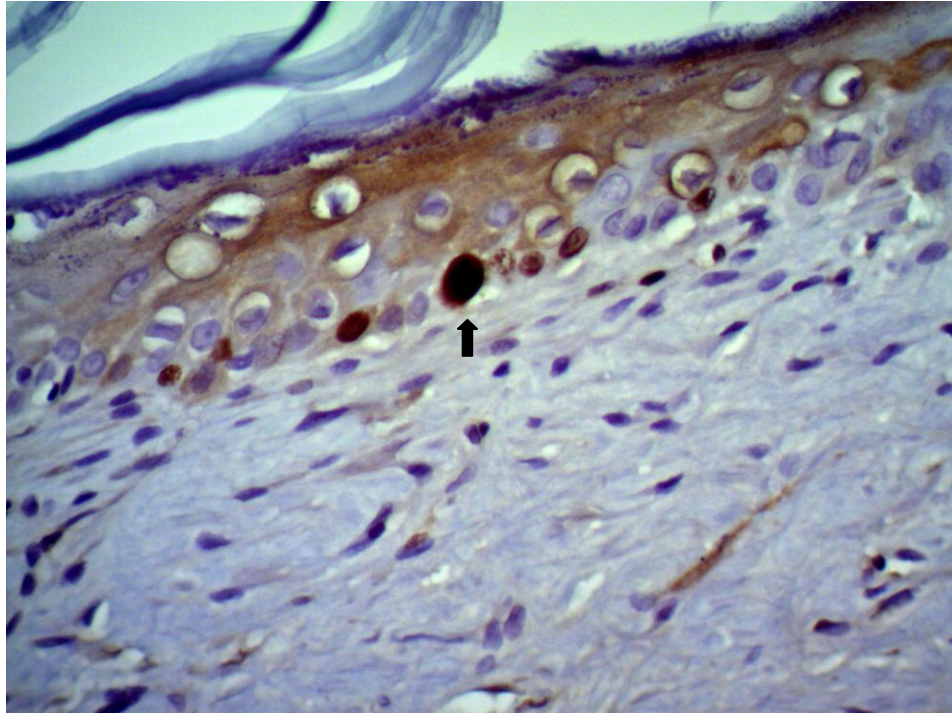


**Figura 16:** Pele, rato Wistar, grupo PVPI. Epiderme. Presença de fibras colágenas na derme superficial (setas). Picrosirius Red, 40X.

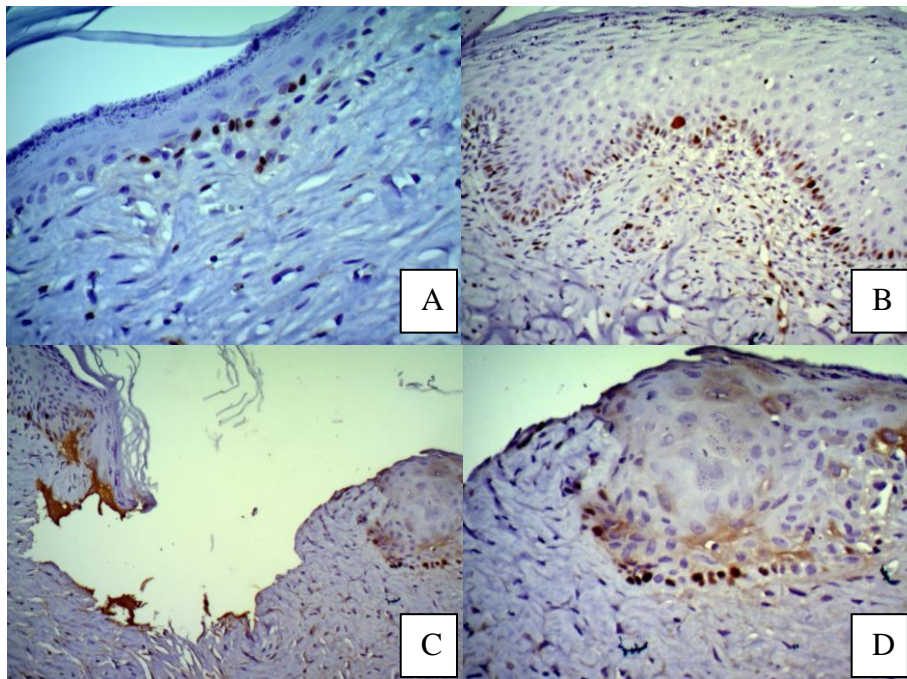
### 5.8.3 Avaliações de imuno-histoquímica

#### 5.8.3.1 Expressão de Ki 67:

5.8.3.1.1 Quanto à formação da epiderme: o grupo controle demonstrou taxa 2 (25% a 50%) de formação de epitélio na grande maioria dos animais do grupo. O grupo PVPI teve variação entre níveis de 2 (25%-50%) a 3 (50%-75%). No grupo clorexidina demonstrou taxa de epitelização de 1 (até 25%) na maioria dos animais do grupo (8/12). O grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, predominaram níveis de epitelização de 1 (até 25%) e 2 (25% e 50%) (Figuras 17 e 18).



**Figura 17:** Pele, rato Wistar, grupo Clorexidina. Epiderme, camada basal. Forte expressão nuclear de Ki-67. Imuno-histoquímica 40X.

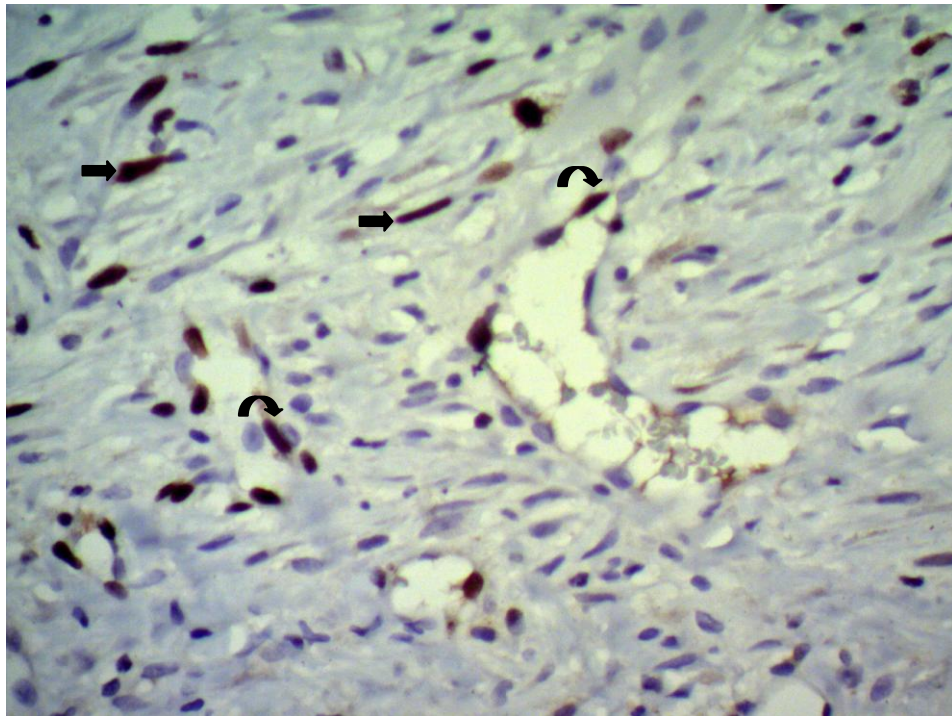


**Figura 18:** **A)** Pele, rato Wistar, grupo Controle. Marcação nuclear, fortemente expressada pela proteína Ki 67 em epiderme. **B)** Pele, rato Wistar, grupo  $H_2O_2$ . Intensa marcação nuclear na epiderme. **C)** Pele, rato Wistar, grupo  $H_2O_2$ . Presença de úlcera, ausência de epiderme. **D)** Pele, rato Wistar, grupo  $H_2O_2$ . Formação de epiderme e forte expressão de Ki-67 nas bordas da ferida. Imuno-histoquímica 40X.



