

RESSALVA

Alertamos para a ausência, no texto, dos itens 4.3 Análise morfométrica das feridas dérmicas, 5. Discussão, 6. Conclusão e Bibliografia, não incluídos pelo autor no arquivo original.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA CICATRIZAÇÃO NA PELE DE COELHOS APÓS
TRATAMENTOS DE FERIDAS COM BIOMATERIAIS
ASSOCIADOS À FRAÇÃO DE PROTEÍNA DO LÁTEX
NATURAL DA SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*).**

Pós-graduando: Leonardo de Oliveira Pagnano

JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL

2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA CICATRIZAÇÃO NA PELE DE COELHOS APÓS
TRATAMENTOS DE FERIDAS COM BIOMATERIAIS
ASSOCIADOS À FRAÇÃO DE PROTEÍNA DO LÁTEX
NATURAL DA SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*).**

Pós- Graduando: Leonardo de Oliveira Pagnano

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção de título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL

JUNHO DE 2009

Pagnano, Leonardo de Oliveira

P139a Análise da cicatrização na pele de coelhos após tratamentos de feridas com biomateriais associados à fração de proteína do látex natural da seringueira (*Hevea brasiliensis*) / Leonardo de Oliveira Pagnano. – – Jaboticabal, 2009

xiii, 94 f. : il.,. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientadora: Silvana Martinez Baraldi Artoni

Banca examinadora: Isabel Cristina Boleli, Antônio Carlos Alessi, Joaquim Coutinho Netto, João José Lachat

Bibliografia

1. Coelho-orelha-cicatrização. 2. Coelho-pele-biomateriais. 3. Coelho-proteína-látex. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Leonardo de Oliveira Pagnano, nascido em 24 de abril de 1975 em Ribeirão Preto – SP, formou-se médico veterinário pela Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, em janeiro de 2000. Ingressou no Programa de Pós-Graduação da mesma instituição em agosto de 2003. Em julho de 2005 adquiriu o título de Mestre em Cirurgia Veterinária. Em agosto de 2005, ingressou no Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, terminando em junho de 2009.

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar
a vida com paixão, perder
com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
A vida é muita para ser
insignificante”*

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo Múcio (in memoriam) e Neuza, pela vida, pelos ensinamentos, pela educação, humildade, amor, confiança e por tudo aquilo que as palavras não podem traduzir neste momento especial da minha vida.

À Deus, pela vida, por tantos momentos de felicidade e por me acolher a cada derrota, me reerguendo e mostrando que nunca há nada perdido.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora e amiga, Profa.Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni, pela confiança e carinho.

À minha irmã, Profa. Dra. Valéria Pagnano de Souza, pelas correções e sugestões feitas para que se concretizasse este trabalho.

Aos professores e doutores: Joaquim Coutinho Netto e João José Lachat pelo o apoio e os ensinamentos a mim destinados.

AGRADECIMENTOS

À minha família por ser a base de tudo para mim.

Ao CNPQ, pelo importante auxílio financeiro.

A todos professores e funcionários do Departamento de Anatomia e Morfologia.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (Sr. José, Sra. Vera e Sra. Sílvia).

Aos amigos da Endovet – Centro Veterinário-e a todos os outros que, direta ou indiretamente, estiveram ao meu lado.

Ao setor do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP pelo auxílio para com os animais deste experimento.

Ao Prof. Dr. Marcos Lania de Araújo pelos conselhos e sugestões na qualificação.

À Prof. Dra. Maria Rita Pacheco pelas dicas apresentadas na qualificação.

À Prof. Dra. Laura Nakaghi pelas correções sugeridas na qualificação.

Ao Prof. Dr. José Wanderley Cattelan pelas ótimas e respeitadas sugestões para essa dissertação.

Aos colegas da pós-graduação que direta ou indiretamente teve contato comigo durante esse período.

Aos meus amigos e à minha namorada Larissa por terem me aturado em determinadas ocasiões.

A todos que colaboraram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
RESUMO.....	XIII
SUMMARY	XV
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Cicatrização	01
1.2. Tecido conjuntivo.	04
1.3. Biomateriais	05
1.3.1. Fibracol plus® (colágeno + alginato).....	06
1.3.2. Ácido hialurônico.....	07
1.3.3. Látex natural	08
2. REVISÃO DA LITERATURA	09
2.1. Anatomia e fisiologia da pele	09
2.2. Tecidos conjuntivos.....	10
2.2.1. Fibroblastos.....	11
2.2.2. Fibrócitos.....	12
2.2.3. Miofibroblastos.....	12
2.2.4. Macrófagos.....	13
2.2.5. Neutrófilos.....	14
2.3. Cicatrização das feridas.....	14
2.3.1. Estágios do processo cicatricial de uma ferida.....	15
2.3.1.1. Coagulação.....	15
2.3.1.2. Inflamação.....	16
2.3.1.3. Proliferação.....	19
2.3.1.4. Contração.....	21
2.3.1.5. Remodelação.....	22
2.4. Fatores de crescimento.....	23
2.4.1. PDGF – Família do fator de crescimento derivado de plaquetas	25

2.4.2. FGF – Família do fator de crescimento de fibroblasto.....	25
2.4.3. EGF – Família do fator de crescimento epidérmico.....	26
2.4.4. VEGF – Família do fator de crescimento v�sculo endotelial..	26
2.4.5. TGF-� – Fator de crescimento transformador-�	27
2.5. Variáveis que podem interferir no processo cicatricial	28
2.6. Tipos de ferida	30
2.7. Biomateriais	31
2.7.1. �cido hialurônico.....	32
2.7.2. Colágeno + alginato (Fibracol plus�).....	33
2.7.3. Látex Natural.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Coleta do látex natural	37
3.2. Obtenção do soro de látex	37
3.3. Cromatografia clássica em DEAE-celulose para obtenção da fração angiogênica FrHb1	38
3.4. Preparo do gel de ácido hialurônico associado � fração FrHb1	38
3.5. Preparo das membranas de fibracol plus� associadas à fração FrHb1	39
3.6. Preparo das feridas dérmicas	40
3.7. Delineamento experimental.....	40
3.8. Considerações �ticas	43
3.9. Protocolos de avaliação	43
3.9.1. Avaliação clínica	43
3.9.2. Avaliação histológica e morfométrica.....	43
3.9.3. Análise estatística	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Avaliação clínica das feridas submetidas aos tratamentos	45

4.2. Análise histológica das feridas dérmicas.....	52
4.2.1. Avaliação histológica semi-quantitativa	52
4.3. Análise morfométrica das feridas dérmicas	60
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO.....	73
7. REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Esquema demonstrativo da utilização dos tratamentos nas feridas no período de observação experimental de 3 dias. Este esquema é repetido para os períodos 7º, 14º e 21º dias.	42
Tabela 2. Avaliação macroscópica semi-quantitativa das feridas nas orelhas de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco, submetidos à diferentes tratamentos nos diferentes dias.....	47
Tabela 3. Avaliação histológica semi-quantitativa dos segmentos de tecidos das orelhas de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco, submetidos à diferentes tratamentos nos diferentes dias.....	55
Tabela 4. Análise de variância.....	60
Tabela 5. Valores dos níveis mínimo de significância (p) da análise de variância dos tratamentos, repetição entre os tratamentos, interação tratamento x dia, coeficientes de variação e R^2 no modelo de ferida experimental na pele da orelha de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco submetidos à diferentes tratamentos.....	61
Tabela 6. Valores médios e desvios padrão das contagens dos fibroblastos presentes na ferida da orelha de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco, em função do dia e do tratamento.	63
Tabela 7. Valores médios e desvios padrão das contagens dos leucócitos presentes na ferida da orelha de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco, em função do dia e do tratamento.....	64

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Fotomacrografia da orelha de coelho com quatro feridas de 6 mm de diâmetro cada, nas quais, foram aplicados os tratamentos..... 40
- Figura 2.** Fotomacrografia evidenciando as feridas dérmicas no 3º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6 48
- Figura 3.** Fotomacrografia evidenciando as feridas dérmicas no 7º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6 49
- Figura 4.** Fotomacrografia evidenciando as feridas dérmicas no 14º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6 50
- Figura 5.** Fotomacrografia evidenciando as feridas dérmicas no 21º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6 51
- Figura 6.** Fotomicrografia das feridas dérmicas de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco no 3º dia pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6. Hematoxilina-eosina, 200x 56

Figura 7. Fotomicrografia das feridas dérmicas de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco no 7º dia pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6. Hematoxilina-eosina, 200x 57

Figura 8. Fotomicrografia das feridas dérmicas de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco no 14º dia pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6. Hematoxilina-eosina, 200x..... 58

Figura 9. Fotomicrografia das feridas dérmicas de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco no 21º dia pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6. Hematoxilina-eosina, 200x..... 59

Figura 10. Representação gráfica do número médio de fibroblastos presentes na ferida da orelha de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco submetidos à diferentes tratamentos, no 3º, 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório..... 63

Figura 11. Representação gráfica do número médio de leucócitos presentes na ferida da orelha de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco submetidos à diferentes tratamentos, no 3º, 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório..... 64

ANÁLISE DA CICATRIZAÇÃO NA PELE DE COELHOS APÓS TRATAMENTOS DE BIOMATERIAIS ASSOCIADOS À PROTEÍNA DO LÁTEX NATURAL DA SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*)

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de cicatrização de uma fração de proteína extraída do látex da seringueira em diferentes concentrações (0,01% e 0,001%) associada a diferentes biomateriais (Fibracol plus® e ácido hialurônico a 1%). Utilizaram-se 36 coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco submetidos à realização de 4 feridas em cada orelha. Dividiu-se o experimento em etapas de acordo com a análise do período pós-operatório (3º, 7º, 14º e 21º dias), sendo utilizados 9 animais para cada etapa. Na primeira etapa (3º dia de pós-operatório), os animais foram numerados aleatoriamente de 1 a 9, sendo que em 3 animais, nas orelhas esquerdas, as feridas foram tratadas com solução salina (T1) e nas orelhas direitas, as feridas foram tratadas com membrana de Fibracol plus® + FrHb1 a 0,01% (T2). Em outros 3 animais, realizaram-se os mesmos procedimentos, diferenciando os tratamentos, onde nas feridas das orelhas esquerdas o tratamento foi com Fibracol plus® (T3) e nas feridas das orelhas direitas Fibracol plus® + FrHb1 a 0,001% (T4). Nos 3 animais restantes, seguiram-se os mesmos procedimentos, inserindo nas feridas das orelhas esquerdas ácido hialurônico a 1% + FrHb1 a 0,01% (T5) e nas feridas das orelhas direitas ácido hialurônico a 1% + FrHb1 a 0,001% (T6). Os animais foram sacrificados no 3º dia de pós-operatório e as feridas foram analisadas macroscopicamente e em seguida separadas para a análise histológica. Estes procedimentos foram repetidos para as etapas de 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Os segmentos de tecidos com as feridas foram fixados em solução de Bouin por 24 horas, e processados rotineiramente, para inclusão em paraplast e posterior avaliação histológica e morfométrica. A morfometria foi

realizada por meio do sistema analisador de imagens IMAGE PRÓ- PLUS¹ e a avaliação da cicatrização foi feita pela contagem de fibroblastos e leucócitos. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (ANOVA e teste de Tukey a 5%). De acordo com os resultados obtidos nesta investigação, foi observado que os tratamentos com a fração de proteína extraída do látex (FrHb1) associada ao ácido hialurônico a 1% propiciaram a obtenção de melhores resultados na cicatrização das feridas em relação aos demais tratamentos avaliados.

Palavras-chave: biomaterial, cicatrização, coelhos, fibroblastos, látex, leucócitos

® Johnson & Johnson Medical Ltda. Gargrave, Grã-Bretanha

¹ Image PRÓ-PLUS- Cybernetics- CA-USA

ANALYSIS OF WOUND HEALING IN THE SKIN OF RABBITS AFTER TREATMENTS OF BIOMATERIALS ASSOCIATED TO THE PROTEIN OF THE NATURAL LATEX OF RUBBER TREES (*Hevea brasiliensis*)

SUMMARY - The aim of this study was to evaluate the potential for healing of a fraction of protein extracted from the latex of rubber trees in different concentrations (0.01% and 0.001%) associated with various biomaterials (Fibracol plus®¹ and hyaluronic acid to 1%). There were used 36 New Zealand White rabbits underwent achievement of 4 wounds on each ear. The experiment was divided into stages according to the analysis of the postoperative period (3, 7, 14 and 21 days), and 9 animals used for each step. In the first stage (day 3 post-surgery), animals were randomly numbered from 1 to 9, with 3 animals in the left ear, the wounds were treated with saline (T1) and the right ear, the wounds were treated with membrane of Fibracol plus® + FrHb1 to 0.01% (T2). In 3 other animals, the same procedures were held, differing treatments, where the wounds of the left ear they were treated with Fibracol plus® (T3) and the wounds of the right ears Fibracol Plus® + FrHb1 to 0.001% (T4). In the 3 remaining animals, there was followed by the same procedures, including the ears wounds hyaluronic acid at 1% + FrHb1 to 0.01% (T5) and right ears wounds of hyaluronic acid 1% + FrHb1 a 0.001% (T6). The animals were sacrificed at 3 days postoperatively and the wounds were examined macroscopically and then separated for histological analysis. These procedures were repeated on the steps of 7, 14 and 21 days postoperatively. The segments of the injured tissues were fixed in Bouin solution for 24 hours and routinely processed for inclusion in paraplastic and subsequent histologic and morphometric evaluation. The morphometry was performed using the image analyzing system (Image Pro-PLUS²) and the evaluation of healing was done by enumeration of leukocytes and fibroblasts. The data were subjected to statistical analysis (ANOVA and Tukey test at 5%). According to the results and methodology used in this experiment, it was observed that the treatment

¹ Johnson & Johnson Medical Ltda. Gargrave, Grã-Bretanha

² Image PRÓ-PLUS- Cybernetics- CA-USA

with the fraction of protein extracted from the latex (FrHb1) associated with hyaluronic acid to 1% provided better results in healing of wounds in relation to other evaluated treatments.

Keywords: biomaterial, healing, rabbits, fibroblasts, latex, leukocytes

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cicatrização

A cicatrização tem sido amplamente estudada e abordada em diferentes linhas de pesquisa com o objetivo de otimizá-la, abrangendo aspectos diversos como, por exemplo, fisiopatologia, fatores de risco, drogas anti-inflamatórias e substâncias químicas que possam interagir com a cicatrização. A procura de novos procedimentos cirúrgicos e/ou novas drogas que possam interferir nesse processo tornou-se quase uma obsessão nos dias atuais (BRITO FILHO et al., 2006).

A cicatrização de feridas é composta por uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos e por eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a restauração tecidual (ORTONNE & CLÉVY, 1994). É um fenômeno que visa restabelecer a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado. Além disto, é um processo fisiológico que se inicia com resposta inflamatória aguda, manifestada através de edema e exsudato seroso rico em leucócitos (ABLA & ISHIZUKA, 1995).

O processo cicatricial é dividido em fases: coagulação, inflamação, proliferação (angiogênese, fibroplasia e epitelização), contração e remodelação, devido à extrema complexidade e interação de seus eventos (HUNT, 1990).

- **Fase de coagulação:** o início é imediato após o surgimento da ferida. Esta fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação (TERKELTAUB & GINSBERG, 1998).