5.8.3.1.2 Quanto à proliferação de fibroblastos: no grupo controle, houve níveis de fibroblastos de 1 (até 25%) (7/12). No grupo PVPI, seis animais (6/12) obtiveram níveis 1 de fibroblastos (até 25%). No grupo clorexidina, sete animais (7/12) obtiveram níveis de fibroblastos igual a 1 (até 25%). No grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cinco animais (5/12) obtiveram níveis de fibroblastos igual a 1 (até 25%), variando na ausência de fibroblastos (2/12), 2 (25% a 50%) (2/12) e um animal apresentando níveis de fibroblastos de 3 (50% a 75%) (Figura19).

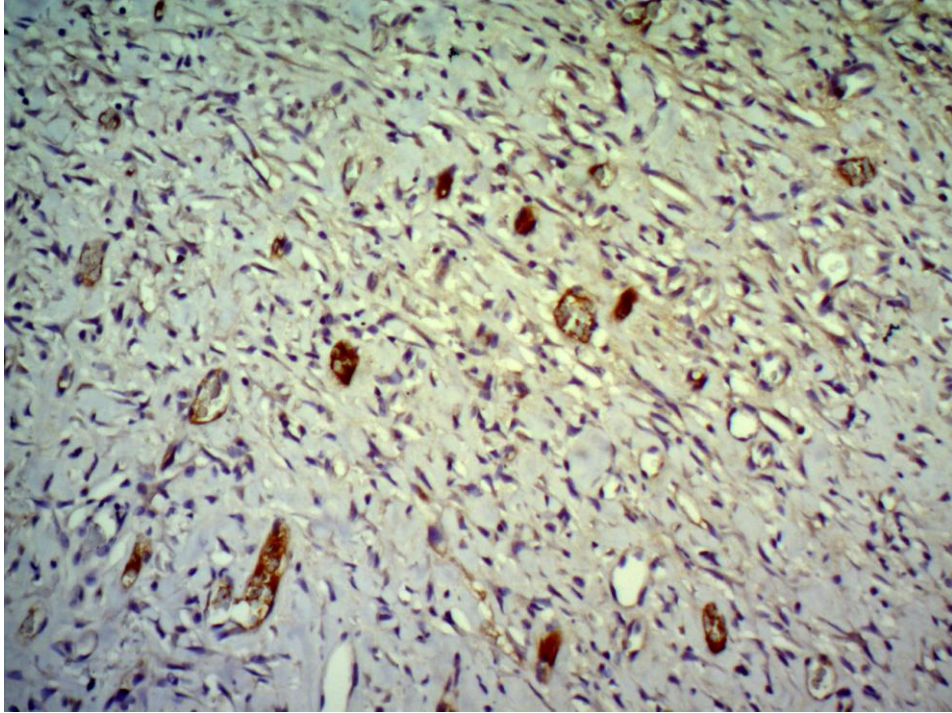
5.8.3.1.3 Quanto à presença de novos vasos sanguíneos: em todos os grupos, houve predominância de angiogênese de nível 1 (até 25%) (Figura 19).



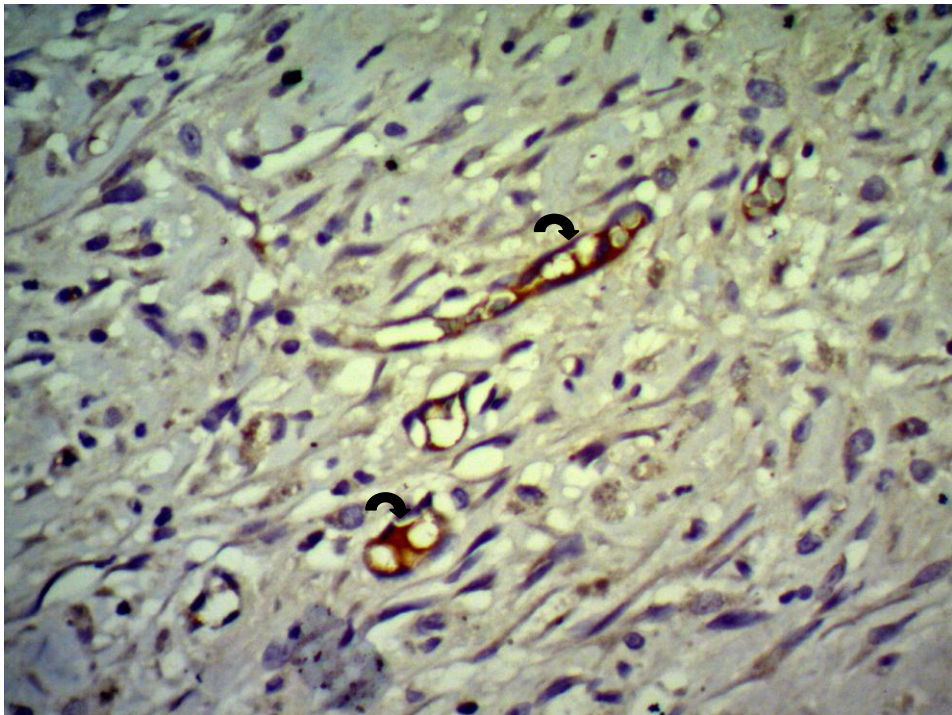
**Figura 19:** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Presença de numerosos fibroblastos. Forte expressão nuclear de Ki-67 (setas). Evidência de angiogênese demonstrada através de expressão de Ki-67 (setas curvas). Imuno-histoquímica, 20X.

### 5.8.3.2 Expressão de VEGF

5.8.3.2.1 Quanto à presença de angiogênese: a expressão de Ki-67 e VEGF foram muito semelhantes. Todos os grupos obtiveram índices baixos de novos vasos sanguíneos, os quais foram similares para todos os grupos 1 (até 25%), variando os níveis de forma não significativa (Figuras 20 e 21).



**Figura 20:** Pele, rato Wistar , grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Angiogênese intensa. Expressão de VEGF no citoplasma das células, na derme superficial e profunda. Imuno-histoquímica, 20X.



**Figura 21:** Pele, rato Wistar, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Angiogênese na derme superficial. Expressão de VEGF no citoplasma das células endoteliais. Imuno-histoquímica, 40X.

## 6 DISCUSSÃO

O modelo experimental adotado para esse estudo (rato *Rattus norvegicus*), atendeu às expectativas e necessidades propostas, bem como pelo pequeno porte e fácil manejo. Além disso, é interessante salientar que os gastos foram menores no que diz respeito à aquisição e manutenção, bem como nenhuma ocorrência de óbito ou automutilação. Conforme citam Tufik *et al.* (2004) e Ferreira *et al.* (2005), o *Rattus norvegicus* é uma opção de uso para modelo cirúrgico induzido, sendo amplamente utilizado para estudos com pele. É possível citar inúmeros trabalhos realizados na área de cicatrização, regeneração tecidual, entre outros relacionados à cirurgia plástica, os quais utilizaram esse animal como modelo experimental (McFARLANE *et al.*, 1965; ARAÚJO, *et al.*, 1994; VINDINSKI *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2008; GU *et al.*, 2008).

Levando em consideração que a apreensão e o estresse produzidos pela manipulação e pelo procedimento de indução da ferida, 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 atípico cloridrato de tramadol ( $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), administrado por via IM, como medicação pré-anestésica (ANDRADE, 2002). Para a manutenção, fez-se o uso de Isoflurano, o qual demonstrou ser muito eficiente para a espécie em questão, devido ao fato de os animais terem um rápido retorno anestésico, de forma tranquila e, principalmente, porque não houve óbitos durante as intervenções (SCHANAIDER e SILVA 2004). O procedimento cirúrgico foi considerado rápido, não cruento e de baixo nível algico, causando dor inflamatória de grau leve, em resposta ao dano tecidual.

O procedimento cirúrgico foi testado em projeto piloto e a partir do modelo proposto por Galiano *et al.* (2004). Foram induzidas duas feridas simétricas e paralelas em cada animal, tendo como base as escápulas e a coluna vertebral como referenciais anatômicos. 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 (GIANOTTI, 2011). Inicialmente cogitou-se a hipótese de fazer tratamentos diferentes em cada ferida, obtendo um número reduzido de animais, porém, para que não houvesse interferência dos agentes entre elas, optou-se por realizar os mesmos tratamentos

e avaliá-las individualmente. Esse modelo de indução foi considerado de fácil e rápida realização, levando aproximadamente cinco minutos, conforme proposto por Gianotti (2011) e Garcez (2012). Apesar de esses autores terem utilizado o coelho Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo experimental.

O trépano corneal utilizado para demarcação da região a ser incisada foi satisfatório, porque possibilitou a padronização quanto ao tamanho e aspecto das lesões. Conforme cita Garcez (2012), mesmo assim, é possível que seja observada certa variabilidade na determinação da área das lesões no momento da sua realização, devido à elasticidade da pele de cada animal. No entanto, no presente estudo não houve diferença que pudesse ser significativo nas análises macroscópica e microscópicas.

Para o controle da dor inflamatória causada pela lesão tecidual, foram administrados, por via intraperitoneal (IP), o cloridrato de tramadol ( $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), BID (duas vezes ao dia), por até 3 dias seguidos da indução das feridas, conforme Andrade (2002) e Flecknell (2009). Acredita-se que a analgesia tenha sido suficiente, visto que os animais realizavam suas atividades de forma habitual, incluindo disposição alimentar, a atividade física realizada com os amendoins e, também, com o papel toalha, os quais eram distribuídos, diariamente, para todos além de não ter a interferência no processo cicatricial, fato que poderia ocorrer com o uso de drogas antiinflamatórias (BALBINO *et al.*, 2005). Além disso, os animais mantiveram-se dóceis, permitindo que fossem manipulados de forma tranquila e amistosa. Entretanto, no grupo de animais que recebeu o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , observou-se que os animais ficavam bastante incomodados no momento e em seguida da aplicação do agente químico.

Os agentes químicos foram aplicados com o auxílio de micropipeta de  $50\mu\text{l}$ , mostrando-se um método bastante satisfatório. Além da facilidade de manuseio, todos os animais recebiam exatamente a mesma quantidade do produto, de forma que não havia perda de solução. Não foram encontrados dados na literatura pesquisada, que tivessem utilizado a micropipeta, como opção de aplicação.

A cicatrização pode ser considerada um fenômeno físico, químico e biológico que tem início, seguidamente, após lesão tecidual e tem por finalidade reconstruir os tecidos da maneira mais fidedigna possível. Apresenta evolução de três fases básicas distintas e

sucessivas, denominadas inflamação, formação do tecido de granulação e estuturação da matriz e remodelação (CAVALCANTI NETO *et al.*, 2005). O presente estudo demonstrou que, principalmente que os animais que receberam o controle, seguido dos animais que receberam PVPI e clorexidina, tiveram o processo de reparação considerado normal em relação ao tempo, visto que a grande maioria das feridas pertencentes a esses grupos tiveram cicatrização completa em até 15 dias, corroborando com outros estudos que avaliaram a cicatrização em função do tempo, a partir de diferentes métodos (MOURA, 2004; GARROS *et al.*, 2006; MATOS, 2008).

O presente estudo contraria Magro Filho e colaboradores (1998), que relataram atraso na cicatrização de feridas tratadas com PVPI 1%, através de implantes de tubos de polietileno, contendo cone de papel embebido na solução, em espaço subcutâneo da região dorsal de ratos. Também, há estudos que comprovam que em concentrações de 5% e 10%, há inibição da migração leucocitária e da atividade fibroblástica. No entanto na concentração de 1%, utilizada no presente estudo e, também, no estudo realizado pelos referidos autores, não há interferência na cicatrização de feridas cutâneas, quando usado topicamente.

Magro Filho *et al.* (1998) mencionaram a importância dos efeitos adversos do PVPI, alertando quanto à possibilidade de o agente químico provocar dermatite local ou mucosite (no caso do uso na mucosa oral). No entanto, não foram observadas quaisquer alterações referentes aos efeitos colaterais a partir do uso dessa solução, diretamente, no leito das feridas do presente estudo.

Nos animais que receberam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi observado efeito deletério na cicatrização das feridas induzidas, atingindo-se, parcialmente, o objetivo do estudo. Houve retardo na cicatrização, persistência de crostas no local das lesões, bem como alterações vasculares e inflamatórias. Os dados existentes na literatura apontam o peróxido de hidrogênio como uma substância citotóxica, em função do seu potencial destrutivo da matéria orgânica (D'ACAMPORA *et al.*, 2007).

A formação de crostas, possivelmente compostas de ceratina, soro, detritos celulares e, frequentemente, restos de microrganismos em uma ferida cutânea, favorece o processo de reparação e o exsudato promove sua desagregação e o desenvolvimento de

microrganismos (MARTINS *et al.*, 2003; D'ACAMPORA *et al.*, 2007). No presente estudo, além de inferir retardo na taxa de contração, quando comparada aos outros grupos, houve casos de contaminação bacteriana de alguns animais do grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observados, apenas, na histopatologia.

Nos animais que receberam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, isso pode ser explicado pelo efeito oxidante do agente químico, que tem poder de lise de bactérias anaeróbias (VILLA *et al.*, 2003). Da mesma forma, o grupo controle, que recebeu NaCl 0,9%, também não acusou presença de infecção. Esse fato pode ser explicado pela aplicação da própria solução salina, a qual mantinha a umidade necessária no leito da ferida, proporcionando um ambiente propício para os eventos celulares, promovendo assim, a rápida cicatrização (VILLA *et al.*, 2003, ROBBINS e COTRAN, 2010).