- **Fase de inflamação:** caracteriza-se pela presença de eritema, calor, edema e dor. Ocorre a chegada dos polimorfonucleares, responsáveis pela fagocitose, incluindo-se, outrossim, o macrófago que é a célula inflamatória mais importante desta fase. Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, esta fase conta com o importante papel da fibronectina, que é sintetizada por fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, aderindo-se à fibrina e ao colágeno, servindo como cola para

consolidar o coágulo de fibrina (DIEGELMANN et al., 1981).

- **Fase de proliferação:** é decisiva na vascularização do “espaço morto” localizado entre as bordas da ferida. A atividade proliferativa vascular é seguida por fibroplasia e acúmulo de fibras colágenas produzidas pelos fibroblastos (ÁLVARES, 1972; ESPEY, 1980). A neovascularização (angiogênese) é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes no local da ferida, para que ocorra cicatrização adequada (MANDELBAUN, 2003). Nesta fase há migração de queratinócitos não danificados das bordas das feridas e dos anexos epiteliais (CHRISTOPHER, 1972). Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio, provocando epitelização do local da injúria tecidual (CHRISTOPHER, 1972).

- **Fase de contração:** é o movimento centrípeto das bordas da ferida (STEGMAN et al., 1982).

- **Fase de remodelação:** está relacionada à reformulações das fibras colágenas e reabsorção de água que são eventos que permitem maior conexão, o que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura (DOILLON et al., 1985).

Durante a evolução do processo de reparo, foi observado que existe o envolvimento de mediadores derivados da circulação (frações livres do complemento, fatores de coagulação, moléculas do sistema fibrinolítico e hormônios), cininas (histamina, bradicinina e serotonina), mediadores proteicos (citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídios e estruturas da matriz extracelular) e mediadores lipídicos (eicosanóides). Observa-se entre eles grande diversidade de natureza química, fontes produtoras e forma de influência sobre as células. A concentração elevada de alguns mediadores, assim como a ausência de outros, pode comprometer seriamente o reparo dos tecidos (BALBINO et al., 2005).

Os principais mediadores que atuam no processo cicatricial são os fatores de crescimento, que são proteínas que se ligam aos receptores da superfície celular, ativando a proliferação e/ou diferenciação celular. Muitos fatores de crescimento são

versáteis, estimulando a divisão celular em diferentes tipos de células, enquanto outros são específicos para um tipo particular de célula. A ligação aos receptores presentes na superfície da célula alvo emite um sinal que atravessa a membrana citoplasmática e efetua um comando celular ou nuclear. Estes processos, muitas vezes, são básicos no funcionamento da célula, tais como: angiogênese, mitogênese, transcrição genética, entre outros (FITZPATRICK, 2005).

O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) é um potente ativador de células de origem mesenquimal, estimulador da quimiotaxia e proliferação celular, expressão de novos genes nos monócitos, macrófagos e fibroblastos e acelera a deposição de matriz extracelular (PIERCE, 1991).

A família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é composta de 22 membros estruturalmente relacionados (ORNITZ, 2001). A maioria dos membros desta família possui amplo espectro de ação mitogênica, estimulando a proliferação de células de origem mesodérmica, ectodérmica e endodérmica (WERNER, 1998). São mitogênicos também para vários tipos celulares presentes no tecido lesado, incluindo fibroblastos e queratinócitos (ABRAHAM, 1996).

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um potente estimulador da epitelização, que promove a formação do tecido de granulação e também estimula a motilidade dos fibroblastos para a área lesionada (HONG et al., 2006).

O fator de crescimento vaso endotelial (VEGF) foi identificado como o principal regulador da angiogênese durante o desenvolvimento (GALE, 1999). Os macrófagos e os queratinócitos da região em reparo aumentam de forma pronunciada a expressão gênica de VEGF (FRANK et al., 1995) e seus receptores estão aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação (LAUER et al., 2000). Esta hipótese foi reforçada pela demonstração de que sua neutralização por anticorpos anti-VEGF reduz a angiogênese, diminui a formação de tecido de granulação e o acúmulo de fluidos em regiões que sofreram a lesão (HOWDIESHELL et al., 2001).

As moléculas da família do fator de crescimento transformador- β (TGF- β) são agentes quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos (ASSOIAM et al., 1983). Além das atividades quimioatraentes dos membros dessa superfamília, eles possuem

papel importante na fibroplasia, pois são mitogênicos para fibroblastos, porém inibidores dos queratinócitos. O TGF- β também participa na diferenciação de miofibroblastos e do processo de angiogênese (DESMOULIERE et al., 1993).

Muitas variáveis tanto de ordem geral como de ordem local também podem influenciar esse longo e complexo processo cicatricial. Dos fatores gerais, interferem a idade, o estado nutricional, alterações cardio-circulatórias e de coagulação e utilização de drogas sistêmicas. Dos fatores locais podem interferir: o ambiente mais ou menos contaminado no qual ocorre a ferida, infecção sistêmica concomitante, uso de drogas imunossupressoras tópicas e ressecamento do leito da ferida (MANDELBAUN, 2003).

1.2. Tecido Conjuntivo

Os tecidos conjuntivos são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da forma do corpo dos animais. Do ponto de vista estrutural, os componentes do tecido conjuntivo podem ser divididos em três classes: células, fibras e matriz extracelular (substância amorfa). A ampla variedade de tecidos conjuntivos reflete a variação na composição e na quantidade de seus três componentes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Os tecidos conjuntivos são derivados do mesênquima, que por sua vez, é derivado do mesoderma; são constituídos por populações celulares heterogêneas, separadas umas das outras por um vasto material extracelular (substância extracelular). Algumas de suas principais funções são: isolamento do órgão, proteção, nutrição, regulação térmica, regeneração e reparação tecidual. (BANKS, 1992).

Algumas das principais células envolvidas no processo cicatricial são produzidas no próprio tecido conjuntivo como os fibroblastos, fibrócitos e miofibroblastos. Outras tais como os leucócitos (neutrófilos e macrófagos) vêm de outras partes do organismo e podem habitá-lo temporariamente (JUNQUEIRA &

CARNEIRO, 2008).

A principal célula envolvida na cicatrização é o fibroblasto (PARENTEAU et al., 1991; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Os fibroblastos são células formadoras de fibras do tecido conjuntivo propriamente dito e encontradas com maior frequência. A função principal dos fibroblastos é manter a integridade dos tecidos de sustentação, com a substituição lenta e contínua dos componentes da matriz extracelular (YOUNG & HEATH, 2000; EL-GHALBZOURI, 2002).

Na reparação de feridas, observam-se células conhecidas como miofibroblastos que estão envolvidas no processo cicatricial pela produção dos componentes da matriz extracelular, participação na síntese da matriz extracelular, resistência e na contração das feridas (GABBIANI, 2003) e desaparecem por apoptose (DESMOULIÈRE et al., 1993).

Os leucócitos são as células mais abundantes do sangue, e quando ocorre algum rompimento no vaso sangüíneo, um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório. Após este extravasamento passivo, os leucócitos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra invasão de microrganismos (ENGELHARD et al., 1998).

Os macrófagos são os primeiros agentes de defesa contra a presença de material particulado no interior do organismo, com papel na fagocitose e na remoção de restos celulares (BANKS, 1992).

1.3. Biomateriais

A busca incansável do ser humano por padrões de vida superiores e longevidade tem gerado cada vez mais a necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos conjuntivos vitimados por traumas ou patogenias. A bioengenharia de tecidos visa a regeneração e/ou restauração da função dos órgãos por meio da implantação de tecidos, células cultivadas fora do corpo e células que se proliferam em uma matriz implantada (VATS et al., 2003).

Até o presente momento, não há modelo de biomaterial que substitua completamente a pele na sua anatomia, fisiologia e estabilidade biológica. Os biomateriais para substituição de tecidos devem: ser de fácil manuseio, fácil aplicação, aderente, estéril, não tóxico, produzir mínima reação inflamatória, angiogênico e de baixo custo (METCALFE et al, 2006).

O termo biomaterial compreende qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética, idealizada para substituir, no todo ou em parte, sistemas biológicos que deixaram de ter suas funções (WILLIAN, 1987).

Biomateriais utilizados como matriz extracelular artificial incluem aqueles manufaturados sinteticamente. Alguns exemplos de biomateriais naturais incluem os polipeptídios, hidroxiapatita, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas, fibronectina, colágeno, quitosana e alginato. Esses materiais têm a vantagem de ser de baixa toxicidade e baixa resposta inflamatória e podem ser combinados em compósitos com outro material natural ou material sintético, podendo ser degradados naturalmente pelas enzimas (VATS, 2003).

A escolha do biomaterial apropriado visa a promoção de ambiente favorável ao crescimento celular e a aceleração da cicatrização (BRYANT, 1992).

1.3.1. Fibracol plus® (colágeno + alginato)

O fibracol plus® é um biomaterial à base de colágeno e alginato. O colágeno é uma das proteínas mais abundantes nos animais, responsável por manter a

integridade estrutural do órgão ou tecido e está presente na pele, sendo sintetizado principalmente por fibroblastos e miofibroblastos. Em tecidos como a pele, tendões e ossos que sofrem tração, o colágeno é organizado em fibras. O colágeno Tipo I está presente na derme e na fáscia dos tendões, sendo um importante componente do tecido cicatricial. O colágeno tem sido utilizado em curativos de feridas para acelerar a cicatrização. As propriedades da matriz de colágeno e alginato permitem rápido fechamento da úlcera venosa e diminuição de sua recorrência (GUEDES & AMARAL, 1998). TREMBLAY et al., (2005) utilizaram colágeno + alginato (fibracol plus®) em derme reconstruída, com indução de angiogênese.

Os tipos de colágenos predominantes são o tipo I (encontrado na pele e nos ossos), tipo II (encontrado nas cartilagens) e tipo III predominante nas paredes dos vasos sanguíneos (RATNER et al., 1998).

O alginato é um polissacarídeo natural abundante com potencial para a produção de curativos e para a fabricação de biofilmes devido às suas propriedades coloidais. É também biopolímero natural, heteropolissacarídeo, constituído por unidades de D-manurônico e L-gulurônico, ligadas em 1,4, formando o ácido algínico, produzido pelas algas marrons como *Laminaria digitata* e *Macrocystis pyrifera*.

O alginato na sua forma de sais de cálcio ou de sódio tem sido utilizado como hemostático local de ação rápida, em curativos para a cicatrização de úlceras e feridas na pele (GILCHRIST & MARTIN, 1983).

1.3.2. Ácido Hialurônico

É um polissacarídeo linear, de ocorrência natural, composto de unidades dissacarídicas repetitivas formadas por ligações β -1,4 ácido-D-glicurônico (β -1,3) N-acetil-D-glicosamina (KNUDSON & KNUDSON, 2001).

O ácido hialurônico é uma substância presente no organismo de todos os animais e em alguns vegetais, e encontra-se em todos os órgãos do nosso corpo, em diferentes proporções, sendo que a pele contém 56 % do total. No organismo

humano, esta substância é responsável pelo volume da pele, forma dos olhos e lubrificação das articulações, sendo normalmente produzido e degradado (SEGURA et al., 2005).

Como método terapêutico pode ser obtido a partir de animais ou a partir da fermentação de bactérias gram negativas com grandes vantagens, uma vez que permite a sua produção em escala industrial e, por não possuir proteínas animais, a reação alérgica é menos comum (BROW & JONES, 2005).

Ácido hialurônico solúvel tem sido utilizado em aplicações clínicas incluindo cirurgia ocular, visco-suplementação para artrite e cicatrização de feridas (ROSIER & O'KEEF, 2000).

1.3.3. Látex Natural

O látex natural é um material extraído da seringueira (*Hevea brasiliensis*), e devido às suas propriedades neoangiogênicas, adesão celular e formação de matriz extracelular, vem sendo utilizado com sucesso em recobrimento de úlceras, feridas cirúrgicas e traumáticas (FRADE, et al., 2001). É de origem natural, tratando-se de matéria prima nacional e de baixo custo, sem risco de transmissão de patógenos e de grande aplicabilidade clínico-social (MAURÍCIO, 2006).

A biomembrana de látex da seringueira, com finalidade terapêutica foi desenvolvida por COUTINHO-NETTO (2000)³ no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto/SP e, no ano de 1996, foi reportado o primeiro resultado da sua utilização experimental como substituto do esôfago cervical de cães (MRUÉ, 1996)

A biomembrana de látex apresenta aumento da permeabilidade e fluxo vascular, quando banhada com polilisina, e possui menor risco de transmissão de doenças em relação aos materiais provenientes de tecidos animais (MRUÉ, 2000).

O processo cicatricial, de acordo com a literatura é complexo e caracterizado

³ COUTINHO-NETTO, J. (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP). Comunicação pessoal 2000.

por seqüência concatenada de eventos morfofisiológicos. Tendo em vista as propriedades cicatrizantes de muitos biomateriais, com custo relativamente baixo e de fácil manipulação, este trabalho teve como objetivo avaliar as potencialidades da ação cicatricial da proteína extraída do látex natural em diferentes concentrações associada a diferentes biomateriais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Anatomia e fisiologia da pele

A pele recobre toda a superfície do corpo e é o seu maior órgão. Continua-se com as membranas mucosas que revestem os sistemas digestório, respiratório e urogenital, nos locais onde estes se abrem para a superfície. É dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme, firmemente unidas entre si (SANTOS, 2000). As células da epiderme incluem os estratos basal ou germinativo, espinhoso, granuloso, lúcido (onde não há pelos) e córneo, além de melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A derme é a camada mais profunda e é formada por tecido conjuntivo (SANTOS, 2000).

A epiderme organiza-se em camadas e, à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. A camada germinativa é a mais profunda, e faz limite com a derme, e a camada córnea é a mais superficial. A camada córnea, constituída por células escamosas, cheias de queratina, proporciona proteção contra traumas físicos e químicos. As várias camadas de queratinócitos intimamente unidos uns aos outros, fornecem barreira contra a invasão de microorganismos e água. O pigmento melanina na epiderme, protege os tecidos subjacentes dos efeitos nocivos da luz ultravioleta (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo. Nesta camada situam-se os anexos da pele,

muitos vasos sangüíneos, vasos linfáticos e nervos e está 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 provenientes do sangue, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). 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 sangüíneo na derme proporciona um mecanismo de termorregulação. As terminações nervosas sensoriais da derme mantêm o indivíduo em contato com o meio ambiente (ARNOLD et al., 1994).