Os animais que receberam PVPI, também não apresentaram sinais de infecção local. Apesar da irritabilidade já conhecida da solução de iodopolivinil pirrolidona no leito de feridas, este antisséptico possui em sua composição um surfactante não iônico que dá maior aderência à superfície na qual é empregado, permitindo a liberação de iodo por tempo prolongado, aumentando, de forma significativa, seu potencial antimicrobiano (MAGRO FILHO *et al.*, 1998).

A clorexidina, é considerada mais irritante do que o soro fisiológico (NaCl 0,9%), e, obviamente, isso se dá pela presença do álcool em sua composição, o qual interfere, negativamente, no reparo tecidual, principalmente quando aplicado no local da lesão, precipitando e desidratando o citoplasma celular. A solução de clorexidina 0,2%, foi diluída em água bidestilada, na proporção de 8 gotas para 10ml de água, com o intuito de diminuir a possibilidade de irritação local e ou toxicidade sistêmica (MAGRO FILHO *et al.*, 1998). No estudo em questão, não houve os sinais descritos pelo autor acima citado, além do grupo ter demonstrado cicatrização adequada, em função do tempo de avaliação. Entretanto, de acordo com o que citam Paunio e colaboradores (1978), em seus estudos com a mesma metodologia houve atraso no processo de formação de tecido de granulação e, conseqüente, atraso no processo cicatricial de feridas em ratos. Cavalcanti Neto *et al.* (2005), citam que, quando não há ocorrência de contaminação bacteriana, o processo cicatricial se dá de forma acelerada. Provavelmente, em virtude de não haver infecção no grupo clorexidina, a cicatrização se deu de forma habitual, respeitando todos os eventos

celulares necessários para que ocorresse, discordando de Hosgood (2007) que cita a sobrevida significativa de *Staphylococcus aureus* em testes *in vitro* com concentrações inferiores a 0,05%, além de não recomendar o uso de clorexidina em concentrações de 0,5 a 1% em tecidos lesados, devido à sua toxicidade.

O presente trabalho está em consonância com os resultados obtidos por Villa e colaboradores (2003), embora a concentração do agente peróxido de hidrogênio, tenha sido diferente. E corrobora, também, os resultados obtidos através dos trabalhos de Vieira e colaboradores (2008) e Beheregaray e colaboradores (2010), que, também, observaram a formação de crostas nas lesões induzidas. Salgado e colaboradores (2007) relatam que a retirada das crostas é fundamental para uma boa cicatrização, tendo por objetivo estimular a capacidade contrátil dos miofibroblastos e evitar a contração com deformidade da cicatriz. Entretanto, o objetivo desse estudo não era promover a cicatrização e sim o seu retardo, por esse motivo optou-se pela não remoção das crostas fibrino-leucocitárias, conforme Moura (2004). Neste estudo a presença da crosta pode atrasar o processo cicatricial, evitando a contração da ferida, além de não possibilitar umedecimento e oxigenação suficientes para que as células migratórias promovam dissecação entre a matriz e os detritos celulares. A presença de crostas, particularmente limitada ao grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6/12 animais e apenas 1 do grupo PVPI), foi observada a partir do terceiro dia da indução das lesões, sendo permanentes durante todo o período do estudo, principalmente, no grupo de 15 dias, o que foi observado na histopatologia.

Com relação ao aspecto macroscópico das feridas, os animais que receberam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentavam crostas nas feridas. Foi constatado que independente do seu tamanho, a crosta a cobria e, por vezes, se mantinha pouco aderida ao leito da ferida, mas ainda assim, não era removida. Os animais pertencentes aos outros grupos, ao término dos intervalos de 15 e 30 dias, apresentavam cicatrizes, esteticamente, muito semelhantes, demonstrando que houve deformação da ferida em relação a sua cicatriz, não havendo em nenhum momento do experimento, presença de hemorragia e/ou secreções, bem como necrose. A hiperemia local foi observada particularmente, nos animais que receberam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; porém, não se observou a formação de edema local, à diferença dos resultados obtidos por Vieira e colaboradores (2008).

As variáveis avaliadas, microscopicamente, não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos e os dias avaliados.

Acantose é uma das várias alterações que podem ocorrer na epiderme, a qual representa hiperplasia, especificamente da camada escamosa da epiderme. Ocorre proliferação das células da epiderme, como os ceratinócitos ou os melanócitos. Pode ter origem secundária a um processo inflamatório ou ter origem displásica. A presença de acantose em maior grau observada no grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser decorrente da lesão celular crônica pelo uso prolongado do agente químico, resultando na necessidade de maior demanda fisiológica das células (RUBIN e STRAYER, 2010).

A epitelização completa, a proliferação de tecido fibroso e focos de infiltrado inflamatório comprovou a capacidade de recuperação gradual do tecido epitelial nos grupos controle, e nos animais, cujas lesões receberam clorexidina e PVPI, corroborando os achados de Salgado *et al.* (2007). No grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em cinco animais houve ausência total de epitelização, provavelmente explicado pela presença de úlcera no local de aplicação do agente químico, que implicou na não formação de epitélio, promovendo, ainda, intensa inflamação supurativa crônica, marcada fibrose que se estendia até o subcutâneo e moderada angiogênese. No entanto, esses dados não corroboram Villa *et al.* (2003), que, afirmam que, na histopatologia, os grupos que receberam como agente indutor da lesão o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiveram epitelização da ferida, com pouquíssimas células, além de apresentar fragmentos de crosta. Segundo Martins e colaboradores (2003), a epiderme de todos os grupos, na área de reparo, se apresentava mais espessa, quando comparada à pele adjacente normal; isto poderia ser explicado pela proliferação epitelial, que se dá como resultado de uma intensa atividade mitótica das células basais nesse período. Os animais que não apresentaram úlcera e/ou crosta, poderiam ainda não ter completa epitelização na histopatologia, apesar do aspecto macroscópico da ferida demonstrar fechamento no local da lesão, assim como descrito por Vieira *et al.* (2008).

A inflamação nada mais é que uma reação nos tecidos, que consiste, principalmente, nas respostas dos vasos sanguíneos e leucócitos. Pode ser aguda ou crônica. Aguda, quando é rápida e de curta duração, persistindo por horas ou poucos dias. Suas principais características são a exsudação de fluido e proteínas do plasma e a migração de leucócitos, predominantemente, neutrófilos. A crônica pode seguir a



inflamação aguda ou ser insidiosa no início. É de longa duração e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e destruição tecidual (ROBBINS e COTRAN, 2010).

Quanto à graduação da inflamação, os animais do grupo controle, ou que receberam PVPI e clorexidina, não apresentaram níveis de inflamação, ao longo dos 30 dias. No entanto, o grupo de animais que recebeu  $H_2O_2$ , apresentou níveis de inflamação que variaram de discreto a intenso. Apesar de Garros *et al.* (2006) citarem que sem inflamação não há reparo, no presente estudo isso pode ser explicado devido ao tempo de avaliação microscópica das lesões nos intervalos de 15 e 30 dias. Estes animais já teriam sofrido essa fase inflamatória, além de todos os outros eventos celulares que ocorrem, imediatamente, após a injúria tecidual. Visto que, no momento da indução de morte, esses animais, provavelmente, já estariam na fase de remodelamento da ferida.

O tipo da reação inflamatória limitada ao grupo de animais que recebeu  $H_2O_2$ , foi avaliada como aguda (presença de neutrófilos), crônica (presença de monócitos e macrófagos) e subaguda (presença de neutrófilos formando pus) (MURPHY e WARD, 2010). Nove animais (9/12) desse grupo, apresentaram inflamação considerada crônica. É possível dizer que houve certa permanência da reação inflamatória, que teoricamente deveria durar até, aproximadamente, três dias após a injúria tecidual. A reação inflamatória permaneceu por pelo menos 15 a 30 dias, sendo evidentemente maior no grupo de 15 dias. Essa permanência pode ser explicada pela exposição prolongada ao agente, comprovadamente tóxico, utilizado de forma exógena, o qual causa destruição celular induzida pelo agente agressor persistente ou pelas células inflamatórias (ROBBINS e COTRAN, 2010), causando uma inflamação considerada crônica, seja pela presença marcante de macrófagos na lesão, ou pelo tempo de uso do agente químico, segundo Hoosgod (2007), que se refere a presença de um "provocador da lesão", como material ou corpo estranho ou até mesmo bactérias, desencadeando intensa proliferação celular, principalmente de monócitos.

O termo fibrose é utilizado para denotar a deposição excessiva de colágeno e outros componentes da matriz extra celular em um tecido, porém, indica, mais frequentemente, a deposição de colágeno em alterações de caráter crônico (ROBBINS e COTRAN, 2010). A presença de fibrose foi considerada intensa em 6 animais (6/12) do grupo  $H_2O_2$ . No

restante dos grupos, também foi detectada fibrose, porém, variou entre discreta, moderada e intensa sendo, praticamente, ausente no grupo controle. Conforme Robbins e Cotran (2010), os mecanismos básicos que ocorrem no desenvolvimento da fibrose associada à doença inflamatória crônica são muito semelhantes aos mecanismos de cura de feridas cutâneas. Por esse motivo e pelo tempo de avaliação, acredita-se que seja normal a intensidade da fibrose nos animais no presente estudo.

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. Faz parte da fase de proliferação e juntamente com a fibroplasia, compõem o tecido de granulação. A função da neovascularização é carrear oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (ROBBINS e COTRAN, 2010; SEPHEL e WOODWARD, 2010). A maioria dos animais do grupo controle não apresentou neovascularização. Isso se deve ao fato de que antes mesmo dos 15 dias, esse grupo apresentava cicatrização completa das lesões, ou seja, já havia passado pelos eventos celulares, os quais apontariam a presença de novos vasos. No grupo PVPI, apesar de demonstrar níveis altos de taxa de contração, sete animais (7/12), apresentaram níveis de angiogênese, variando entre discreto e intenso. Isso demonstra que, embora as feridas, macroscopicamente, apresentassem junção das bordas, microscopicamente foi possível observar que estas ainda apresentavam processo cicatricial, mais especificamente na fase proliferativa, assim relatado por Vieira *et al.* (2008), o qual cita feridas alinhadas macroscopicamente, porém com ausência de epitelização e proliferação celular. Da mesma forma, no grupo clorexidina, seis animais (6/12), apresentaram níveis de neovascularização variando de discreto a moderado, evidenciando processo cicatricial, visto apenas na histopatologia, embora as feridas estivessem, macroscopicamente, cicatrizadas. O grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apesar de apresentar maior nível de alterações celulares, apresentou dados muito semelhantes em relação à angiogênese, quando analisados por meio do Ki-67 e do VEGF. Essas feridas, provavelmente estariam na fase de proliferação, no momento em que foram coletadas, pois mostraram proliferação de novos vasos, como citado na literatura, com presença de neovascularização na fase proliferativa (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009). Todos os grupos estão de acordo com Vasconcellos *et al.* (2001), que citam fase proliferativa com proliferação fibroblástica e neovascular, podendo se estender até o 14º dia. Além disso, Garros *et al.* (2006) demonstraram que a proliferação endotelial, depende

da presença de macrófagos, pois promovem angiogênese devido as suas interações com prostaglandinas e tromboxanos. A partir de capilares rompidos, se originam brotos endoteliais, que se proliferam rapidamente, formando cordões sólidos, sustentados por fibroblastos, que canalizam, permitindo assim, o fluxo sanguíneo e, por conseguinte, o tecido conjuntivo, intensamente vascularizado, constitui o tecido de granulação, conforme mencionado anteriormente. Villa *et al.* (2003), citam ainda que em seu estudo sobre cicatrização de feridas cirúrgicas submetidas à ação de diferentes medicamentos, dentre eles o peróxido de hidrogênio, aos 12 dias, houve proliferação vascular na porção superficial da ferida e, ainda, presença de células inflamatórias linfocitárias, sendo similares com as alterações observadas no presente estudo, embora os tempos de avaliação tenham sido superiores (15 e 30 dias).

Nas avaliações da angiogênese, por meio da imuno-histoquímica, tanto para proteína Ki-67, quanto VEGF, houve níveis de neovascularização semelhantes. No grupo controle, ambas as proteínas apresentavam marcação discreta. Da mesma forma, nos grupos PVPI e clorexidina, também houve imunomarcação discreta. No entanto, no grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> houve predominância de formação endotelial discreta, embora um animal tenha demonstrado intensidade de angiogênese. Mutschall *et al.* (2009) citam a proteína VEGF, como sendo o principal fator promotor da angiogênese, dentre outros já conhecidos. Figueiredo *et al.* (2003), citam que os níveis de VEGF são elevados em condições inflamatórias, isso explicaria a ocorrência de neovascularização presente em todos os grupos, apesar de ser, predominantemente, discreta e das lesões dos grupos PVPI e controle ter demonstrado fechamento completo vistos a olho nu. O Ki-67 é expresso em núcleos de células durante as fases de divisão celular, sendo considerado marcador de proliferação celular. Embora algumas feridas já estivessem cicatrizadas, macroscopicamente, na avaliação dos marcadores celulares, foi possível observar que, ainda estavam em processo cicatricial, encontrado-se, principalmente, na fase de proliferação, indicando a presença de angiogênese.

A formação de úlcera, limitada ao grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é um aspecto patológico do reparo e nesse caso, sua presença pode ser explicada pelo fato de haver pouco suprimento sanguíneo intrínseco adequado ou vascularização insuficiente durante o processo cicatricial (ROBBINS e COTRAN, 2010)

É sabido que a presença de hemorragia, a qual ocorre imediatamente à injúria tecidual, denota que a cicatrização sofrida pelas células, está sob a influência da fase de inflamação, onde é esperado encontrar esse tipo de alteração (VASCONCELLOS *et al.*, 2001). Por ter sido observado em apenas um animal de cada grupo, indica que mesmo as amostras terem sido coletadas, aos 15 dias, embora, tenha sido um número pequeno de animais, estes demonstraram atraso no processo cicatricial, corroborando com Vieira *et al.* (2008). Neste estudo foi observada a presença de hemorragia, além de células inflamatórias, no exame histopatológico de pele, aos cinco dias de pós operatório, no qual avaliou-se o processo cicatricial de ferida cirúrgica na presença de corpo estranho, tratadas com óleo extraído de leguminosa.