2.2. Tecidos conjuntivos

O tecido conjuntivo é constituído por células bem diferenciadas e por abundante material intercelular. Este material intercelular é formado por substância fundamental, também chamado de matriz e por elementos fibrilares. A substância fundamental é formada por água e por macromoléculas alongadas, como as glicosaminoglicanas, proteoglicanas, glicoproteínas e ácido hialurônico. Os elementos fibrilares são as fibras elásticas, fibras reticulares e fibras colágenas. Este tecido possui vasos sangüíneos, nervos e células sem justaposição (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Os tecidos conjuntivos são responsáveis pela manutenção da forma do corpo dos animais, sendo que o papel mecânico é dado pelo conjunto de moléculas (matriz) que conecta as células e órgãos, dando desta maneira, suporte ao corpo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Diferente de outros tipos de tecidos (epitelial, muscular e nervoso), que são formados principalmente por células, o principal constituinte do tecido conjuntivo é a

matriz extracelular. As matrizes extracelulares consistem em diferentes combinações de proteínas fibrosas e de substância fundamental. Substância fundamental é um complexo viscoso (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e glicoproteínas, que fornece, desse modo, tensão e rigidez à matriz (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O tecido conjuntivo tem em sua composição células, fibras e substância amorfa, variando sua composição de acordo com sua característica, mostrando uma notável diversidade estrutural, funcional e patológica. Fibras, predominantemente compostas de colágeno, constituem tendões, aponeuroses, cápsulas de órgãos, e membranas que envolvem o sistema nervoso central (meninges). As fibras também constituem as trabéculas e paredes que existem dentro de vários órgãos, formando o componente mais resistente do estroma (tecido de sustentação) dos órgãos. As fibras são formadas por proteínas que se polimerizam formando estruturas muito alongadas. Os três tipos principais de fibras do tecido conjuntivo são as colágenas, as reticulares e as elásticas. As fibras colágenas e as reticulares são formadas pelo colágeno e as fibras elásticas são compostas principalmente pela elastina. O colágeno é o tipo mais abundante de proteína do organismo, representando 30% do seu peso seco (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Os tecidos conjuntivos possuem numerosas funções: conectam um tecido ou órgão ao outro; mantêm os órgãos suspensos da parede corporal ou de outros órgãos; isolam os órgãos e os protegem das lesões mecânicas, sendo responsável pela forma dos órgãos e do corpo; protegem o organismo, pois possuem numerosas células protetoras; podem ter a função de disseminação de agentes infecciosos por toda uma região. Além disso, atuam na nutrição, regulação térmica, metabolismo líquido e o armazenamento de reservas alimentares; sustentação, reparação e regeneração (BANKS, 1992).

As principais células envolvidas na cicatrização do tecido conjuntivo podem ser produzidas tanto no próprio tecido como podem vir de outras partes do organismo, habitando-o temporariamente, sendo elas: fibroblastos, fibrócitos, miofibroblastos e leucócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

2.2.1. Fibroblastos

São células com função de sintetizar fibras estruturais, proteínas como colágeno, elastina, glicosaminoglicanas e glicoproteínas. Os fibroblastos jovens são fusiformes, com longos processos celulares, núcleo grande, oval, vesicular com nucléolo evidente e com grande quantidade de citoplasma basófilo. São responsáveis pela secreção do pró-colágeno (BANKS, 1992).

Estas células também estão envolvidas na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Modulam sua capacidade metabólica refletindo na sua morfologia, onde, células com intensa atividade de síntese são denominadas de fibroblastos, e células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos. A capacidade regenerativa dos tecidos conjuntivos é observada quando são destruídos por lesões inflamatórias ou traumáticas. Nesses casos, não são capazes de se regenerar e o reparo é preenchido por um tecido que deixa uma cicatriz de tecido conjuntivo. A principal célula envolvida na cicatrização é o fibroblasto (PARENTEAU, 1991; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

2.2.2. Fibrócitos

São menores do que os fibroblastos e possuem aspecto fusiforme com poucos prolongamentos citoplasmáticos. Seu citoplasma é acidófilo, com pouca quantidade de retículo endoplasmático rugoso. O núcleo é menor que do fibroblasto, mais alongado e possui maior quantidade de cromatina quando comparado à célula ativa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Com estímulos adequados, como durante a cicatrização, os fibrócitos

revertem-se para o estado de fibroblastos e miofibroblastos, reativando sua capacidade de síntese (QUAN, 2004).

2.2.3. Miofibroblastos

Os miofibroblastos são células que exibem características de fibroblastos e de células musculares lisas; possuem a maioria das características dos fibroblastos, mas contêm uma quantidade aumentada de filamentos de actina e miosina que são abundantes nas células musculares lisas. Sua atividade contrátil auxilia no fechamento das feridas, após as lesões (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

2.2.4. Macrófagos

São células fagocitárias residentes no tecido conjuntivo. Podem variar desde células fusiformes na forma fixa, até células arredondadas ou ovais com processos celulares durante suas atividades migratórias. Os macrófagos se originam dos monócitos. No interior do sistema vascular (intravascular), esta célula é chamada de monócito. Ao entrar no compartimento do tecido conjuntivo (extravascular) são denominados de macrófagos. Tem papel fundamental na fagocitose e na remoção de restos celulares (BANKS, 1992), e também, conforme JUNQUEIRA & CARNEIRO (2008) fagocitam elementos anormais da matriz extracelular, células neoplásicas (cancerosas), bactérias e elementos inertes que penetram no organismo.

Os macrófagos dos tecidos podem proliferar-se localmente, produzindo novas células. Os macrófagos estão distribuídos na maioria dos órgãos e constituem o sistema fagocitário mononuclear. Em certas regiões, os macrófagos recebem nomes especiais, por exemplo, células de Kupffer no fígado, microglia no sistema nervoso central, células de Langerhans na pele e osteoclastos no tecido ósseo. O processo de transformação de monócito-macrófago resulta em um aumento no

tamanho da célula e em um aumento na síntese de proteína. Quando adequadamente estimulados, os macrófagos podem aumentar de tamanho e se arranjar em grupos formando células levemente semelhantes às epiteliais, ou ainda várias células podem fundir-se para formar células gigantes do tipo corpo estranho. Estes dois tipos especiais de células só são vistos em condições patológicas.

São células secretoras capazes de produzir uma impressionante variedade de substâncias que participam nas funções de defesa (fagocitose) e reparo dos tecidos (produção de citocinas e fatores de crescimento), na defesa imunológica contra infecção e tumores; na produção extra-hepática de bile, metabolismo de gordura e ferro, na destruição de eritrócitos envelhecidos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004), produção de citocinas, fatores de crescimento e angiogênese (RAPPOLEE et al., 1988).

2.2.5. Neutrófilos

Caracterizam-se por possuírem núcleos formados por dois a cinco lóbulos (mais freqüentemente três lóbulos) ligados entre si por finas pontes de cromatina. A célula muito jovem tem núcleo não segmentado em lóbulos, sendo chamada de bastonete (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

São constituintes normais dos tecidos conjuntivos, vindos do sangue por migração (diapedese) através da parede de capilares e vênulas. A diapedese aumenta durante as invasões locais de microrganismos (BRINKMANN et al. 2004).

2.3. Cicatrização das feridas

A cicatrização é um fenômeno complexo que visa restabelecer a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado. Consiste em uma

perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido (ORTONNE & CLÉVY, 1994; GILLTZER & GOEBELER, 2001; MARTIN & LEIBOVICH, 2005). A vascularização, a capacidade de regeneração da célula lesada e a influência hormonal também podem contribuir para um maior ou menor grau de substituição destas células e recuperação funcional do órgão (LAZAROV & STRATIEV, 1993). A cicatrização é um processo fisiológico que se inicia com resposta inflamatória caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade capilar, migração de leucócitos para a região lesada e extravasamento de plasma, formando o exsudato inflamatório (MODOLIN & BEVILACQUA, 1985; HILDEBRAND et al. 2005; MARTIN & LEIBOVICH, 2005).

O processo cicatricial depende de vários fatores como o tipo de pele, localização anatômica, idade (JULÍA et al. 1992), estado de saúde e nutricional do paciente, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, quadros sistêmicos infecciosos, uso de drogas sistêmicas e ressecamento do leito da ferida durante a cicatrização (MANDELBAUN et al. 2003).

2.3.1. Estágios do processo cicatricial de uma ferida

Diferentes classificações didáticas são utilizadas por vários autores para facilitar o entendimento do processo cicatricial, processo esse que é dinâmico e com fases interdependentes e simultâneas. De uma maneira mais completa, essas fases podem ser divididas em coagulação, inflamação, proliferação, contração e remodelação (FAZZIO, 2000).

2.3.1.1. Coagulação

Ocorrida a lesão e rompimento de vasos, a resposta imediata é a vasoconstricção dos pequenos vasos da região afetada, devido à influência nervosa (descargas adrenérgicas) e ações de mediadores oriundos da degranulação dos mastócitos (LEFKOVITS et al., 1995). Resposta essa que se prolonga por cinco a dez minutos, sendo seguida por vasodilatação (MADDEN, 1972; SCHILLING, 1976; SWAIM, 1980; JOHNSTON, 1981; PEACOCK, 1984). Essa fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação (TERKELTAUB, 1998). O resultado dessa seqüência é a formação do trombo hemostático rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial (LEFKOVITS et al., 1995). Em seguida, as plaquetas são ativadas por um grande número de substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial e na corrente sangüínea. O colágeno subendotelial exposto pela ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação são fortes agonistas da ativação e agregação plaquetárias e ativação do processo de coagulação, transformando o fibrinogênio em fibrina, iniciando a formação de matriz provisória (DAVIES, 1990).

As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento como o TGF- β , PDGF, VEGF, quimiocinas e também outras proteínas como o fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina que são encontradas em seus grânulos. A interação das proteínas dos grânulos plaquetários com o coágulo de fibrina somados à massa de corpos plaquetários agregados, ao se estabilizarem, formam uma matriz provisória. Esta se torna mais consistente à medida que a fibrina se polimeriza pelas vias intrínseca ou extrínseca da coagulação (CHETTIBI & FERGUSON, 1999).

A formação do coágulo serve não apenas para aproximar bordas das feridas, mas também para cruzar fibronectina, que servirá de base a fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (GRINNEL, 1981; CLARK, 1993).

2.3.1.2. Inflamação

A fase inicial ou inflamatória é dividida em fase humoral e celular, e ocorre logo após o trauma, caracterizando-se por alterações microcirculatórias tais como: vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular e acúmulo de plasma no local da ferida, caracterizando exsudato inflamatório (MODOLIN & BEVILACQUA, 1985; MARTIN & LEIBOVICH, 2005).

À medida que ocorre vasodilatação, um líquido contendo substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e enzimas, extravasa das vênulas. Isso é a chave para todos os eventos inflamatórios subsequentes. O aumento dessa permeabilidade vascular pode ser causado pela histamina; contudo a serotonina e as quininas também estão envolvidas. A ação dessas aminas resulta em tumefação de curta duração das células do endotélio vascular, o que cria espaço (fenestras) entre as células, para que posteriormente possa passar células de defesa (ROSS, 1968; SCHILLING, 1976; JOHNSTON, 1977; SWAIM, 1980; JOHNSTON, 1981). Ao mesmo tempo, inicia-se a resposta celular representada pela ação dos macrófagos e neutrófilos (MODOLIN & BEVILACQUA, 1985).

Os leucócitos podem chegar aos locais da ferida tanto por extravasamento dos vasos rompidos como por aderência ao endotélio. Essas células de defesa começam a se movimentar através das lacunas nas paredes vasculares aumentando a concentração local das mesmas (PEACOCK, 1984). Estes eventos são induzidos por estímulos exógenos (produtos bacterianos) ou endógenos (sistemas complemento C3a e C5a, metabólitos aracdônicos e citocinas) que atuam como fatores quimiotáticos atraindo os leucócitos para a área lesada, onde ocorrerá a fagocitose. Para tanto, um outro evento mediado pelo C3b mostra-se de extrema importância, a opsonização, caracterizada pelo reconhecimento do agente agressor e a sua ligação com o leucócito permitindo, finalmente, a destruição do agente lesivo através de produtos tóxicos de oxigênio e enzimas (ALBELDA et al., 1994).

O líquido que extravasa das vênulas aporta fibrinogênio e outros elementos coagulantes, que rapidamente vedam o endotélio vascular e os linfáticos lesionados,

o que impedirá a drenagem da área lesionada. Assim, a reação inflamatória fica localizada a uma área imediatamente circunjacente à lesão. Mais tardiamente a plasmina e a fibrolisina tem o papel de desobstrução, sendo retomada a drenagem linfática (SCHILLING, 1976; JOHNSTON, 1977; JOHNSTON, 1981; SWAIM, 1980; PEACOCK, 1984).

Logo após a lesão as primeiras células a chegarem são os neutrófilos, e a seguir, os macrófagos. O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase, pois fagocita bactérias, desbrida corpos estranhos, remove os neutrófilos que perderam a função e direciona o desenvolvimento do tecido de granulação (NEWMAN et al., 1992).

Ainda, por influência de ligantes a seus receptores de membrana, os macrófagos produzem e exportam mediadores lipídicos (eicosanóides), mediadores protéicos (citocinas e fatores de crescimento), outras proteínas (tais como frações de complementos e fatores de coagulação) e enzimas relacionadas ao reparo (tais como a collagenase). Além da ativação por ligantes, os macrófagos podem ser também ativados por alterações físico-químicas do microambiente. Nas regiões distais onde os vasos se romperam, o aporte de oxigênio fica comprometido em função da formação do trombo e aumento da celularidade. O fluxo de neutrófilos e macrófagos ativados para esta região aumentam a demanda por oxigênio com conseqüente elevação das concentrações de ácido láctico e queda de pH. Esta combinação de hipóxia, pH baixo e alta concentração de ácido láctico, ativa o macrófago para a produção de fatores de crescimento (KNIGHTON et al., 1981).

Os macrófagos podem coalescer, vindo a formar células gigantes multinucleadas, que são também fagocitárias. Podem evoluir até células epitelióides e histiócitos. Assim que a inflamação aguda cede, a permeabilidade vascular local é restaurada e as células sangüíneas deixam de passar para o espaço extracelular. Se persistir, é devido a uma inflamação crônica, e respondem à contínua presença de material estranho, incluindo as bactérias (ROSS, 1968; JOHNSTON, 1977; JOHNSTON, 1981; SWAIM, 1980; PEACOCK, 1984).

Os linfócitos também são encontrados nos locais de inflamação. Essas células são importantes na inflamação causada por bactérias, mas relativamente pouco

importantes na inflamação por traumas. A presença de linfócitos nas reações inflamatórias pode indicar alguma resposta imunológica ao material estranho (SWAIM, 1980; PEACOCK, 1984). Porém eles não são essenciais para a cicatrização das feridas, como os macrófagos (PEACOCK, 1984).

A vasodilatação local, extravasamento de líquido para o espaço extravascular, e a oclusão dos vasos linfáticos, são responsáveis pelos sinais clássicos da inflamação: rubor, tumor e calor. A pressão, e talvez a estimulação química produzem o quarto sinal, a dor (JOHNSTON, 1977; JOHNSTON, 1981; SWAIM, 1980; PEACOCK, 1984; JUNQUEIRA & CARNEIRO 2004).

2.3.1.3. Proliferação

Essa fase pode ser dividida em várias subfases. Ela é responsável pelo encontro das bordas da lesão. Uma dessas subfases é a reepitelização (MANDELBAUN et al. 2003). Nessa fase ocorre a migração de queratinócitos não danificados das bordas das feridas e dos anexos epiteliais. Tem a função de restabelecer a integridade da epiderme e da derme, caracterizando-se pela granulação e epitelização do tecido. A proliferação epitelial inicia-se por estimulação mitogênica e quimiotática do TGF α , EGF e KGF (FGF-7). Sabe-se que o plano de movimento dos queratinócitos migrantes é determinado também pelo conteúdo de água no leito da ferida. Feridas abertas e ressecadas, reepitelizam mais lentamente do que as ocluídas (BARRIENTOS et al., 2008).