O colágeno representa a proteína mais abundante no reino animal, sendo essencial para a integridade estrutural de tecidos e órgãos. Quando a síntese dessa proteína é reduzida, retardada ou anormal, o resultado consiste na falência da cicatrização da ferida. Em contrapartida, o excesso de deposição de colágeno acarreta fibrose, sendo esta a base para as doenças do tecido conjuntivo, dentre elas, lesões crônicas de órgãos e pele (ROBBINS e COTRAN, 2010). Nos grupos controle e clorexidina, 10 animais apresentaram graus de presença de fibras colágenas entre 75 e mais de 75%, indicando um processo de maturação, com tecido conjuntivo bem formado e rico em fibras colágenas ordenadas, corroborando Vasconcellos *et al.* (2001), em avaliações de processo cicatricial com o uso de corticoesteróides, após 21 dias de pós-operatório. Martins *et al.* (2003), citam a presença abundante de fibras colágenas em estudo sobre cicatrização, após 72 horas de instituição do tratamento. No grupo PVPI, cinco animais tiveram níveis de fibras colágenas de mais de 75%; três animais, apresentaram até 75% e cinco animais, entre 25 e 50%. E no grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cinco animais tiveram índices de 25 a 50% de fibras colágenas; dois animais até 75% e três animais obtiveram índice de mais de 75% de presença de fibras colágenas.

Os fibroblastos são células reguladoras por apresentar a dupla função de síntese e reabsorção de colágeno, afim de manter o equilíbrio quantitativo e qualitativo dessa proteína (GARROS *et al.*, 2006). Nas avaliações microscópicas, por meio do anticorpo Ki-67, nos grupos controle, PVPI e clorexidina, a proliferação de fibroblastos foi considerada discreta, variando de forma insignificante entre moderado e intenso. No grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os níveis variaram de moderado, intenso a abundante. Segundo Vasconcellos e colaboradores (2001), animais avaliados ao 21º dia de pós-operatório, apresentavam melhor arranjo de

fibroblastos e de fibras colágenas, com distribuição ordenada e paralelas entre si, ao contrário do que foi analisado ao sétimo dia. O presente estudo está em concordância com os resultados obtidos por Magro-Filho *et al.* (1998), que observaram baixos níveis de fibroblastos nos grupos controle, PVPI e clorexidina, devido, talvez, ao seu poder antimicrobiano, embora a avaliação não tenha sido feita por meio de imuno-histoquímica. Cavalvanti Neto *et al.* (2005), em estudos realizados *in vitro* demonstraram o efeito citotóxico da clorexidina, limitando a produção de colágeno pelos fibroblastos, interferindo na sua proliferação. E citam, também, que a ação antimicrobiana dessa solução ultrapassa qualquer ação danosa, uma vez que estudos clínicos comprovam que a redução da contaminação bacteriana é inversamente proporcional ao processo de cicatrização *in vivo*.

Em relação a avaliação da formação de epiderme, por meio da imuno-histoquímica foram observados nos grupos controle e PVPI, que ambos tiveram níveis de formação de epiderme de até 25%, variando entre os níveis de forma insignificante. O grupo clorexidina apresentou níveis de formação de epiderme de até 25% (sete animais). No grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a formação de epiderme teve níveis de 25 a 50% (seis animais), embora variassem de forma não significativa. O Ki-67 reage com antígenos presentes no núcleo de células da camada basal do epitélio, que é a camada que tem capacidade proliferativa e origina os ceratinócitos que migram, constituindo as outras camadas epidérmicas. Assim, a expressão do Ki-67, típico de epitélio com hiperproliferação, indica que as amostras obtidas estavam sofrendo processo de cicatrização, obviamente em fase de proliferação celular (GIANOTTI, 2011; GARCEZ, 2012).

## 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos, a partir da metodologia desenvolvida, no presente trabalho podemos concluir que:

- O grupo controle obteve maior taxa de contração das feridas, cicatrizando em menos tempo que o grupo PVPI e clorexidina, embora essa diferença de tempo não tenha sido significativa, estatisticamente;
- Apesar de as feridas se apresentarem cicatrizadas macroscopicamente, a partir da avaliação histológica foi possível perceber que havia alterações, que caracterizavam processo cicatricial em curso;
- O grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcionou resultados positivos perante o que foi proposto, embora o número de animais não tenha sido significativo.

Com base nos resultados obtidos através desse estudo, o modelo que proporcionou lesões com aspecto macroscópico e microscópico de ferida cutânea crônica, foram os animais que receberam o agente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este modelo se apresentou como alternativa de estabelecimento de modelo de ferida cutânea crônica experimental, conforme proposta do presente trabalho.

Sugere-se que outros estudos sejam realizados, com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no qual o período de uso do agente seja prolongado, ou seja, superior ao usado no presente estudo. E, em conjunto com o modelo proposto por Galiano *et al.* (2004), onde, além da aplicação do agente químico, utiliza-se, também, o anel de silicone, fixado nas bordas da ferida, com o intuito de evitar a cicatrização por contração. Sugere-se, também, o uso de doses elevadas de analgésico durante todo o tempo de experimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.J.G.T. **Análise da efetividade da terapia fotodinâmica sobre feridas cutâneas infectadas por *Staphylococcus aureus*, em ratos.** Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP, São José dos Campos, 2011.
- ALLRED, C.D.; HARVEY, J.M.; BERNARDO, M.; CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Modern Pathology**. v,11, n.2, p.155-168, 1998.
- ALVES, D.F.S.; CABRAL JR, F.C.; CABRAL, P.P.A.C.; OLIVEIRA JR, R.M.O.; REGO,A.C.M.; MEDEIROS, A.C. Efeitos da cicatrização tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.35, n3, p.188-192, 2008.
- ANDERSON, D. Wound management in small animal practice. **In Practice**, v.18, n.3, p.115-129, mar.1996.
- ANDRADE, S.F. Analgésicos. In: **Manual de terapêutica veterinária**. 2ed. São Paulo, Roca, 2002.
- ARAÚJO, C.F.R.; SOUZA FILHO, Z.A.; GRECA, F.H.; GUERREIRO, M.H.C.P.M.; LEITE, A.L.; MAN A.E.C.; KANTOR, D.C.; NASSIF, A.E. Efeitos do agarol e do trigliceril sobre a cicatrização de pele. Estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.** v.13, n.4, 1994.
- BALBINO, C.; PEREIRA, L.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrizaçãoÇ uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v.41,n.1,p.27-51, 2005.
- BARRA, M.B. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da AMRIGS**, v.50, n.2, p.173-184, 2006.
- BEHEREGARAY, W.K.; GIANOTTI, G.C; LEAL, J.S.; MONTEIRO, F.M.; SIMAS, S.M.; ELIZEIRE, M.; CONTESINI, E.A. Uso do laser ALGaNP na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n.3, p.237-243, 2010.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>. São Paulo, 2004.
- BORGES, E. *et al.* **Feridas: como tratar**. Coopmed, Belo Horizonte, p.97-120, 2001.
- BRYANT, R. **Acute and chronic wounds: nursing managment**. 2ed. Mosby, St Louis, p.105-163, 1992.
- CAVALCANTI NETO, A.T.; ARRUDA, T.R.P.; ARRUDA, T.T.P.; PEREIRA, S.L.S.; TURATTI, E. 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.

D'ACAMPORA, A.J.; TRAMONTE, R.; BURGER, D.; BURGER, P.J. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.36, n.1, 2007.