Todo processo lesivo promove a perda de massa de tecido. O leito de uma ferida aberta precisa ser preenchido e para isto são operadas duas estratégias diferentes. Na primeira, a própria natureza anatômica da ferida proporciona um estímulo para a migração e proliferação das células (fibroblastos e células epiteliais) a partir das suas margens, efeito denominado “vizinhança livre” (MONTESANO E ORCI, 1988), onde as células basais próximas da ferida, ao perderem a interação com as células adjacentes, são ativadas, adquirem atividades mitóticas e proliferam em direção ao centro da lesão. Na segunda, mesmo quando o espaço da lesão está preenchido por tecido de granulação, as margens se movem uma em direção a

outra, como se houvesse uma força de tração invisível (PEACOCK, 1984).

Os macrófagos são essenciais para o reparo normal do ferimento. O impedimento da migração dos macrófagos causará um retardo no surgimento dos fibroblastos e com isso ficará reduzida a deposição de colágeno (ROSS, 1968; SCHILLING, 1976; JOHNSTON, 1977; JOHNSTON, 1981; PEACOCK, 1984).

Uma outra sub-fase é a fibroblástica. O termo fibroblasto é utilizado para descrição de uma célula ativamente engajada na produção da matriz do tecido conjuntivo, em contraste com sua fase latente, como o fibrócito. Logo após a lesão, as células mesenquimatosas indiferenciadas começam a transformar-se em fibroblastos migratórios (ROSS, 1968; MADDEN, 1972; JOHNSTON, 1977; JOHNSTON, 1981; SILVER, 1982; PEACOCK, 1984). Os fibroblastos são sujeitos a mudanças devido às forças mecânicas submetidas durante situações patológicas ou fisiológicas e, assim, organizam as fibras colágenas (KESSLER et al., 2001). Essa fase é extremamente importante na formação do tecido de granulação (fibroblastos, células inflamatórias, componentes neovasculares, fibronectina, glicosaminoglicanas e o colágeno). Os fibroblastos estão diretamente relacionados à formação do tecido de granulação. Além de produzir colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (VAN WINKLE, 1967). Para sua eficiência, é necessária a ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sangüíneos, ou seja, é necessária a neovascularização da região. Além da ação direta de fatores de crescimento, a indução da angiogênese é, em parte, creditada a baixa tensão de oxigênio, característica essa, que ocorre no centro de uma ferida (KNIGHTON et al., 1981).

A sub-fase fibroblástica da cicatrização do ferimento se prolonga por vários dias (duas a quatro semanas), dependendo da ferida, e com o aumento do conteúdo de colágeno, diminuem os conteúdos das glicoproteínas e mucopolissacarídeos, bem como dos fibroblastos sintetizadores (ROSS, 1968; MADDEN, 1972; JOHNSTON, 1977; SWAIM, 1980; JOHNSTON, 1981; PEACOCK, 1984).

A sub-fase da angiogênese é a mais importante conjuntamente com a formação do tecido de granulação (ARNOLD & WEST, 1991), para suprir a demanda

de oxigênio e metabólitos (glicose, vitaminas e ácidos graxos), ou seja, a alta atividade metabólica da região faz com que a região das células atuantes no reparo necessite de vascularização.

Angiogênese ocorre quando são formados, por brotamento, novos capilares na área lesada, a partir de capilares pré-existentes no tecido não danificado (MANDELBAUN et al. 2003).

Sob estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar collagenase e ativador de plasminogênio. Essas enzimas promovem hidrólise da membrana basal, liberando as células endoteliais, o que permite a migração e proliferação, formando novos vasos que migram em direção a região da lesão. As células endoteliais migratórias formam no exterior do vaso um broto capilar que em seguida une-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sangüíneo (RUDOLPH & BALLANTYNE, 1990).

Os fibroblastos não contêm enzimas fibrinolíticas, mas migram junto dos novos capilares (ROSS, 1968; MADDEN, 1972; JOHNSTON, 1977; SWAIM, 1980; JOHNSTON, 1981; PEACOCK, 1984).

2.3.1.4. Contração

Conforme a definição de PEACOCK (1984), contração é o processo pelo qual, as dimensões de uma ferida dermoepidérmica aberta diminuem, caracterizando-se pelo movimento centrípeto de toda a espessura da pele circunjacente. A contração envolve o movimento do tecido existente na borda da ferida, e não a formação de pele nova. Em sua maioria, os animais possuem uma camada bem desenvolvida de músculo cutâneo chamada panículo carnosos, com isso, ferimentos relativamente grandes no tronco podem ficar completamente fechados pela contração, deixando uma quantidade mínima de tecido cicatricial. (MADDEN, 1972; JOHNSTON, 1977; MONTANDON et al. 1977; SWAIM, 1980; JOHNSTON, 1981).

Durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos (GABBIANI et al., 1970). MAJNO & JORIS (1996) relataram que os miofibroblastos são células intermediárias entre musculares lisas e fibroblastos. Os miofibroblastos possuem a maioria das características dos fibroblastos, mas contêm uma quantidade aumentada de filamentos de actina e miosina, que são abundantes nas células musculares lisas. Sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Quando se perde uma parte dermoepidérmica da pele, a princípio as bordas da ferida sofrem retração, aumentando a ferida. Forma-se o coágulo de fibrina sobre a ferida, pela exsudação imediata de sangue e dos líquidos teciduais. O coágulo sofre desidratação, formando-se crosta escariforme. Fibroblastos invadem a ferida, sendo seguidos por novos capilares. Os fibroblastos começam a secretar colágeno, formando-se tecido de granulação. É sobre esta base de tecido que a pele se desloca. (ROSS, 1968; MADDEN, 1972; JOHNSTON, 1977; MONTANDON et al. 1977; JOHNSTON, 1981; PEACOCK, 1984).

Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática está passando por regeneração. Lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987).

2.3.1.5. Remodelação

Essa é a última das fases, que ocorre no colágeno presente na matriz extracelular; podendo durar meses, sendo responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações no

colágeno, melhoria nos componentes das fibras colágenas e reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura (DOILLON et al. 1985).

Embora não ocorra um ganho apreciável na resistência da ferida durante os primeiros quatro a seis dias, uma ferida possui resistência efetiva até mesmo durante as primeiras 24 horas. Esta resistência é resultante da formação de coágulo de fibrina no interior da ferida. A epitelização através da ferida também contribui para sua resistência inicial, do mesmo modo que o crescimento dos novos capilares dentro da substância fundamental da ferida (JOHNSTON, 1977; SWAIM, 1980; JOHNSTON, 1981; PEACOCK, 1984).

O tecido de granulação vai sendo enriquecido com mais fibras colágenas e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz. Nesta etapa, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I (CLARK, 1993).

Depois da fase proliferativa inicial, a resistência da ferida cresce significativamente, atingindo um máximo inicial por volta de 14 a 16 dias. Este aumento na resistência da ferida ocorre durante o período de rápida fibroplasia, e acompanha paralelamente o aumento no conteúdo de colágeno na ferida (JOHNSTON, 1977; JOHNSTON, 1981; PEACOCK, 1984). O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e depende da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequenteiramente digeridas pela collagenase, ressintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes (CLARK, 1998). A neovascularização diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. Uma cicatriz normal tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana (MANDELBAUM, 2003).

Os principais fatores de crescimento envolvidos nesta fase são: $TNF\alpha$, IL_1 , PDGF, TGF β ; sendo estes produzidos pelos fibroblastos, além dos produzidos pelas células epiteliais como o EGF e TGF β (KARUKONDA et al., 2000).

2.4. Fatores de Crescimento:

Os fatores de crescimento são um conjunto de substâncias, onde a maioria é de natureza protéica e que juntamente com hormônios e neurotransmissores desempenham uma importante função na comunicação intracelular. São moléculas sinalizadoras envolvidas no processo de comunicação parácrina. De modo geral, são fatores expressos em uma célula e cujos receptores alvos estão em outra célula. Difere dos hormônios pelo fato de suas ações serem locais e não à distância.

São secretados por diversos tipos celulares para transmitir sinais que controlam a migração, diferenciação e proliferação celular, através da ligação desses fatores a receptores de superfície celular. Esses sinais são transferidos através do receptor de membrana e amplificados por fosforilação, modificando a expressão gênica (CHEN & MOONEY, 2003).

Os fatores de crescimento são conhecidos como moduladores do processo de cicatrização de feridas por diversos aspectos: são sintetizados por células estimuladas, necessárias ao reparo tecidual; são encontrados no fluído de feridas agudas e crônicas (menor concentração); a utilização de anticorpos contra os fatores de crescimento inibe a cicatrização; já a adição desses fatores acelera o processo normal de reparo (DRAYE et al., 1998).

A resposta celular aos vários fatores de crescimento exige a presença de receptores específicos na membrana plasmática das células alvo. Após a formação do complexo receptor-fator de crescimento, ocorre uma série de eventos como a ativação da proteína tirosina-quinase e fosforilação de proteínas intracelulares, e em seguida é internalizado e degradado.

A função dos fatores de crescimento não é somente de estimular a proliferação celular, mas também de manter a sobrevivência celular, estimular a migração e a diferenciação celular e também, apoptose. Atuam unindo-se a receptores celulares situados na membrana celular que transmite o sinal do exterior

para o interior da célula (FAUSTO, 1995).

Fatores de crescimento com papel importante no processo de reparação tecidual: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento v sculo endotelial (VEGF) e fator de crescimento transformador β (TGF- β) (MAURÍCIO, 2006).

2.4.1. PDGF – Família do fator de crescimento derivado de plaquetas

O PDGF foi o primeiro fator de crescimento a apresentar-se como quimiotático de células inflamatórias (neutrófilos e monócitos) e fibroblastos. Em adição, aumenta a proliferação dos fibroblastos e produção de matriz extracelular. Em último estágio, o PDGF estimula os fibroblastos a contraírem as matrizes de colágeno, induzindo ao fenótipo miofibroblasto destas células. Logo após a injúria, o PDGF é liberado em grandes quantidades a partir da degranulação plaquetária já nos primeiros estágios do processo cicatricial (ROSS et al., 1974; HELDIN et al., 2002).

2.4.2. FGF – Família do fator de crescimento de fibroblasto

A maioria dos membros da família FGF possui um amplo espectro mitogênico. Em adição aos seus efeitos mitog nicos, os FGFs regulam a migração e diferenciação de suas células alvos, apresentando também a função citoprotetora, o que aumenta a sobrevivência das células sobre condições adversas (ORNITZ & ITOH, 2001; WERNER & GROSE, 2003).

Efeitos demonstrados in vivo são sugestivos do envolvimento destes fatores de crescimento com o processo de reparo, em particular os FGF1 e FGF2 (BABIC et al., 1998). Em lesão por queimadura em ratos, foi detectada imunorreatividade na regeneração da epiderme para o FGF2 que foi acompanhada de melhor regeneração

desta, formação de tecido de granulação e renovação capilar (KIBE et al., 2000). Este fator foi demonstrado nas margens de queimaduras em humanos (GIBRAN et al., 1994).

Durante a formação do tecido de granulação, FGF2 promove a migração celular através de receptores de superfície para integrinas, os quais medeiam a ligação das células endoteliais à matriz extracelular (SEEP et al., 1994).

2.4.3. EGF – Família do fator de crescimento epidérmico

O EGF compreende uma família de mitógenos contendo diversos membros, incluindo EGF, TGF- α , fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HB-EGF), anfiregulina, epirregulina, betacelulina, neuregulina (STRACHAN et al., 2001).

Quanto às funções, o HB-EGF produz mitoses dos fibroblastos e queratinócitos, sendo fator importante na reepitelização e formação do tecido de granulação (MARIKOVSKY et al., 1996).

A primeira evidência de que o receptor de EGF influencia no reparo foi obtida por GROTH et al. (1989). A partir dele, uma série de estudos clínicos e experimentais demonstraram efeito positivo do EGF no reparo de feridas, sugerindo que este fator está envolvido na cura de feridas (GREENHALGH, 1996).

2.4.4. VEGF – Família do fator de crescimento vaso endotelial

O resultado do crescimento de novos vasos sanguíneos no tecido corresponde ao aumento do suprimento de nutrientes e maior eficiência na remoção de resíduos. Neste sentido, os fatores de crescimento vascular possuem três principais mecanismos de ação: 1) aumento da permeabilidade dos vasos à água, pequenos solutos e macromoléculas (LEVICK, 1991). 2) Reduz a distância das células teciduais em relação ao vaso sanguíneo mais próximo. 3) aumenta o fluxo sanguíneo no tecido, agindo como potentes vasodilatadores (BATES & HARPER,

2003).

O VEGF é o principal fator estimulatório específico de células endoteliais e o mais importante e regulador positivo da angiogênese e permeabilidade vascular. Devido à sua potente propriedade angiogênica e mitogênica, o VEGF participa de processos biológicos cruciais, incluindo o reparo tissular e desenvolvimento tumoral (FERRARA & KERBEL, 2005).

O VEGF também é conhecido como VPF (fator de permeabilidade vascular) devido a sua potente ação no aumento da vasopermeabilidade, o que permite o extravasamento de proteínas, como o fibrinogênio e a fibronectina, essenciais para a formação da matriz extracelular provisória (DVORAK, 1999). O VEGF age também, como um potente mitógeno para células endoteliais da microvasculatura (CONN et al., 1990) e induz a migração das células endoteliais e germinação de novos vasos sangüíneos através da regulação de diversos receptores de integrinas endoteliais (SENGER et al., 1996).

2.4.5. TGF- β – Fator de crescimento transformador- β

O TGF- β é um dos mais importantes mediadores da cicatrização devido aos seus efeitos multipotentes. Apresenta-se como importante modulador da angiogênese durante a cicatrização, por regular a proliferação celular, migração, formação do tubo capilar e deposição da matriz extracelular (ROBERTS, 1998).

Esses fatores de crescimento *in vitro* apresentam-se como estimuladores da mitose de fibroblastos e são potentes estimuladores da expressão de proteínas da matriz extracelular e de integrinas (MASSAGUÉ, 1990); participam também da diferenciação de miofibroblastos e do processo de angiogênese (DESMOULIERE et al., 1993).

Imediatamente após a ocorrência da lesão, grandes quantidades de TGF- β 1 são liberadas pelas plaquetas afim de agirem como quimioatrativos para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos (ROBERTS & SPORN, 1996).

2.5. Variáveis que podem interferir no processo cicatricial

Os fatores que podem interferir no processo cicatricial, de ordem geral são: idade, estado nutricional, existência de doença de base, como *diabetes mellitus*, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e uso de drogas sistêmicas. Os fatores locais que interferem são: a técnica cirúrgica, formação de hematomas, infecção, reação de corpo estranho, uso de drogas tópicas e ressecamento durante a cicatrização (MANDELBAUM, 2003).

Idade: é um dos aspectos sistêmicos mais importantes, como co-fator de risco tanto para a lesão como para a sua manutenção, ao gerar um impacto no funcionamento de todos os sistemas fisiológicos corporais. A idade avançada está associada a uma série de alterações nutricionais, metabólicas, vasculares e imunológicas e, muitas vezes, as doenças crônicas, que tornam o indivíduo mais suscetível ao trauma e à infecção. Alguns estudos afirmam existir maior incidência de feridas crônicas em pacientes na faixa etária acima de 60 anos (ZINK et al., 1992).

Estado nutricional: as proteínas são fundamentais para todos os aspectos da cicatrização. Desde a síntese de colágeno, proliferação epidérmica e neovascularização. A vitamina C é essencial para a hidroxilação da lisina e prolina no processo de síntese de colágeno. É também importante para a produção de fibroblastos e integridade capilar. A vitamina A, é essencial à formação e manutenção da integridade do tecido epitelial. As vitaminas do complexo B são necessárias para a efetiva ligação cruzada entre as fibras colágenas, para função

linfocitária e produção de anticorpos. Os oligoelementos como o zinco, ferro, cobre e manganês, são necessários para a formação do colágeno. A água é o mais importante nutriente, uma vez que corresponde a cerca de 55% do peso corporal e compõe todas as atividades celulares e funções fisiológicas (BORGES, 2001).

Vascularização: a oxigenação e perfusão tissular são condições essenciais para a manutenção da integridade e sucesso na reparação tissular. Indivíduos portadores de insuficiência arterial ou venosa podem desenvolver ulcerações distais que tendem a cronificação. O fumo também é um componente importante na ocorrência da hipóxia, devido à ação vasoconstrictora da nicotina (GAMBA, 2003).

Condições sistêmicas: uma das patologias mais importantes que prejudica a cicatrização é o *diabetes mellitus*, que se destaca pela redução na resposta inflamatória e gera maior risco de infecção. Além disso, a neuropatia reduz a percepção sensorial, aumentando o risco para desenvolvimento de lesões. A insuficiência renal interfere na manutenção da pressão arterial, equilíbrio hidroeletrólítico e processo de coagulação. Existem outras condições sistêmicas como doenças reumatológica, hepática, neurológica, intestinal, hematológica, que por mecanismos diretos ou indiretos, influenciam negativamente no processo de reparação tissular ou predispõe o indivíduo a riscos maiores de desenvolvimento de lesões. Alguns tratamentos sistêmicos podem comprometer o processo de reparação tissular, tais como a radioterapia, quimioterapia, esteróides e drogas antiinflamatórias.

Infecção: a simples presença de bactérias não caracteriza a infecção, que deve ser diferenciada da colonização. A presença de infecção prolonga a fase inflamatória. A infecção é o maior inimigo da cura de uma ferida. Ao determinar maior destruição de tecidos e retardar o processo de reparação, aumenta a formação de tecido cicatricial, que poderá comprometer a função, a estética ou ambos. Assim, as culturas devem estar indicadas não só quando há indícios clínicos de infecção local ou sistêmica, mas também em casos de comprometimento ósseo, e de feridas que não cicatrizam, apesar do tratamento adequado (SANTOS, 2000).

Fatores mecânicos: a pressão, fricção e cisalhamento são forças mecânicas que podem contribuir para romper a integridade tissular. Embora associadas às

úlceras por pressão, podem estar relacionadas com as demais úlceras crônicas, especialmente as vasculogênicas ou neuropáticas (BRYANT, 1992).

Presença de corpos estranhos: são massas anômalas presentes nos tecidos provenientes não só do exterior, como do próprio organismo. Como exemplo destacam-se os fragmentos de tecidos desvitalizados, materiais de sutura, acúmulo de sangue ou de linfa, entre outros. Os corpos estranhos podem ser eliminados, absorvidos ou retidos, constituindo-se sempre um fator irritante para os tecidos, favorecendo a infecção (LODOVICI, 1994).

Linhas de tensão: em 1948, RUBBIN considerou as linhas de tensão da pele como decorrentes da atividade dos músculos subjacentes e em 1951, KRAISSL as identificou como rugas naturais. Estas linhas são perpendiculares à direção da contração muscular, numa determinada região. As feridas, quando dispostas de acordo com as linhas de tensão da pele, situam-se nos pontos de maior repouso, processando-se a sua cicatrização nas melhores condições possíveis (LODOVICI, 1994).

2.6. Tipos de ferida

A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo. É daí que vem a classificação do tipo de ferida:

- Ferida de espessura parcial (derme incompleta) é aquela decorrida por dermoabrasão ou por traumatismos, onde a reparação faz-se pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio da pele adjacente não acometida, e como resultado uma cicatriz praticamente imperceptível.
- Feridas de espessura total (derme completa ou estendida ao tecido celular subcutâneo) são aquelas que necessitam da formação de um novo tecido, o tecido de granulação; nesse caso, a cicatriz é totalmente perceptível e, muitas vezes, pronunciada (MARQUEZ, 2003).

Na cicatriz fibrosa, não há reconstituições integrais, anatômicas e funcionais da parte afetada. Esta incapacidade de restaurar, de maneira integral, uma estrutura complexa, destruída a partir do que restou, serve para distinguir este processo da regeneração fetal, onde tal capacidade é plenamente manifestada. Regeneração após o nascimento, só ocorre no tecido ósseo e no fígado. Nos demais tecidos, o reparo é cicatricial (FAZZIO et al., 2000).

2.7. Biomateriais

Biomaterial é qualquer material que é idealizado para ser implantado ou incorporado ao tecido, por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido (WILLIAN, 1987).

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados no sentido de se identificar substâncias capazes de favorecer a cicatrização. Também a busca de substâncias com atividade angiogênica tem sido intensa, pelo seu grande potencial de aplicação clínica (WANG, 1998).

Materiais sintéticos ou naturais têm sido comparados ou sugeridos para uso clínico e experimental em diversas espécies. O material substitutivo para ser considerado ideal deve ser de baixo custo de produção, ser de fácil manipulação, promover o crescimento dos tecidos no hospedeiro, permitir que o tecido cicatricial tenha força semelhante ao tecido normal, ser resistente às infecções, não promover resposta inflamatória exacerbada, não formar aderências e fístulas, não ter suas características físicas alteradas pelos líquidos tissulares, ser flexível, inerte, poroso e resistente (CERISE et al., 1974).

Dentre as características, a biocompatibilidade é a mais importante, pois a biofuncionalidade do material só poderá se manifestar caso haja biocompatibilidade. Quando um material estranho entra em contato com os fluídos biológicos, respostas de proteção são desencadeadas e se manifestam como processos inflamatórios ou imunológicos, visando a eliminação do corpo estranho. Portanto, o bom desempenho de um biomaterial pós-implante está associado a um equilíbrio entre

biocompatibilidade e biofuncionalidade. (WILLIAN, 1987; SILVER & DOILLON, 1989).

Os biomateriais são classificados em: biomateriais sintéticos (cerâmicas, metais, polímeros sintéticos); biomateriais naturais (colágeno, seda, queratina, polissacarídeos e tecidos naturais); biomateriais compósitos (composto por mais de um tipo de material) (SILVER & DOILLON, 1989)

A engenharia tecidual objetiva a combinação de biomateriais, células e moléculas bioativas para facilitar a recuperação de tecidos doentes ou lesionados (CHEN & MOONEY, 2003).

O desenvolvimento de novos biomateriais direcionados à engenharia tecidual vem aumentando com o intuito de substituir órgãos, devido ao maior conhecimento da regeneração tecidual (CAI et al., 2005).

2.7.1. Ácido hialurônico

O ácido hialurônico foi descoberto no humor vítreo de bovinos. Existe *in vivo* na forma poliônica (hialuronato de sódio) e não em sua forma protonada (BROW & JONES, 2005). É o maior polímero dos tecidos conjuntivos, encontrado em alta concentração no fluído sinovial de junções, fluído vítreo do olho, cartilagem, cordão umbilical e crista das aves (SEGURA et al., 2005).

O ácido hialurônico é encontrado em quantidades variadas em todos os tecidos de animais adultos; é o mais simples glicosaminoglicano, sendo o único não sulfatado presente na matriz extracelular de vertebrados (PEATTIE et al., 2004). É especialmente prevalente durante a cicatrização de feridas e no fluído sinovial das articulações (DRURY & MOONEY, 2003). Tem a capacidade de se interagir com outras macromoléculas e participar na regulação das células (migração, diferenciação e adesão) durante processos morfogénéticos e patológicos (HUANG et al., 2003).

O produto produzido comercialmente é isolado tanto de materiais ou de estruturas de origem animal (fluído sinovial, cordão umbilical, pele, crista de galo)

quanto de fermentação de bactérias gran negativas (BROW & JONES, 2005).

O ácido hialurônico está presente em vários tecidos conectivos de animais, preenchendo os espaços intercelulares, tais como a pele e a cartilagem com importante função de flexibilidade e manutenção da estrutura dos tecidos (KIM et al., 1996). Têm-se utilizado o ácido hialurônico na oftalmologia, cirurgias ortopédicas e aplicações dérmicas, com função de preenchimento de tecidos moles e cicatrização de feridas (ROSIER & O'KEEF, 2000).

2.7.2. Colágeno + alginato (Fibracol plus®)

O fibracol plus® é um biomaterial composto de 90% de colágeno e 10% de alginato.

Os organismos animais pluricelulares são abundantemente constituídos de colágeno, uma proteína cuja principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta resistência elástica (VIIDIK & VUUST, 1980).

Além de seu papel estrutural nos tecidos, o colágeno apresenta também a função de orientar os tecidos em desenvolvimento, fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial (LEE et al., 2001).

Dentre os vários tipos de colágeno existentes, o colágeno tipo I, o mais abundante, tem como unidade básica o tropocolágeno, uma macromolécula linear, semi flexível com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, formada por três cadeias polipeptídicas denominadas de cadeias α , duas iguais (α_1) e uma diferenciada (α_2). A estrutura primária destas unidades é caracterizada pela repetição do triplete Glicina (Gly), com conteúdo de 33%; Prolina (Pro) 12% e Hidroxiprolina (Hypro) 11%. No conjunto, sua estrutura é helicoidal na forma de uma tripla hélice estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (NIMNI, 1998)

Até a década de 1980 a utilização do colágeno como biomaterial era restrita à produção de fios cirúrgicos principalmente devido à dificuldade de sua obtenção. A partir de então, a introdução de novos processos de obtenção de colágeno

associadas a novas potencialidades de aplicação tanto na medicina quanto na odontologia, aumentaram significativamente o uso desta proteína como biomaterial nas formas de membranas, tubos, esponjas, soluções injetáveis, entre outras (FRIES, 1998). Essas aplicações do colágeno devem-se principalmente a algumas de suas propriedades importantes no desenvolvimento de biomateriais como baixa resposta imunológica, baixo índice de alergenidade, biodegradabilidade, habilidade em promover crescimento celular e propriedades hemostáticas (GOISSIS et al., 1999).

O colágeno presente na pele é principalmente o tipo I, sintetizado por fibroblasto e miofibroblasto. O tipo I está presente na derme, fáscia e tendão e é o maior componente do tecido cicatricial (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

As boas fontes de colágeno tipo I e tipo III são obtidas da pele ou do tendão bovino. As fibras colágenas são separadas de outros componentes, como proteínas, células do sangue, células epidérmicas ou endoteliais da pele, dos vasos sanguíneos e do tecido nervoso animal. Essa forma de extração diminui a antigenidade do colágeno (BAYLEY, 2000).

Pesquisas mostram que a associação de alginato aos compostos de colágeno pode produzir um gel que promove meio úmido e lenta dispersão do colágeno nos tecidos lesionados. Esse sinergismo induz quimiotaxia para granulócitos, macrófagos e fibroblastos, autólise, angiogênese e proliferação celular (GOKOO et al., 1996).

As fibras de colágeno fornecem suporte para migração, fixação e crescimento celulares, principalmente de fibroblastos, dessa forma favorece reparação tecidual (POSTLEWAITE et al., 1978).

Alguns estudos fundamentam a utilização de matrizes de colágeno e alginato no tratamento tópico de úlceras venosas, visando acelerar a granulação e epitelização (DONAGHUE et al., 1998; BROWN-ETRIS et al., 1997); e também apontam para o elemento chave na prevenção de recorrência da úlcera, já que o colágeno pode aumentar a resistência à tensão na cicatriz (PETKOV, 1995).

Os alginatos são polissacarídeos derivados do ácido algínico, que por sua vez é obtido principalmente, de algas marinhas da espécie *Laminaria*. São utilizados há algumas décadas devido suas propriedades hemostáticas. O sódio do exsudato e o

cálcio do alginato sofrem troca iônica formando um gel solúvel de alginato de sódio. Esse gel não é aderente à ferida. A geração de íon livre de cálcio amplifica a cascata de coagulação conferindo propriedade hemostática (EAGLSTEIN, 2001).

É indicado para feridas exsudativas, uma vez que o exsudato é necessário para transformar o alginato em gel e também indicado para tratamento de queimadura e úlceras (BORGES et al., 2001).

2.7.3. Látex Natural

O látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) há muito tempo é utilizado para fins industriais e, a partir de 1996, começaram as divulgações de resultados concernentes à sua aplicação como biomaterial. A biomembrana de látex da seringueira, com finalidade terapêutica foi desenvolvida por COUTINHO – NETTO no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e, no ano de 1996, foi reportado o primeiro resultado de sua utilização experimental como substituto do esôfago cervical de cães. Nesse estudo, foi observado um acentuado aumento na vascularização (neoangiogênese), epitelização e neoformação da submucosa esofágica (MRUÉ, 1996). A biocompatibilidade da biomembrana de látex foi evidenciada mediante implantes *in vivo* em cães (LACHAT et al., 1997; MRUÉ, 2004).

As propriedades indutoras de regeneração tecidual de biomembrana de látex natural estimularam a sua utilização como substituto parcial do pericárdio em cães (SADER et al., 2000). Em trabalhos experimentais os autores observaram que nos grupos nos quais este material foi utilizado, a ocorrência de aderências aos tecidos adjacentes foi menor que no grupo controle, onde ocorreu regeneração completa do pericárdio subjacente à membrana de látex natural, com características semelhantes às do pericárdio original.

MRUÉ (2000) ao reconstruir parcialmente o esôfago cervical de cães com retalhos de látex com polilisina a 0,1% relatou a neoformação epitelial semelhante ao

epitélio esofágico nativo bem como neoformação muscular, porém com fibras em quantidades inferiores e menores.

Ao látex natural também é atribuída a propriedade de indução da neovascularização. Existem evidências que sugerem a presença de fatores de crescimento no látex que aumentariam a vascularização local e a reepitelização de feridas, conforme relataram FRADE et al., (2001), baseados nos resultados obtidos após o tratamento de úlceras cutâneas flebopáticas crônicas no homem.

AZOR (2004) promoveu tratamento experimental de peritoneostomia em coelhos, com membranas de látex polimerizadas a 60°C e a 100°C, relatando a ajustabilidade do implante à parede abdominal, a eliminação do implante entre o 12° e o 14° dia e a neoformação tecidual na área recoberta, sendo que os melhores resultados advieram do uso das membranas polimerizadas a 60°C. RABELO et al., (2005), procedendo ao tratamento de hérnias umbilicais recidivantes em cinco bovinos com implante de compósito de látex natural com polilisina 0,1% e malha de polipropileno, observaram que a única relevância no pós-operatório foi edema local, e que as membranas permaneciam em seus sítios, sem evidências de deiscências em nenhum animal no 18° dia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do látex natural

O látex natural foi obtido de clones da *Hevea brasiliensis*, especificamente RRhim 600 e GT-1, através de incisões no caule da árvore, por meio da técnica conhecida como sangria e coletado e armazenado em recipientes adequados.

Logo que extraído, o látex apresenta aspecto leitoso e rapidamente coagula. O látex natural extraído da *H. brasiliensis*, utilizado no presente experimento, recebeu 1,7% de hidróxido de amônio (concentração final) a fim de evitar a coagulação, sendo caracterizado posteriormente como látex amoniacoal (material cedido pela empresa Agrolátex, Mirassol, SP).

3.2. Obtenção do soro de látex

Para obtenção do soro, 500 ml de látex natural amoniacoal foram diluídos em ácido acético 2,2% (1:2, v/v). Procedida a diluição, a solução foi homogeneizada suavemente e armazenada à temperatura ambiente, em repouso até a coagulação. Após este período, um líquido amarelo-transparente denominado “soro de látex”, foi obtido pela forte compressão e compactação da borracha polimerizada.

3.3. Cromatografia clássica em DEAE-celulose para obtenção da fração angiogênica FrHb1

Na primeira etapa de purificação utilizou-se uma coluna de vidro (50cm x 5,0cm) preenchida com a fase estacionária DEAE-celulose, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M (pH = 9,0).

O soro obtido como descrito no item 3.2., foi diluído em água destilada (1:1 v/v) e seu pH foi elevado para 9,0 com NaOH 5,0 M e imediatamente foi aplicado à coluna cromatográfica. O eluente foi coletado em um becker durante o tempo em que a amostra era aplicada à coluna. Ao final da aplicação de toda a amostra na coluna, foi realizada a emulsão com o tampão bicarbonato de amônio 0,01M pH = 9,0. A partir deste momento, o eluente passou a ser coletado em tubos de ensaio. Após a eluição de 1000ml do tampão de equilíbrio (bicarbonato de amônio 0,01 M pH = 9,0), houve a substituição gradativa por fases de gradiente descontínuo e crescente de NaCl (0,15 M; 0,25M e 1,5M). Todos os procedimentos cromatográficos foram realizados à temperatura ambiente.

O fluxo empregado foi de 7 mL/min, e o eluente monitorado a 280 nm, em espectrofotômetro Hitachi U-2000. As frações coletadas (30mL/tubo), com auxílio de um coletor Gilson, foram reunidas em 3 “pools” cromatográficos denominados FrHb1, FrHb2 e FrHb3, submetidos à diálise contra a água destilada e liofilização e, em seguida, armazenadas a – 20 °C.

Estes procedimentos foram realizados no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.4. Preparo do gel de ácido hialurônico associado à fração FrHb1

A fração FrHb1, liofilizada, obtida em cromatografia de DEAE-celulose, foi inicialmente pesada e dissolvida (na mínima quantidade que permitia dissolver essa fração) em água destilada. Em seguida, esta solução foi incorporada ao ácido

hialurônico (na forma de gel a 1% - Nikkol®⁴) dentro de tubos Falcon estéreis de modo que as concentrações fossem 0,01% ou 0,001%. Os tubos foram colocados no agitador Vortex mecânico, por 30 minutos. Após o preparo dos géis, estes foram armazenados a 4°C até a utilização, em período inferior a 24 horas.

3.5. Preparo das membranas de fibracol plus®⁵ associadas à fração FrHb1

A fração FrHb1 foi isolada, pesada e dissolvida em água destilada, de modo que a concentração final da solução ficasse em 0,01% ou 0,001%. Os discos de fibracol plus® (membranas) foram obtidos uniformemente através do corte do fibracol plus por meio de um “punch” de 6mm. As soluções de diferentes concentrações foram colocadas em ependorfs estéreis, em seguida, colocou-se os discos dentro das soluções. Em um ependorf estéril, foi colocada somente solução salina estéril onde foram adicionados os discos com as membranas de fibracol plus®. Após o preparo dos discos, estes foram armazenadas à 4°C por 24 horas. O preparo tanto das membranas como do gel, foi realizado no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.6. Preparo das feridas dérmicas experimentais

⁴ Nikko Chemicals Co. Ltda. Japan

⁵ Marca registrada da Johnson & Johnson Medical Ltda.



Figura 1. Fotomacrografia da orelha de coelho com quatro feridas de 6 mm de diâmetro cada, nas quais, foram aplicados os tratamentos. Modelo adaptado de MUSTOE et al., 1991.

3.7. Delineamento experimental

No experimento foram utilizados 36 coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia Branco, pesando entre 2,0 e 2,5 kg, mantidos em gaiolas individuais, dotadas de comedouros fixos e bebedouros automáticos, com água e alimentação “*ad libitum*”, onde os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- T1 : Solução fisiológica a 0,9%
- T2 : Fibracol plus® + FrHb1 a 0,01%
- T3 : Fibracol plus®
- T4 : Fibracol plus® + FrHb1 a 0,001%
- T5 : Ácido Hialurônico a 1% + FrHb1 a 0,01%
- T6 : Ácido Hialurônico a 1% + FrHb1 a 0,001%

Os animais foram previamente anestesiados por via intramuscular com quetamina⁶ (60 mg/kg) e xilazina⁷ (5 mg/kg). A região dorsal das orelhas foi

⁶ Cloridrato de Cetamina 10% - Syntec. Hortolândia-São Paulo-Brasil

tricotomizada e a anti-sepsia realizada com solução de iodo a 10%. Foram feitas quatro feridas ao redor do centro, a 3,0 cm da extremidade, em cada orelha de cada animal. Foi removido o pericôndrio, expondo assim a cartilagem elástica, utilizando um “punch” de biópsia de 6 mm de diâmetro, em seguida utilizado os tratamentos (Figura 1).

O experimento foi dividido em 4 etapas de acordo com a análise do tempo de pós-operatório: 3º, 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório; sendo utilizados 9 animais para cada período de observação experimental (Tabela 1).

Na primeira etapa (3º dia de pós-operatório), os animais foram numerados aleatoriamente de 1 a 9, sendo que em 3 animais, nas orelhas esquerdas, as feridas foram tratadas com solução fisiológica 0,9%⁸ (T1); nas orelhas direitas as feridas foram tratadas com a membrana de fibracol plus® + FrHb1 a 0,01% (T2). Em outros 3 animais, foram realizados os mesmos procedimentos, diferenciando os tratamentos, onde nas feridas das orelhas esquerdas o tratamento foi com fibracol plus® (T3) e nas feridas das orelhas direitas fibracol plus® + FrHb1 a 0,001% (T4). Nos 3 animais restantes, seguiu-se o mesmo procedimento, colocando nas feridas das orelhas esquerdas gel de ácido hialurônico + FrHb1 a 0,01% (T5) e nas feridas das orelhas direitas gel de ácido hialurônico + FrHb1 a 0,001% (T6) (Figura 2). As orelhas dos animais foram cobertas por um filme de polyuretano (Tegaderm®⁹, 3M) para prevenir que as membranas se soltassem. Foi utilizado nos dois primeiros dias, colar elisabetano para prevenir que os animais arrancassem os tratamentos. Os animais foram eutanasiados com tiopental sódico¹⁰ (200mg/kg IV) no 3º dia de pós-operatório, separando segmentos de tecidos contendo as feridas de cada orelha para análise histológica. Cada segmento de tecido, contendo cada ferida, foi colocado individualmente em líquido de Bouin por 24 horas para, em seguida, ser processada para a histologia.

Na segunda etapa (7º dia de pós-operatório), os animais foram numerados de 10 a 18. Os procedimentos foram iguais aos da primeira etapa, porém o filme de

⁷ Cloridrato de Xilazina 2%- Syntec. Hortolândia-São Paulo-Brasil

⁸ Solução fisiológica 0,9% - Halex Istar. Goiânia – GO – Brasil.

⁹ Marca registrada da 3M do Brasil

¹⁰ Tionembutal. Abbott Labs. Do Brasil Ltda. São Paulo-SP

polyuretano (Tegaderm[®]) foi retirado no 3º dia de pós-operatório. Os animais foram eutanasiados no 7º dia de pós-operatório.

Na terceira etapa (14º dia de pós-operatório), os animais foram numerados de 19 a 27, realizando os mesmos procedimentos da segunda etapa, eutanasiando-os no 14º dia de pós-operatório.

Na quarta etapa (21º de pós-operatório), os animais foram numerados de 28 a 36 realizando os mesmos procedimentos da terceira etapa, eutanasiando-os no 21º dia de pós-operatório.

Foi obtido um total de 288 feridas, tendo sido fixadas em líquido de Bouin por 24 horas, ato contínuo, colocadas em álcool 70º para análise histológica.

Tabela 1. Esquema demonstrativo da utilização dos tratamentos nas feridas no período de observação experimental de 3 dias. Este esquema é repetido para os períodos 7º, 14º e 21º dias.

Coelhos	Orelhas	Nº de Feridas	Tratamentos
Coelho 1	Esquerda	4	T1
	Direita	4	T2
Coelho 2	Esquerda	4	T1
	Direita	4	T2
Coelho 3	Esquerda	4	T1
	Direita	4	T2
Coelho 4	Esquerda	4	T3
	Direita	4	T4
Coelho 5	Esquerda	4	T3
	Direita	4	T4
Coelho 6	Esquerda	4	T3
	Direita	4	T4
Coelho 7	Esquerda	4	T5
	Direita	4	T6

[®] Tegaderm – produto 3M do Brasil

Coelho 8	Esquerda	4	T5
	Direita	4	T6
Coelho 9	Esquerda	4	T5
	Direita	4	T6

3.8. Considerações Éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da FCAV, Campus de Jaboticabal, UNESP, sob protocolo nº 014996-07, pois estava de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.9. Protocolos de avaliação

3.9.1. Avaliação clínica

As avaliações clínicas das feridas foram feitas em seqüência à eutanásia dos animais. Foram avaliados os parâmetros: coloração, tamanho das bordas, presença de edema e presença de secreção. Os parâmetros de comparação, uma vez identificados, foram quali-quantificados segundo os critérios em que (-) correspondeu à ausência de quaisquer dos eventos, (+) manifestação discreta dos mesmos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

3.9.2. Avaliação Histológica e Morfométrica

Após a avaliação clínica das feridas dos animais, cada segmento de tecido com a ferida, de cada orelha correspondente a cada dia experimental (3,7,14 e 21) foi seccionada e fixada em solução de Bouin por 24 horas e processada, rotineiramente, para a inclusão em paraplast. Após a microtomia semi-seriada a intervalos de 15µm, os cortes histológicos, com espessura de 5µm, foram corados pela técnica da Hematoxilina-eosina e Tricrômio de Masson, para realização das análises histológica e morfométrica no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV, Campus de Jaboticabal, UNESP.

As áreas de reepitelização e do tecido de granulação foram analisadas em microscópio de luz com aumento de 200x. Para determinados parâmetros como: presença de leucócitos, de hemácias, de fibroblastos e neovascularização; e organização das fibras colágenas e da rede de fibrina, utilizou-se o critério quali-quantitativo onde (-) correspondeu à ausência de quaisquer dos eventos, (+) manifestação discreta dos eventos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

A morfometria foi realizada com o microscópio óptico adaptado a um sistema computadorizado de análise de imagens IMAGE PRÓ-PLUS¹¹, onde foi fotografado um campo por lâmina aleatoriamente, com área de 2.342.016 µm². Posteriormente, foram identificadas e quantificadas as principais células do tecido conjuntivo

¹¹ IMAGE PRÓ-PLUS – Cybernetics – CA-USA

envolvidas no processo cicatricial, especialmente fibroblastos e leucócitos.

3.9.3. Análise estatística

A distribuição dos dados apresentou-se normal e homogênea. Com o auxílio do programa estatístico “SAS” – *Statistical Analysis of Systems*, foi realizada a análise estatística paramétrica com utilização da Análise de Variância e teste de Tukey a 5% (ZAR, 1999).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação clínica das feridas submetidas aos tratamentos

Ao exame macroscópico, no 3º dia de pós-operatório, observou-se nas feridas dos animais do tratamento controle (solução fisiológica - T1) coloração avermelhada, aumento das bordas (+), presença de edema (+) e presença de secreção serosanguinolenta (+). Nas feridas dos animais tratados com a membrana (fibracol plus®) associada a FrHb1, T2-T3-T4, verificou-se coloração amarelada, aumento das bordas (++), presença de edema (++) e presença de secreção mucopurulenta (+). Nas feridas dos animais tratados com ácido hialurônico associado a FrHb1 (T5 e T6), notou-se coloração rosada, aumento das bordas (+), presença de edema (+), presença de secreção serosanguinolenta (+) (Figura 2 e Tabela 2).

No 7º dia de pós-operatório, as feridas dos animais tratados com solução fisiológica (T1) apresentavam-se com coloração vermelho-escuro, aumento das bordas (+), presença de edema (+), presença de secreção serosanguinolenta (+) com dimensões menores que as do 3º dia de pós-operatório. Nas feridas dos animais de tratamento T2, T3 e T4, notou-se coloração vermelho-escuro, aumento das bordas (++), presença de edema (++) e presença de secreção serosanguinolenta (+) e com dimensões menores que no 3º dia de pós-operatório. As feridas dos animais dos tratamentos T5 e T6, mostraram-se de coloração rósea, aumento de borda (+), presença de edema (+), presença de secreção serosa (+) e dimensões menores que as do 3º dia de pós-operatório (Figura 3 e Tabela 2).

No 14º dia de pós-operatório, as feridas dos animais tratados com solução fisiológica (T1) demonstravam-se reepitelizadas por completo, com ausência de edema (-), ausência de secreção (-), não havendo quase nenhum sinal de lesão cicatricial. Nos animais tratados com membrana (T2, T3 e T4), notou-se ausência de edema (-) e secreção (-), com presença de pequenos pontos cicatriciais em algumas feridas. Nos animais dos tratamentos T5 e T6, as feridas revelavam-se reepitelizadas

por completo, com ausência de edema (-) e secreção (-), similares as do T1 (Figura 4 e Tabela 2).

No 21º dia de pós-operatório, em todas as feridas de todos os tratamentos, já havia ocorrido a reepitelização, havendo pequenos sinais (cicatrices) nas feridas dos tratamentos T1, T2, T3 e T4. Nos animais dos tratamentos T5 e T6, era difícil a observação de cicatrizes das feridas (Figura 5 e Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação macroscópica semi-quantitativa das feridas nas orelhas de

coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco, submetidos à diferentes tratamentos nos diferentes dias.

Período de tempo	Tratamento	Coloração	Borda	Edema	Secreção	Dimensão em relação ao 1º dia
3 dias	T1	Avermelhada	+	+	Serosanguinolenta	Menor
	T2	Amarelada	++	++	Mucopurulenta	Menor
	T3	Amarelada	++	++	Mucopurulenta	Menor
	T4	Amarelada	++	++	Mucopurulenta	Menor
	T5	Rosada	+	+	Serosanguinolenta	Menor
	T6	Rosada	+	+	Serosanguinolenta	Menor
7 dias	T1	Vermelho	+	+	Serosanguinolenta	Menor
	T2	Vermelho	++	++	Serosanguinolenta	Menor
	T3	Vermelho	++	++	Serosanguinolenta	Menor
	T4	Vermelho	++	++	Serosanguinolenta	Menor
	T5	Rósea	+	+	Serosa	Menor
	T6	Rósea	+	+	Serosa	Menor
14 dias	T1	-	-	-	-	Completa reepitelização
	T2	-	-	-	-	
	T3	-	-	-	-	
	T4	-	-	-	-	
	T5	-	-	-	-	
	T6	-	-	-	-	
21 dias	T1	-	-	-	-	Completa reepitelização
	T2	-	-	-	-	
	T3	-	-	-	-	
	T4	-	-	-	-	
	T5	-	-	-	-	
	T6	-	-	-	-	

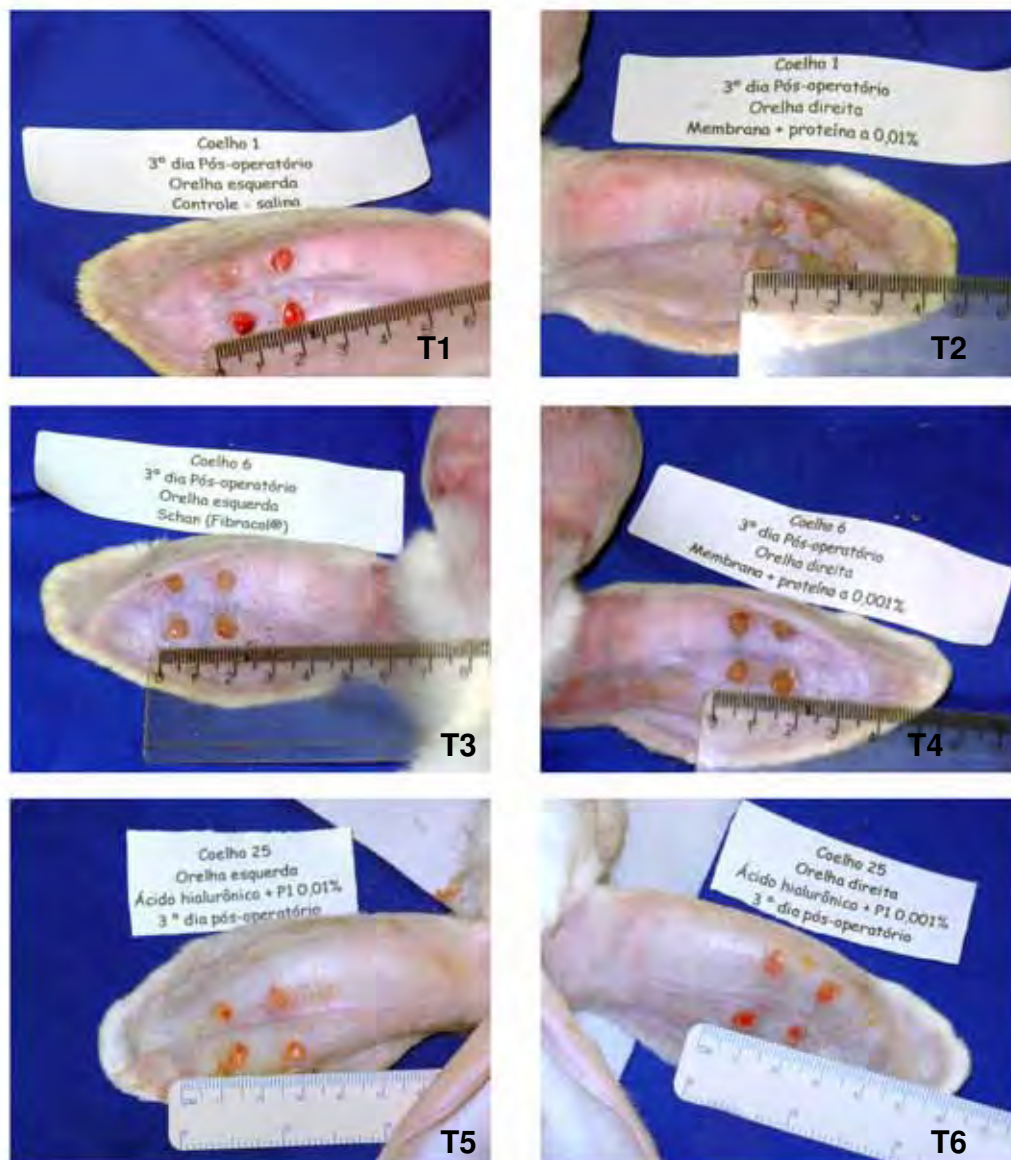


Figura 2. Fotomacrografias evidenciando as feridas dérmicas no 3º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e

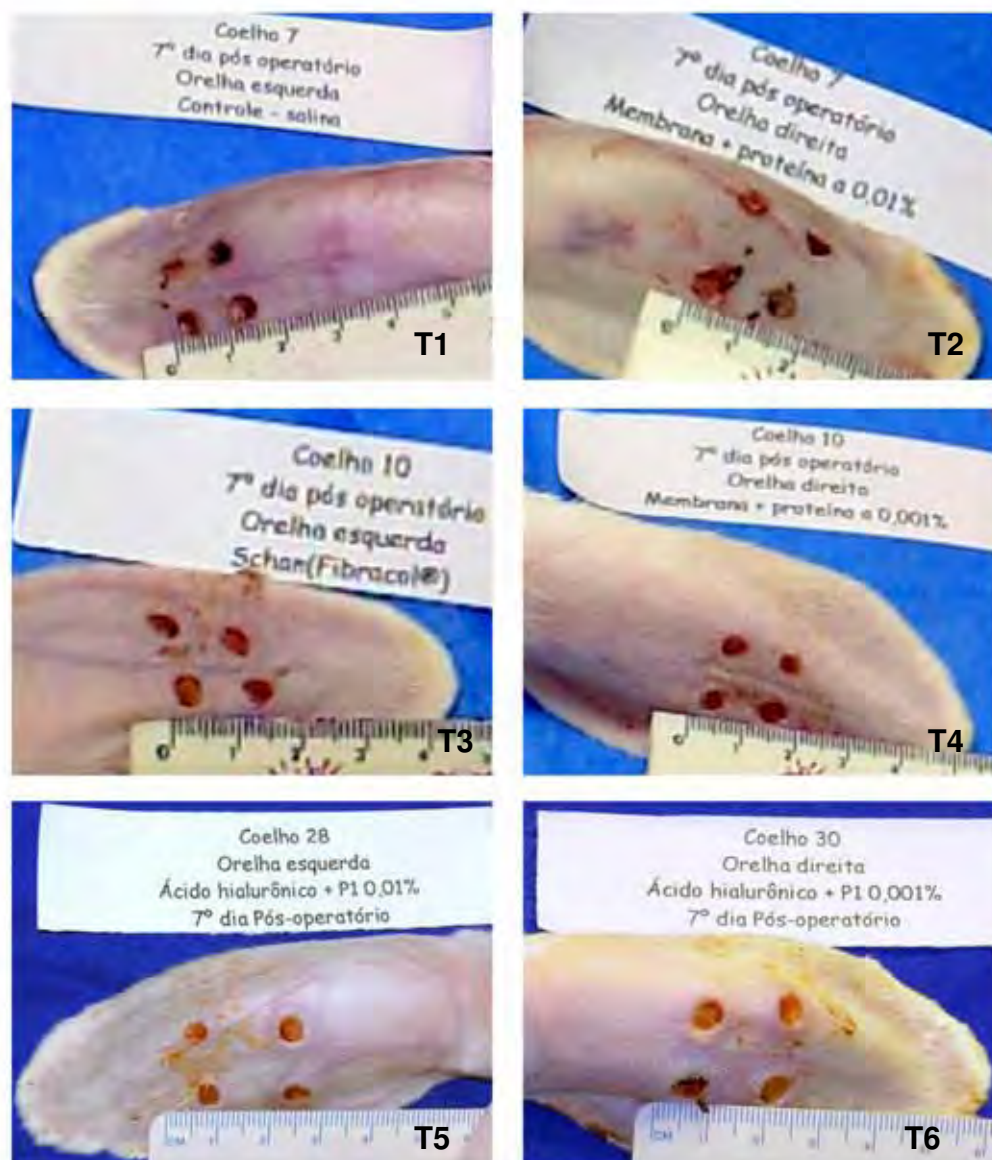


Figura 3. Fotomacrografias evidenciando as feridas dérmicas no 7º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6.

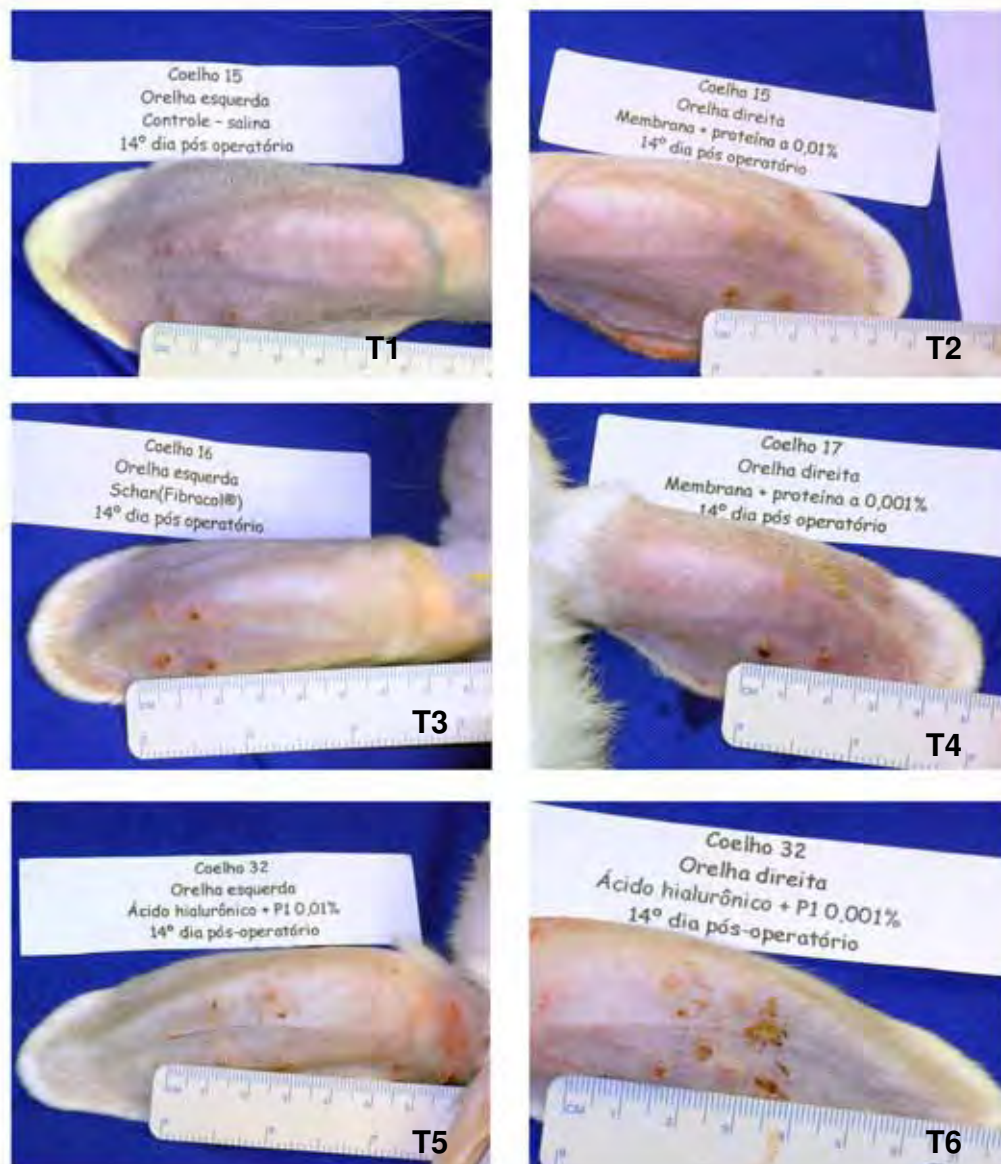


Figura 4. Fotomacrografias evidenciando as feridas dérmicas no 14º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4,

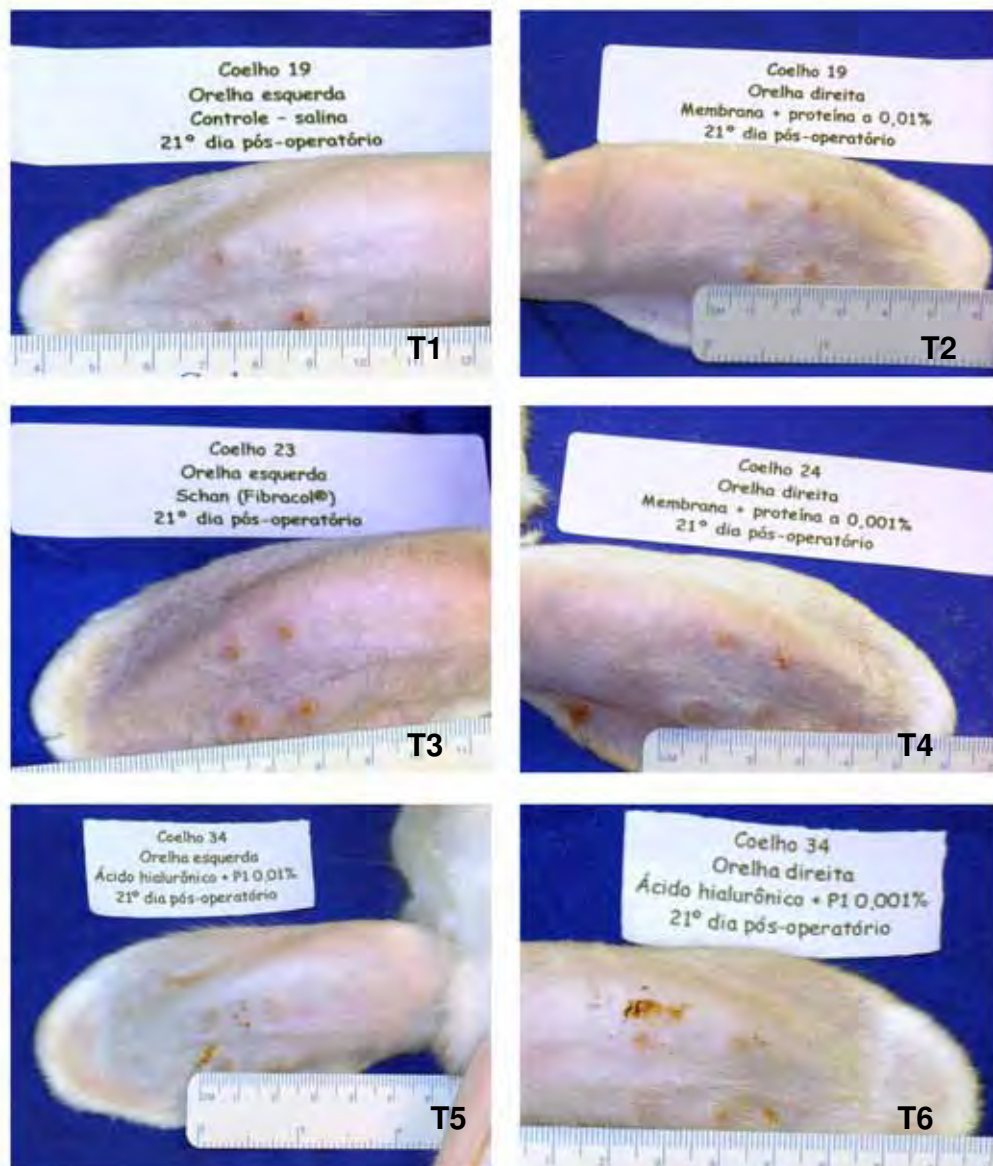


Figura 5. Fotomacrografias evidenciando as feridas dérmicas no 21º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4,

4.2. Análise histológica das feridas dérmicas

4.2.1. Avaliação histológica semi-quantitativa

As feridas dérmicas foram analisadas, avaliando-se inflamação, proliferação, formação do tecido de granulação e reepitelização, submetidas a diferentes tratamentos. Foram realizadas comparações entre os tratamentos com o grupo controle. Os cortes histológicos foram analisados no 3º, 7º, 14º e 21º dia experimental. No 3º e 7º dia não houve reepitelização completa por toda extensão das feridas dos grupos experimentais nem do controle, ao passo que no 14º e 21º dia, todas as feridas encontravam-se completamente reepitelizadas. No 3º e 7º dia foram observadas diferenças na velocidade da cicatrização para as feridas tratadas e o controle. No 14º e 21º dia foram evidenciadas maiores diferenças com relação às células inflamatórias, organização das fibras colágenas e angiogênese.

Nas Figuras 6 a 9, estão ilustradas as imagens capturadas das feridas com o auxílio do microscópio com aumento de 200x, conectado a um sistema de captura de imagens digital.

Na Figura 6 e Tabela 3 estão representadas as fotomicrografias e as análises semi-quantitativas das feridas com todos os tratamentos e o controle, após três dias da execução do experimento.

Verificou-se nas feridas controle (T1) discreta presença de leucócitos, de hemácias e de neovascularização (+); moderada presença de fibroblastos (++) e discreta organização das fibras colágenas (+) e da rede de fibrina (+).

As feridas dos animais tratados com ácido hialurônico + FrHb1 a 0,01% (T5) mostraram discreta presença de leucócitos, de hemácias e de neovascularização (+), intensa presença de fibroblastos (+++), moderada organização das fibras colágenas e da rede de fibrina (++)

As feridas dos animais tratados com ácido hialurônico + FrHb1 a 0,001% (T6) manifestaram-se semelhantes às feridas tratadas com ácido hialurônico + FrHb1 a 0,01%. Evidenciaram discreta presença de leucócitos, de hemácias e de neovascularização (+), intensa presença de fibroblastos (+++), moderada

organização das fibras colágenas (++) e discreta organização da rede de fibrina (+).

Nos animais tratados com fibracol plus® + FrHb1 a 0,01% (T2) as feridas demonstraram moderada quantidade de leucócitos e de hemácias (++) , discreta presença de fibroblastos e de vasos sanguíneos (+) e discreta organização das fibras colágenas e da rede de fibrina (+).

Nos animais tratados com fibracol plus® + FrHb1 a 0,001% (T4), as feridas revelaram características semelhantes às do grupo (T2), com moderada quantidade de leucócitos e de hemácias (++) , discreta presença de fibroblastos e de vasos sanguíneos (+) e discreta organização das fibras colágenas e da rede de fibrina (+).

O grupo de animais que teve características mais desfavoráveis à cicatrização foi o que utilizou somente o tratamento com fibracol plus®, onde constatou-se intensa presença de leucócitos (+++), moderada presença de hemácias (++) , discreta presença de fibroblastos, vasos sanguíneos, fibras colágenas e rede de fibrina (+).

Na Figura 7 e Tabela 3, estão representadas fotomicrografias e as análises semi-quantitativas das feridas com todos os tratamentos e o controle, após 7 dias da execução do experimento.

Observou-se nas feridas do grupo controle (T1) moderada quantidade de leucócitos, fibroblastos, organização das fibras colágenas e da rede de fibrina (++) ; discreta presença de hemácias e neovascularização (+).

Nas feridas dos animais tratados com ácido hialurônico + FrHb1 a 0,01% (T5) notou-se o epitélio quase que totalmente refeito. Verificou-se nas feridas deste tratamento que o espaço ulcerado estava bastante preenchido por fibras colágenas com grande presença de vasos neoformados em seu interior. As feridas dos animais tratados com ácido hialurônico + FrHb1 a 0,01% (T5) mostraram discreta presença de leucócitos e de hemácias (+), intensa presença de fibroblastos e fibras colágenas (+++) e moderada neovascularização e organização da rede de fibrina (++) .

As feridas dos animais tratados com ácido hialurônico + FrHb1 a 0,001% (T6) apresentaram-se semelhantes às feridas do grupo T5, com discreta presença de leucócitos e de hemácias (+), intensa presença de fibroblastos e fibras colágenas (+++) e moderada neovascularização e organização da rede de fibrina (++) .

Nos animais tratados com fibracol plus® + FrHb1 a 0,01% (T2) as feridas

evidenciaram moderada quantidade de leucócitos, fibras colágenas, rede de fibrina e fibroblastos (++) e discreta vascularização e hemácias (+).

Nos animais tratados com fibracol plus® (T3) e fibracol plus® + FrHb1 a 0,001% (T4), as feridas revelaram-se semelhantes ao grupo do fibracol plus® + FrHb1 a 0,01% (T2), com moderada quantidade de leucócitos, fibras colágenas, rede de fibrina e fibroblastos (++), discreta presença de hemácias e neovascularização (+).

Na figura 8 e Tabela 3 estão representadas imagens e as análises semi-quantitativas das feridas com todos os tratamentos e o controle, após 14 dias da execução do experimento.

Observou-se nas feridas dos grupos controle (T1), ácido hialurônico + FrHb1 a 0,01% (T5) e ácido hialurônico + FrHb1 a 0,001% (T6), o epitélio totalmente refeito, cobrindo toda a região ulcerada com aspecto muito similar ao tecido íntegro, com ausência de hemácias (-), discreta quantidade de fibrina, leucócitos e fibroblastos (+) e moderada presença de fibras colágenas e neovascularização (++). Notou-se a presença de fibrócitos, de papilas e alguns folículos pilosos.

Nos animais tratados com fibracol plus® + FrHb1 a 0,01% (T2), fibracol plus® (T3) e fibracol plus® + FrHb1 a 0,001% (T4) as feridas revelaram epitélio totalmente reconstruído, com moderada quantidade de leucócitos e fibras colágenas (++), discreta presença de fibrina, fibroblastos, neovascularização (+) e ausência de hemácias (-). Verificou-se a presença de folículos pilosos, fibrócitos e glândulas sebáceas.

Na figura 9 e Tabela 3 estão representadas imagens e as análises semi-quantitativas das feridas com todos os tratamentos e o controle, após 21 dias da execução do experimento.

Pode-se notar que a pele em todos os grupos apresentou cicatrização total, apresentando todos os seus estratos e anexos, não havendo hemácias e fibrina (-), discreta quantidade de leucócitos e fibroblastos (+), moderada presença de neovascularização (++) e intensa produção de fibras colágenas (+++).

Tabela 3. Avaliação histológica semi-quantitativa dos segmentos de tecidos das orelhas de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco, submetidos à

diferentes tratamentos nos diferentes dias.

Período de tempo	Tratamento	Leucócitos	Hemácias	Neovascularização	Fibroblastos	Fibras colágenas	Fibrin
3 dias	T1	+	+	+	++	+	+
	T2	++	++	+	+	+	+
	T3	+++	++	+	+	+	+
	T4	++	++	+	+	+	+
	T5	+	+	+	+++	++	++
	T6	+	+	+	+++	++	++
7 dias	T1	++	+	+	++	++	++
	T2	++	+	+	++	++	++
	T3	++	+	+	++	++	++
	T4	++	+	+	++	++	++
	T5	+	+	++	+++	+++	++
	T6	+	+	++	+++	+++	++
14 dias	T1	+	-	++	+	++	+
	T2	++	-	+	+	++	+
	T3	++	-	+	+	++	+
	T4	++	-	+	+	++	+
	T5	+	-	++	+	++	+
	T6	+	-	++	+	++	+
21 dias	T1	+	-	++	+	+++	-
	T2	+	-	++	+	+++	-
	T3	+	-	++	+	+++	-
	T4	+	-	++	+	+++	-
	T5	+	-	++	+	+++	-
	T6	+	-	++	+	+++	-

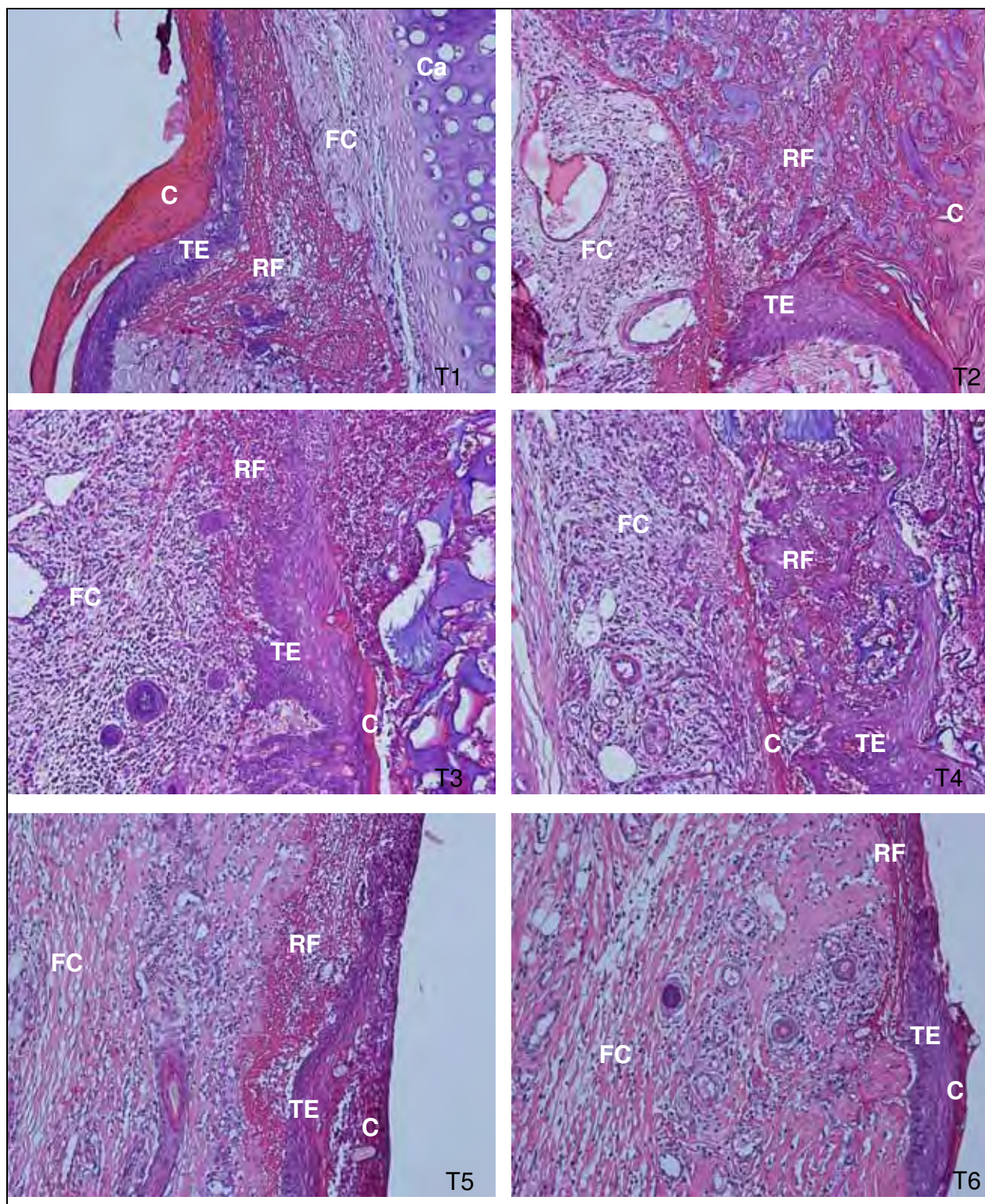


Figura 6. Fotomicrografias das feridas dérmicas de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco no 3º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6, evidenciando-se: (C) crosta,

(TE) tecido epitelial, (RF) rede de fibrina, (FC) fibras colágenas e (Ca) cartilagem elástica. H.E. 200x.

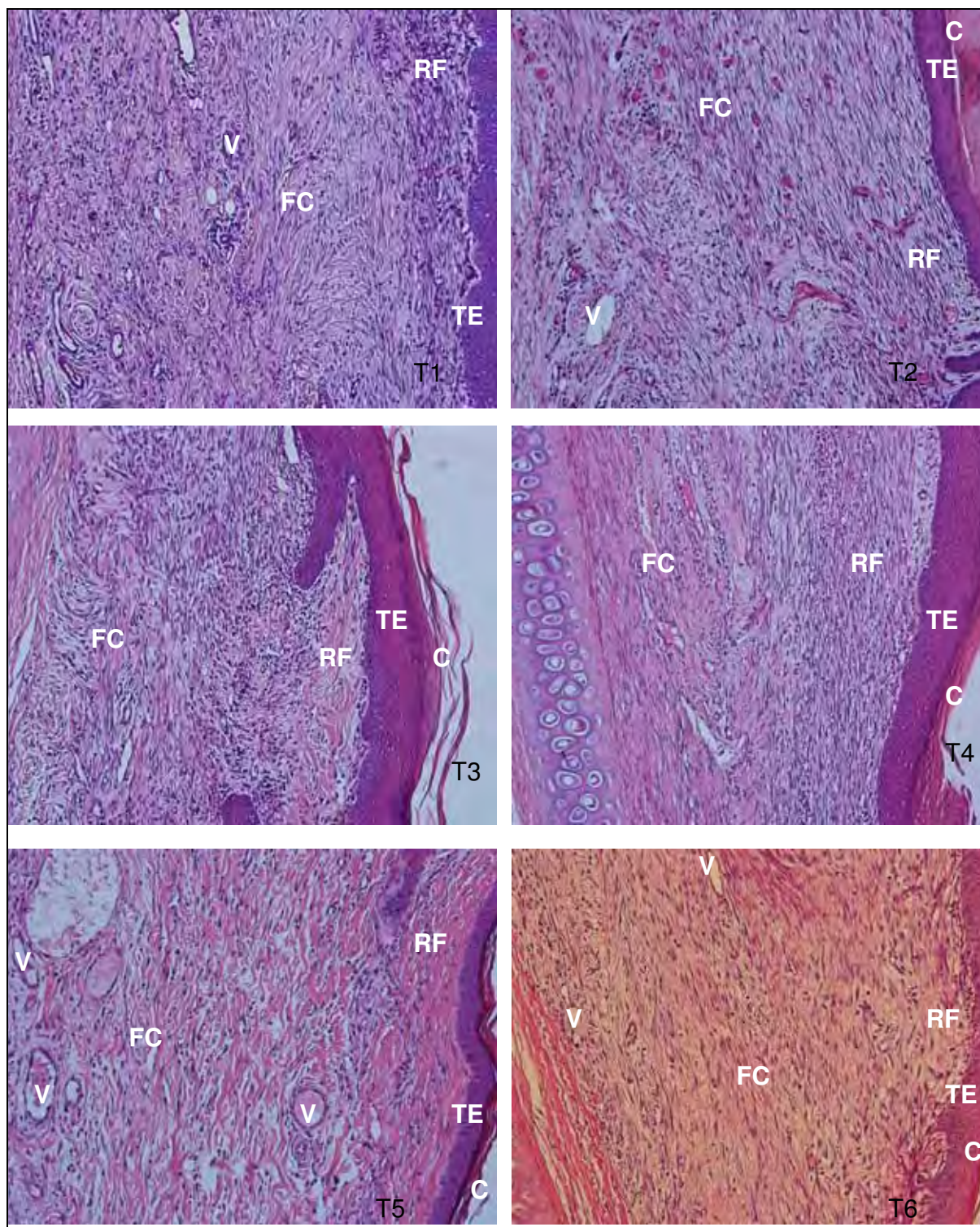


Figura 7. Fotomicrografias das feridas dérmicas de coelhos albinos da raça Nova Zelândia Branco no 7º dia de pós-operatório, submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6 evidenciando-se: (C) crosta,