D'ACAMPORA A.J.; VIEIRA, D.S.C.; SILVA, M.T.; FARIAS, D.C.; TRAMONTE, R. Morphological analysis of three wound-cleaning processes on potentially contaminated wounds in rats. **Acta Cir. Bras.** v.21, n.5, 2006.

DEALEY, C. Case study methodology in tissue viability. Part 2: A study to determinate the levels of knowledge of nurses providing care for patients with leg ulcers in an acute hospital setting. **J Tissue Viability**, v.11, n.1, p.28-34, 2001.

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

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

FERREIRA, M. *et al.* Wounds complex. **Clinics**, v.61, n.6, p.571-578, 2006.

FIGUEIREDO, L.C.; CORDEIRO, L.N.; ARRUDA, A.P.; CARVALHO, M.F.F.; RIBEIRO, E.M.; COUTINHO, H.D.M. Skin cancer: main molecular markers of cutaneous melanoma. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.49, n.3, p.179-183, 2003.

FLECKNELL, P. Pain Relief. In: **Laboratory Animal Anesthesia**. 3ed. p.160-163, 2009.

FONDER, M.A.; LAZARUS, G.S.; COWAN, D.A.; ARONSON-COOK, B.; KHOLI, A.R.; MAMELAK, A.J. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.58, n.2, p.185-206, 2008.

FONSECA, B. Microbiologia e biofilme em lesões crônicas: como avaliar? Disponível em: [http://www.abendf.com.br/PDF/SIMPOSIO/Palestra\\_Biofilme\\_Bianca\\_Fonseca.pdf](http://www.abendf.com.br/PDF/SIMPOSIO/Palestra_Biofilme_Bianca_Fonseca.pdf). Acesso em 17/11/2011.

GALIANO, R.D.; MICHAELS, L.V.; DOBRYANSKY, M.; LEVINE, J.P.; GURTNER, G.C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound repair and regeneration**, v.12, n.4, p.485-492, 2004.

GARCEZ, T.N.A. **Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas como adjuvantes na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre-RS, 2012.

GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.I.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, O.J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAÚJO, A.C.F.; SANTIS-ISOLAN, P.M.B; OLIVEIRA, R.N; ARRUDA, E.C.M. Extract form *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in



rats: morphometric and histological study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, n.3, p.55-60, 2006.

GIANOTTI, W.K.B. **Células tronco mesenquimais e eletrocupuntura na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre, 2011.

GOULD, L.J.; LEONG, M.; SONSTEIN, J.; WILSON, S. Optimization and validation of an ischemic wound model. **Wound Rep. Reg.**, v.13, n.6, p.576-582, 2005.

GU, L.; MO, E.; YANG, Z.; FANG, Z.; SUN, B.; WANG, C.; ZHU, X.; BAO, J.; SUNG, C. Effects of red deer antlers on cutaneous wound healing in full-thickness rat models. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v.21, n.2, p.277-290, 2008.

HARDIN, J.W.; HILBE, J.M. **Generalized estimating equations**. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, p.238, 2003.

HOSGOOD, G. **In: Manual de cirurgia de pequenos animais**, V.1. SLATTER, D.H. (Eds). 3.ed. São Paulo: Manole, 2007.

KNAPP, D. Tratamento de ferimento aberto. In: BIRCHARD & SHERDING. **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p.434-438, 1998.

KIRSTEN, V.R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Animal models for type 1 diabetes studies. **Medicina** (<http://www.fmrp.usp.br/revista>), v.43, n.1, p.3-10, 2010.

MA, H.; LI, Y.; CHEN, H.; KANG, M.; CHENG-YI LIU, T. Effects of Low-Intensity Laser Irradiation on Wound Healing in Diabetic Rats. **International Journal of Photoenergy**, v.2012, p.7, 2012.

McFARLANE, R.M.; DEYOUNG, G.; HENRY, R.A. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plast Reconstr Surg**, v.35, p.177-82, 1965.

MAGRO FILHO, O.; OKAMOTO, T.; GARCIA-JUNIOR, I.R.; ARANEGA, A.; DEZAN JUNIOR, E. Biocompatibilidade das soluções de iodo polivinilpirrolidona (PVP-I) e de clorexidina. Estudo histológico em ratos. **BCI**, v.5, n.3, p.9-13, 1998.

MANDELBAUM S.H.; DI SANTIS E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part II. **An. Bras. Dermatol.** v.78, n.5, p.525-542, 2003.

MARTINS, M.F.; CAETANO, F.A.M.; SÍRIO, O.J.; YIOMASA, M.M.; MIZUSAKI, C.I.; FIGUEIREDO, L.D.; PACHECO, P. Evaluation of the *Achatina fulica* snail mucoglycoproteic secretion in surgical injury done in rabbits. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, n.3, p.213-218, 2003.

MATOS, D.S. **Avaliação do efeito cicatrizante de diferentes formulações fitoterápicas do extrato de repolho (*brassica oleracea var. capitata*) em coelhos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Vale do Rio Doce. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Governador Valadares, MG, 2008.

MATTOS, I.L.; SHIRAISHI, K.A.; BRAZ, A.D.; FERNANDES, J.R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Quim. Nova**, v.26, n.3, p.373-380, 2003.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v.84, n.3, p.257-262, 2009.

MOGFORD, J.E.; SISCO, M.; BONOMO, S.R.; ROBINSON, A.M.; MUSTOE, T.A. Impact of Aging on Gene Expression in a Rat Model of Ischemic Cutaneous Wound Healing. **Journal of Surgical Research** v.118, n.2, p.190–196, 2004.

MOTTA, A.C. da. **Patologia molecular dos tumores mamários caninos: expressão de marcadores prognósticos e mioepiteliais**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina. Programa de Pós Graduação em Medicina, Ciências Médicas, Porto Alegre, Brasil, 2008.

MOURA, S.A.L. **Desenvolvimento de modelo experimental para o estudo do processo de cicatrização por segunda intenção em coelhos utilizando extratos da própolis verde de Minas Gerais-Brasil**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Viçosa, Minas Gerais, 2004.

MURPHY, H.S.; WARD, P.A. Inflamação. In: RUBIN, E. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4ed. Rio de Janeiro, Guanbara Koogan, 2010.

MUTSCHALL, L.; FRANÇA, P.C.; FERREIRA, L.E.; FRONZA JR, H.; BLASIOS, R.; PINHO, M. Analysis of relationship between VEGF protein expression and colorectal cancer staging. **Rev bras. colo-proctol**. v, 29, n.1, 2009.

NETO, J.C.L. Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em eqüinos. Disponível em: <http://br.merial.com/pdf/arquivo8.pdf>. Acesso em 17/11/2011.

PUANIO, K.U.; KNUUTTILA, M.; MIELITYINEM, H. The effect of chlorhexidine gluconate on the formation of experimental granulation tissue. **Journal of Periodontology**, v.49, n.2, p.92-95, 1978.

PAVLETIC, M. M. **Atlas of Small Animal Reconstructive Surgery**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. 434p.

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

RAISER, A.G. Regeneração tecidual. In: **Patologia Clínica Veterinária**. 1.ed. Universidade Federal de Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, v.1, cap.5, p.115-134, 1995a.

ROBBINS & COTRAN. Inflamação aguda e crônica. In: **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2010.

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

RUBIN, E.; STRAYER, D. Lesão celular. In: **Patologia: bases clinicopatológicas da Medicina**. 4ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010.

SALGADO, M.I.; PETROIANU, A.; BURGARELLI, G.L.; BARBOSA, A.J.A.; ALBERTI, L.R. Cicatrização conduzida e enxerto de pele parcial no tratamento de feridas. **Rev Assoc Med Bras**, v.53, n.1, p.80-84, 2007.

SCHANAIDER A, SILVA PC. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir Bras [serial online]**, v.19, n.4, 2004.

SEPHEL, G.C; WOODWARD, S.C. Reparação, regeneração e fibrose. In: RUBIN, E. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010.

SILVA, D.A.R.; COSTA, M.M.; VARGAS, A.C.; ALIEVI, M.M.; SCHOSSLER, J.E.W.; SILVA, T.R. Chlorhexidine gluconate or alcohol-iodine-alcohol in the antiseptics of surgical area in dogs. **Ciência Rural**, v.30, n.3, p.431-437, 2000.

STEINBERG, J.P.; HONG, S.L.; GERINGER, M.R.; GALIANO, R.D.; MUSTOE, T.A. Equivalent effects of topically-delivered adipose-derived stem cells and dermal fibroblasts in the ischemic rabbit ear model for chronic wounds. **Aesthet Surg J**. v.32, n.4, p.504-519, 2012.

SWAIN, S. F.; Bandages and Topical Agents. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.20, n.1, p.47-65, 1997.

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

TENIUS, F.P.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; IOSHII, S.O. Effects of chronic use of dexamethasone on cutaneous wound healing in rats. **An Bras Dermatol**. v.82, n.2, p.141-149, 2007.

TOBIAS, K.M.; Cicatrização primária de ferimentos. In: **Manual de cirurgia de tecidos moles em pequenos animais**. São Paulo, Roca, 2011.

THOMSON, R.G. Inflamação e Reparação. **Patologia Geral Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.4, p.144-250, 1983.

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

VASCONCELLOS, L.S.; ALBERTI, L.R.; NUNES, C.B.; PETROIANU, A. Effect of hydrocortisone on tensile skin cicatrization in mouse. **Rev. Col. Bras. Cir**. v.28, n.6, 2001.

VIEIRA, R.C; BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J.J.; LINO-JUNIOR, R.S.; BRITO, L.A.B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesq. Vet. bras**. v.28, n.8, p.358-366, 2008.

VILLA, L.M.R.; MILANEZI, L.A.; MELHADO, R.M.; GARCIA, V.G. Evaluation healing process of surgical wounds submitted to the action to the different medicaments: histological study in rats. **Rev. Odontol.** n.24, v.1, p.45-53, 2003.

VINDINSKY, B.; GÁL, P.; TOPORCER, T.; LONGAUER, F.; LENHARDT, L.; BOBROV, N.; SABO, J. Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. **Acta Vet. Brno**, v.75, p.197-202, 2006.

WALDRON, D.R.; TREVOR, P. Tratamento dos ferimentos superficiais. In: SLATTER, D.H. (Eds). **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, cap.25, p.334-347, 1998.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos Wistar. Loss, F.R. (2013)



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:** 120213

**Data da Versão do Projeto:** 21/06/2012

**Pesquisadores:**

ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA

FERNANDA REGINA LOSS

**Título:** Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental 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, 23 de julho de 2012.

Dr. Alessandro Osvaldo  
Coordenador CEUA/HCPA

APÊNDICE 2 - Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos Wistar. Loss, F.R. (2013)

FICHA CONTROLE CIRÚRGICO

Animal:

Data da indução:

Grupo: ( ) Controle ( ) PVPI 1% ( ) Clorexidina 1% ( ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%

GrupoÇ ( ) T15 dias ( ) T30 dias

Protocolo Anestésico: ( ) Isoflurano ( ) Outro Qual? \_\_\_\_\_

Tempo cirúrgico: Início: \_\_\_\_\_ Fim: \_\_\_\_\_

Intercorrência(s): Quais: \_\_\_\_\_

Exame da ferida pós operatório imediato:

Sangramento: Direita: ( ) Ausente ( ) Pouco ( ) Moderado ( ) Intenso

Sangramento: Esquerda: ( ) Ausente ( ) Pouco ( ) Moderado ( ) Intenso

Medição:

Extensão ferida D:

Crânio-caudal \_\_\_\_\_mm      Látero-lateral \_\_\_\_\_mm

Extensão ferida E:

Crânio-caudal \_\_\_\_\_mm      Látero-lateral \_\_\_\_\_mm

Número do Registro fotográfico:

Observações:

APÊNDICE 3 - Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos Wistar. Loss, F.R. (2013)

FICHA AVALIAÇÃO MACRO FERIDAS

Animal:

Data da indução:

Grupo: ( ) PVPI 1% ( ) Clorexidina 1% ( ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% ( ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% Crosta

Ferida : ( ) D ( ) E

Grupo: ( ) T15 dias ( ) T30 dias

1. Tecido Necrótico: ( ) Não ( ) Sim + ( ) Sim ++ ( ) Sim +++

2. Tecido de Granulação: ( ) Não ( ) Sim + ( ) Sim ++ ( ) Sim +++

Aspecto: \_\_\_\_\_ Localização: ( ) Margens ( ) Central ( ) Generalizado

3. Sinais de Infecção: ( ) Não ( ) Sim + ( ) Sim ++ ( ) Sim +++

A) Exsudato: ( ) Não ( ) Sim

B) Característica: ( ) Seroso ( ) Sero Sanguinolento

( ) Sanguinolento ( ) Purulento

C) Volume: ( ) (O) Ausente ( ) (+) Pouco

( ) (++) Moderado ( ) (+++) Acentuado

D) Odor: ( ) (O) Ausente ( ) (+) Pouco

( ) (++) Moderado ( ) (+++) Acentuado

4. Dor/Escore ( ) (O) Ausente ( ) (+) Pouco ( ) (++) Moderado ( ) (+++) Acentuado

5. ( ) Hiperemia ( ) Hiperpigmentação ( ) Edema ( ) Cianose ( ) Crosta

A) Localização na lesão: ( ) Margens ( ) Central ( ) Generalizado

B) Localizado ao redor da lesão ( )

C) Grau: ( ) (O) Ausente ( ) (+) Pouco ( ) (++) Moderado ( ) (+++) Acentuado

6. Extensão da Ferida

Crânio-caudal \_\_\_\_\_ mm

Látero-lateral \_\_\_\_\_ mm

7. Observações:

Data:

Examinador:



APÊNDICE 4 - Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos Wistar. Loss, F.R. (2013)

FICHA CONTROLE BIÓPSIA

Animal:

Data da indução:

Data da Biópsia:

Grupo: ( ) PVPI 1% ( ) Clorexidina 1% ( ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% ( ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% Crosta

Ferida : ( ) D ( ) E

Grupo: ( ) T15 dias ( ) T30 dias

1) Extensão da Ferida D

Crânio-caudal \_\_\_\_\_mm

Látero-lateral \_\_\_\_\_mm

2) Extensão da Ferida E

Crânio-caudal \_\_\_\_\_mm

Látero-lateral \_\_\_\_\_mm

Número do Registro fotográfico:

Destino material:

Observações:

