

Leila Haddad Barrach Abruceze

**Avaliação da eficácia dos biocurativos em ratos
Wistar com lesões de pele causadas por
queimaduras**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Rossi Ferreira

**Botucatu – SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Abruceze, Leila Haddad Barrach.

Avaliação da eficácia dos biocurativos em ratos Wistar com lesões de pele causadas por queimaduras / Leila Haddad Barrach Abruceze. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

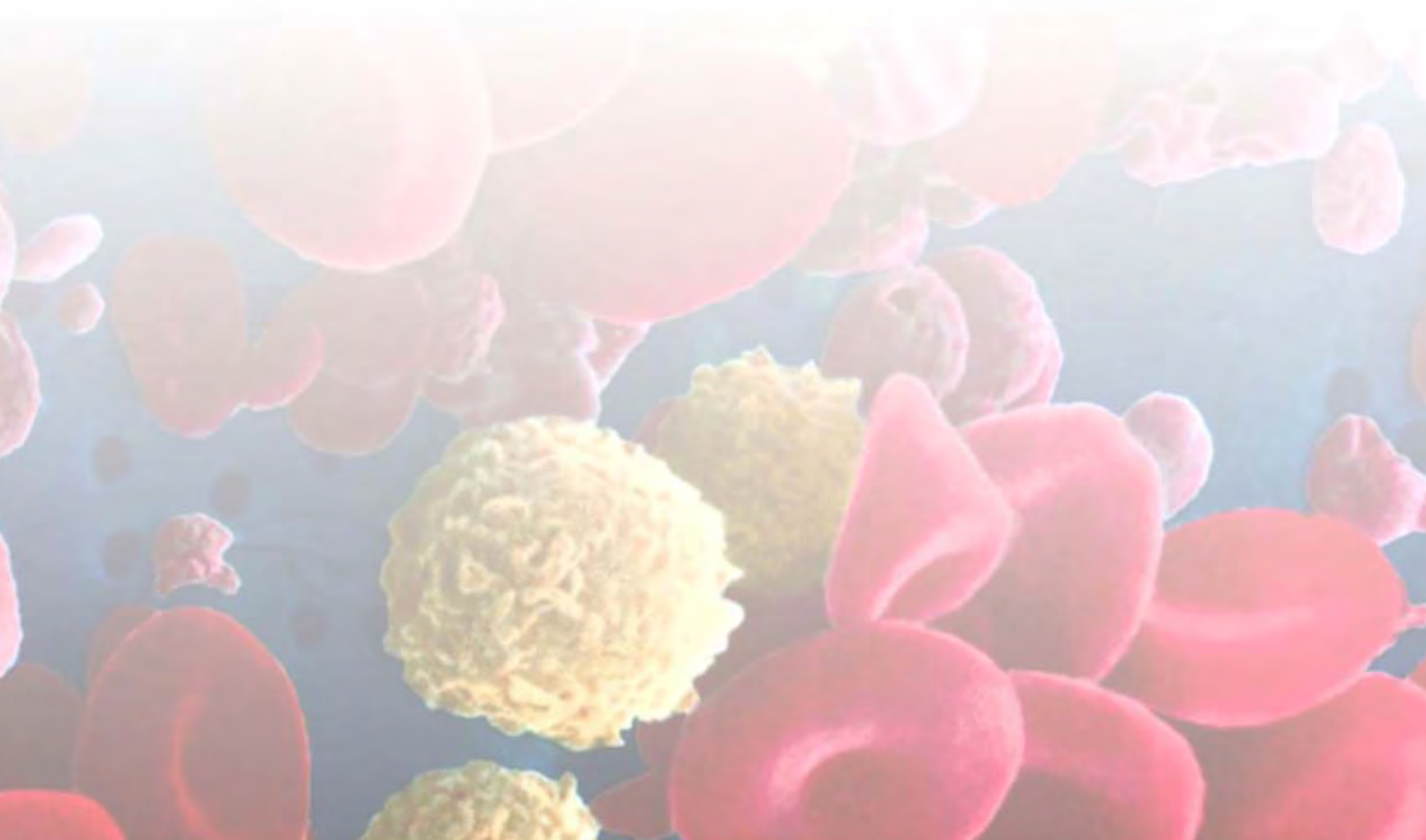
Orientador: Rosana Rossi Ferreira

Capes: 20603002

1. Biocurativo. 2. Farmácia - Pesquisa. 3. Cicatrização de feridas.
4. Medicamentos - Desenvolvimento. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Biocurativo; Eficácia; Farmacoeconomia; Lesões de pele.

Dedicatória



Dedico este trabalho:

A Deus que me deu lápis para continuar escrever minha história.

As minhas filhas Luísa e Carolína, âncoras de minha vida.

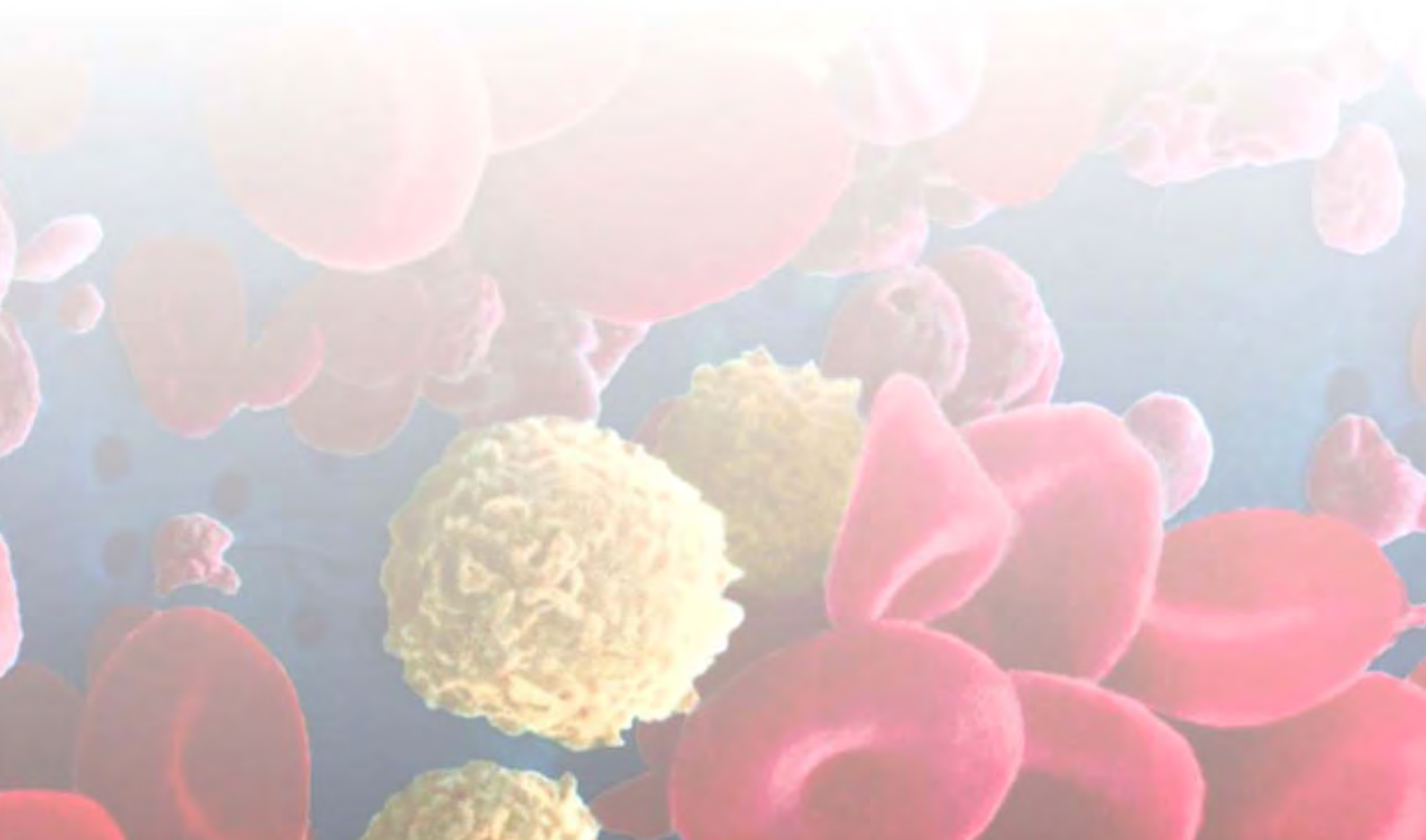
Ao Evandro, meu marido, pelo seu companheirismo e carinho.

A meus pais Cassio (in memoriam) e Suad, pelo incentivo. Mostraram-me que cada dia é uma renovação.

Aos meus sobrinhos, cunhados e cunhadas que me fizeram acreditar que tudo vale a pena.

Ao meu amigo Alessandro Fogeti, certo de que todas as riquezas do mundo não valem a um bom amigo.

*Agradecimentos
& especiais*



A minha Mãe, Suad, a senhora sempre foi importante, neste momento muito mais. Obrigada por me dar a vida, por me ensinar somente coisas boas, obrigada por tudo. Te amo!

A Minhas Irmãs e amigas Regina e Fátima: Tudo o que o sonho precisa para acontecer é alguém que acredita que ele possa ser realizado.

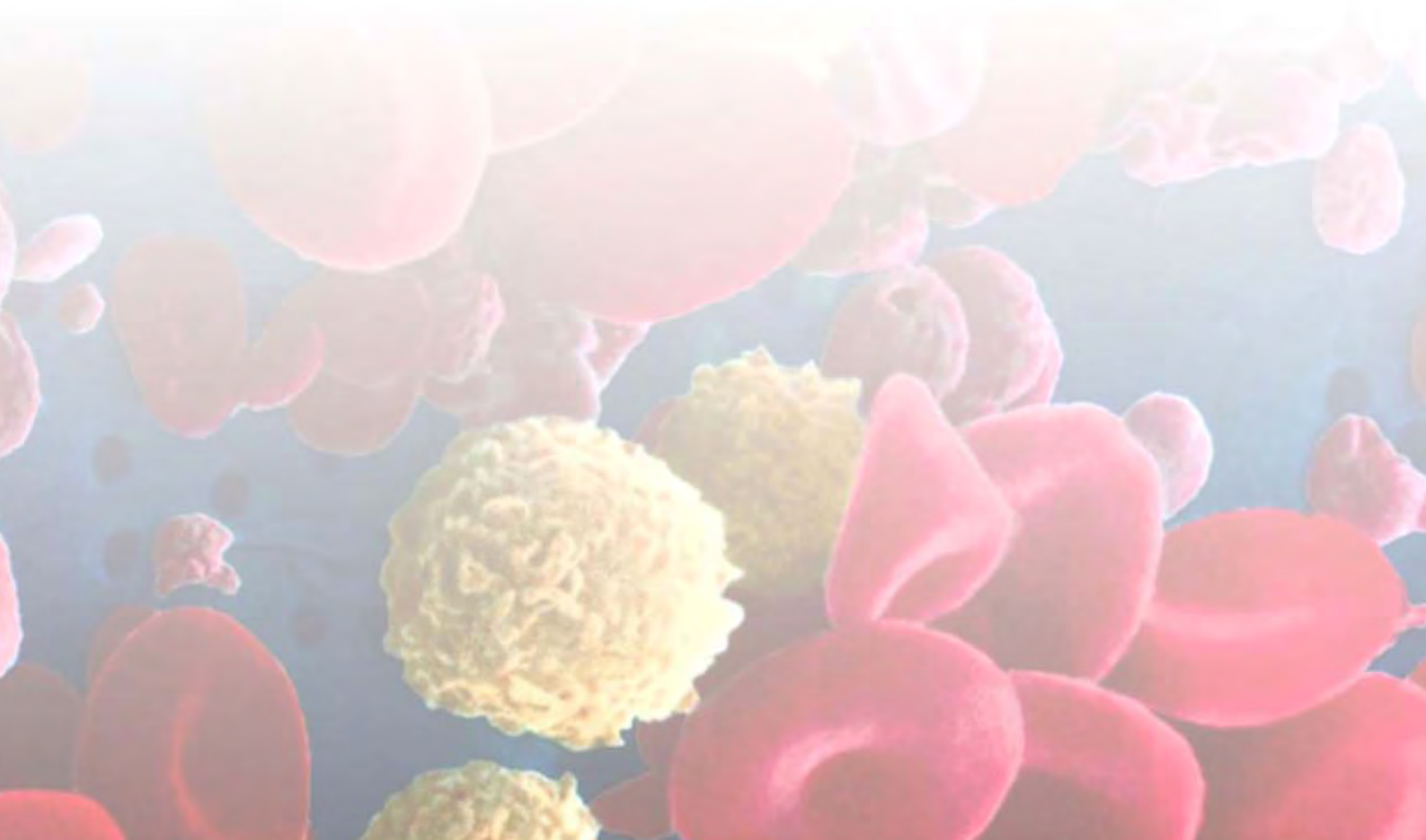
Obrigado por vocês acreditarem em mim.

Ao Evandro

Quero agradecer a você que esteve ao meu lado nas horas que chorei, nas horas que sorri, nas horas que lamentei.

As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem.

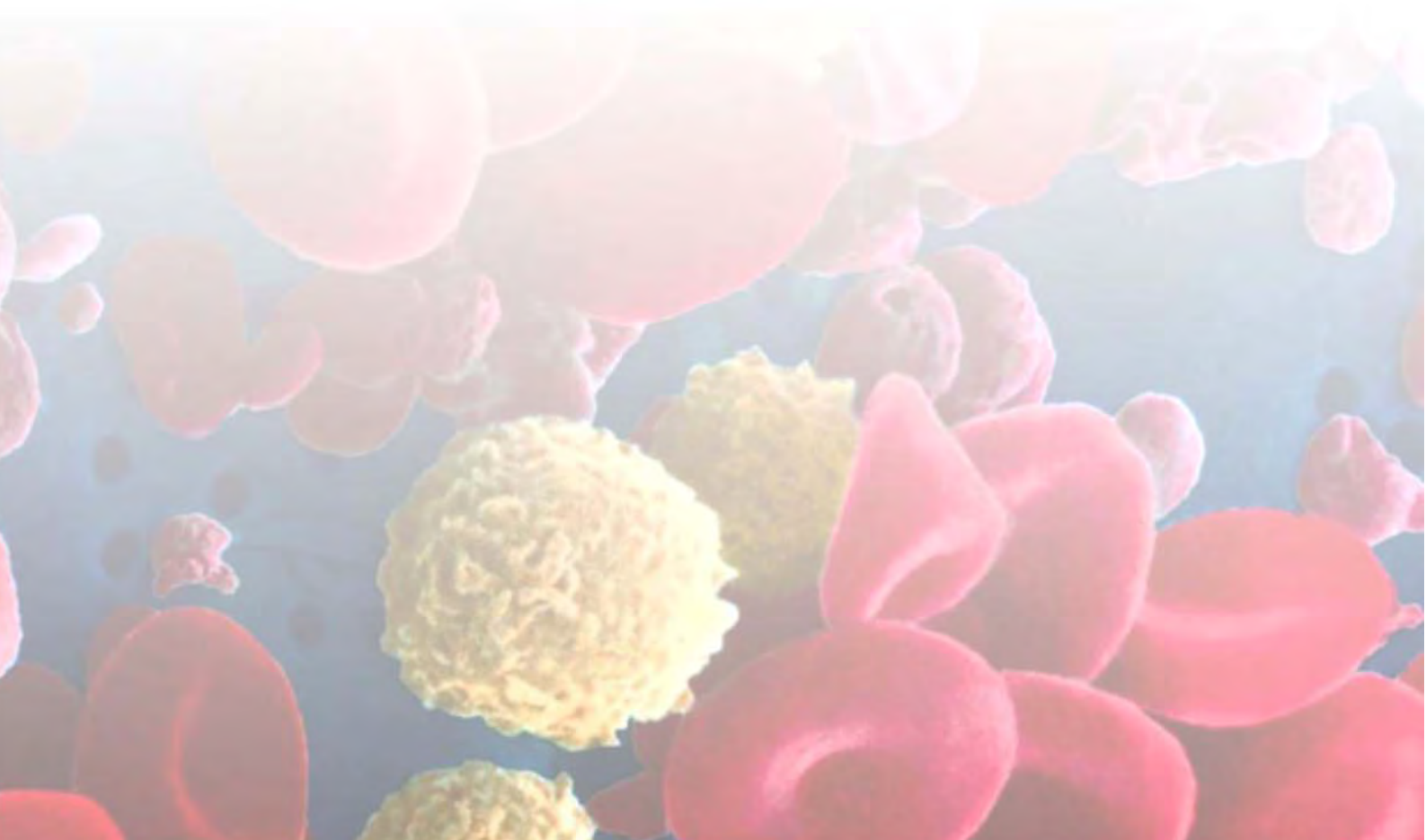
Epígrafe



*“Mas é claro que o sol vai voltar amanhã,
mais uma vez, eu sei...”*
*“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem.
Ou que seus planos nunca vão dar certo,
Ou que você nunca vai ser alguém...”*
“Quem acredita sempre alcança!”...

(Renato Russo)

Agradecimientos



Agradeço:

Aos ratos incluídos nesta pesquisa:

“não importa que os animais são incapazes ou não de pensar. O que importa é que são capazes de sofrer” (autor desconhecido)

A Dr^a. Rosana Rossi, minha orientadora:

Ensinou-me os caminhos para realização do meu trabalho e que “A ciência não pode prever o que vai acontecer. Só pode prever a probabilidade de algo acontecer”. (Cesar Lattes)

A Regiane Grato: Obrigado pelo apoio.

Ao Ednelson e Paulo Cesar do Laboratório Experimental: Obrigado pela colaboração.

A Adriana Piccinin: Obrigada pela atenção.

A todos os Mestres e Doutores do mestrado profissionalizante:

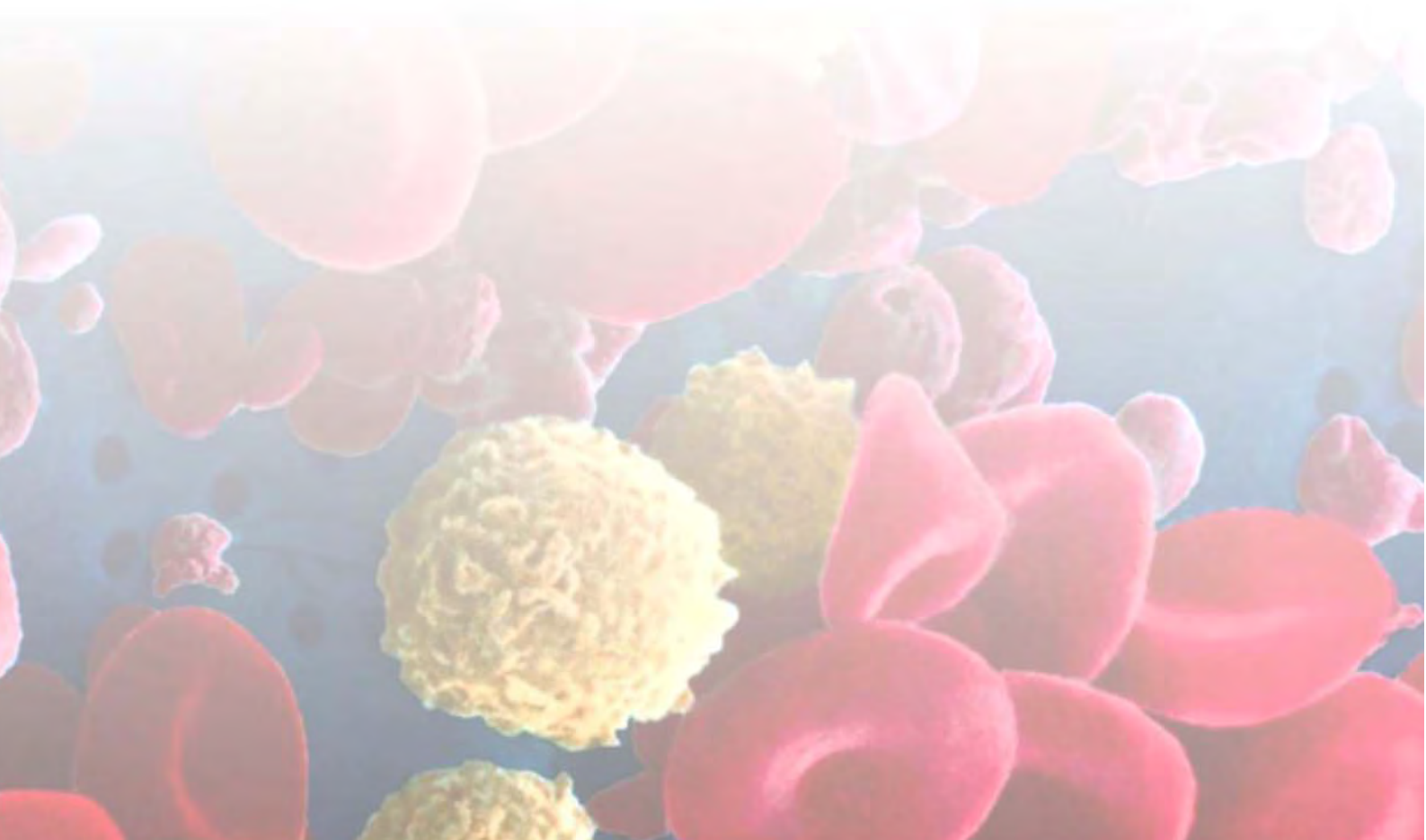
Obrigada por me mostrar que a “Ciência compõe de erros, que por sua vez são passos ate a verdade”. (Júlio Verne)

A professora de Inglês Gleice Arena: O bom professor é imprescindível.

Ao Hospital Unimed de Bauru: Obrigada por me proporcionar crescimento profissional.

A equipe de Assistência Farmacêutica, Auxiliares e Farmacêuticos do Hospital Unimed Bauru: Obrigada pelo carinho e paciência.

Resumo

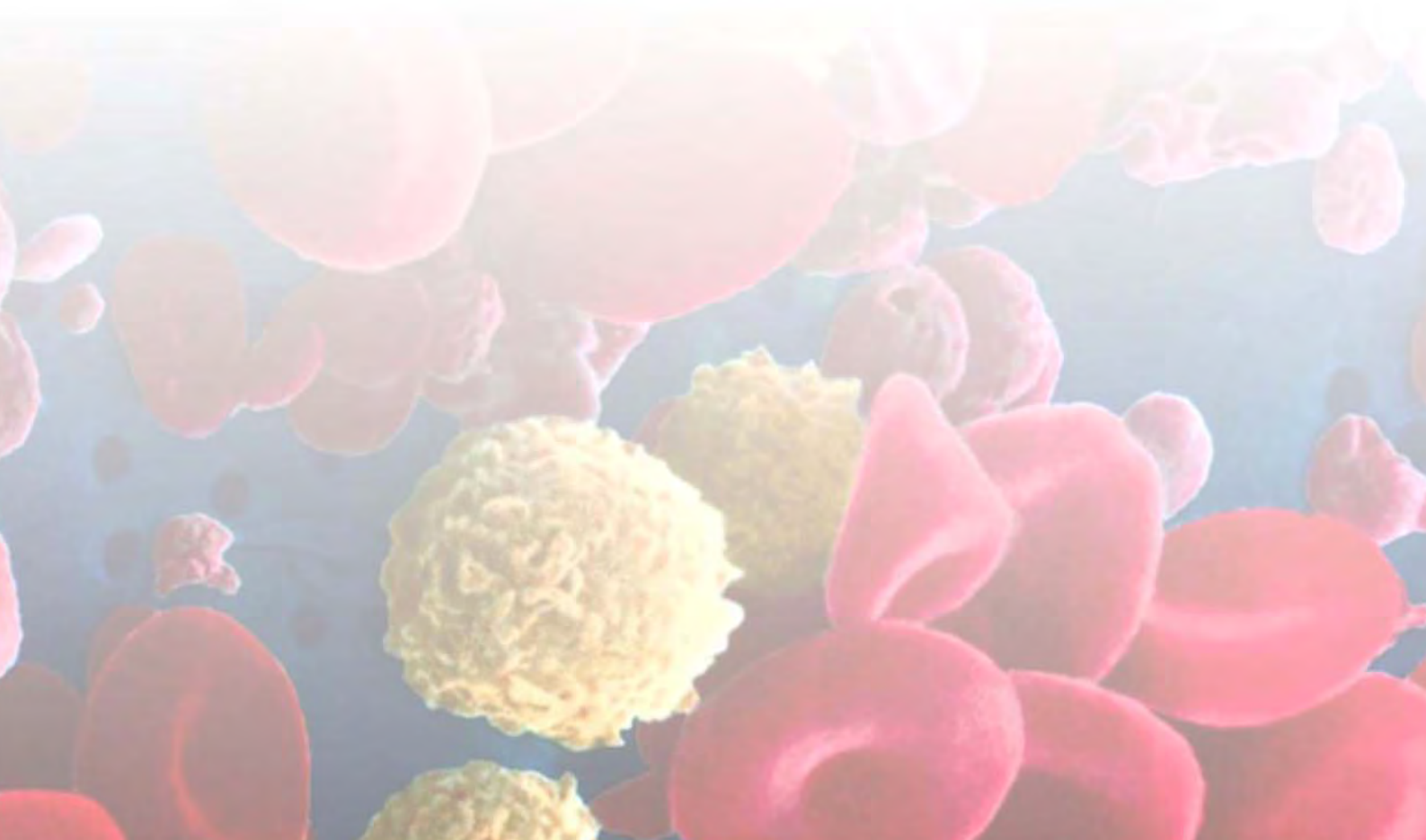


A pele é uma estrutura complexa pois apresenta um conjunto de estruturas superficiais com características elásticas, áspera e sob condições normais tem capacidade de se autoregenerar. Um acidente causando uma lesão de pele de menor ou maior intensidade pode ocasionar um dano grave para o paciente como as queimaduras, as quais, na maioria das vezes, são ocasionadas por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos. O tratamento destas lesões visa a restauração dos tecidos lesados e uma das opções de tratamento é a utilização dos biocurativos, um produto biotecnológico desenvolvido pelo Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu/UNESP obtidos a partir da adição "*in vitro*" de trombina e gluconato de cálcio ao Concentrado de Plaquetas (CP), estimulando a degranulação destas para liberação de vários fatores de crescimento, como PDGF e TGF- β , atuando no processo de cicatrização. Este estudo propõe avaliar a eficácia do Gel de Plaquetas *home made* em ratos *Wistar* com lesões de pele sofridas por queimaduras por escaldamento e realizar farmacoeconomia, analisando uma comparação do tempo de tratamento, eficácia e custo do Gel de Plaquetas com o tratamento hospitalar usual em queimaduras à base de colagenase + cloranfenicol. Foram incluídos 25 ratos da raça *Wistar*, divididos em 3 grupos segundo o tipo de tratamento utilizado: Grupo A, Colagenase + Cloranfenicol (10 ratos); Grupo B, Gel de Plaquetas (10 ratos) e Grupo C, controle (5 ratos). Os produtos foram aplicados em dias alternados em todos animais por um período de 30 dias e as lesões analisadas clinicamente e histologicamente. No grupo A, observou-se eritema em todos os animais avaliados, onde a presença de crosta foi uma constante, com exceção de 1 animal. A presença de exsudato ocorreu em 2 animais deste grupo. No grupo B, observou-se a presença de eritema e crosta em todos os animais e não houve exsudato em nenhum animal deste grupo. No grupo C, todos os animais apresentaram eritema, porém a presença de crosta ocorreu somente em 1 animal. Houve ausência de exsudato em todos os animais. Na análise estatística foi observada diferença significativa ($p < 0,01$) para formação de crosta entre o Grupo B (Gel de Plaquetas) e o Grupo C (Controle). Não foram observadas diferenças significativas para outras características. Na análise histológica, o grupo A apresentou discreta quantidade de vasos

sanguíneos, quantidades moderadas de macrófagos e fibroblastos, e discreta presença de fibras colágenas. O grupo B apresentou quantidades moderadas de vasos sanguíneos, macrófagos e fibroblastos e discreta presença de fibras colágenas. No grupo C, observou-se quantidades moderadas de vasos sanguíneos, macrófagos e fibroblastos e discreta presença de fibras colágenas. A reepitelização ocorreu normalmente na maioria dos animais de todos os grupos. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação histopatológica. Para os resultados da farmacoeconomia, o gel de plaquetas apresentou um melhor custo-efetividade em relação ao tratamento à base de colagenase + cloranfenicol. Desta forma, concluímos que a eficácia da colagenase e do gel de plaquetas em lesões causadas por queimaduras em ratos tiveram resultados clínicos e histológicos compatíveis e semelhantes e o Gel de Plaquetas apresentou melhores resultados econômicos em relação à pomada colagenase.

palavras chaves: Biocurativos, Eficácia, Farmacoeconomia, Lesões de Pele

Abstract

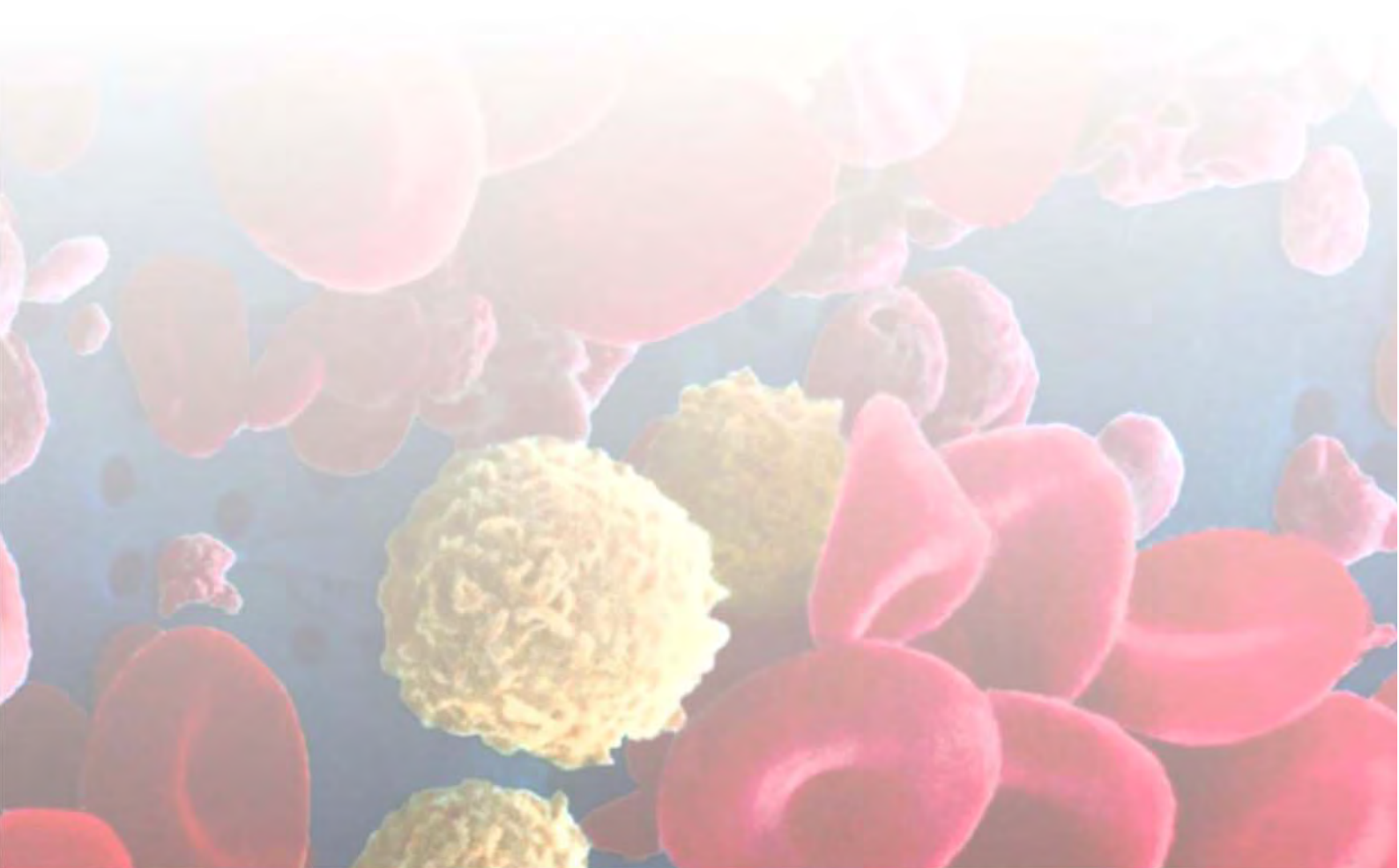


Skin is a complex structure because it shows a surface structure group with elastic features, rough and under normal conditions it is able to self regenerate. An accident causing a lower or higher intensity skin lesion may cause serious injury to the patient such as burns which usually are caused by thermal, chemical, electrical or radioactive agents. The treatment of such injury aims at the restoration of damaged tissues and one treatment option is the use of bio bandages, a biotech product developed by the Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu/UNESP (Cell Blood Center Engineering Laboratory from Botucatu / UNESP) obtained from "*in vitro*" thrombin and calcium gluconate addition to Platelet Concentrates (PC), stimulating the degranulation to releasing several growth factors such as PDGF and TGF- β , working in the healing process. This study aims to assess the *home made* Platelet Gel effectiveness in *Wistar* rats with skin injuries suffered from scald burns and perform pharmacoeconomics, analyzing a treatment time comparison, the cost and effectiveness of Platelet Gel concerning the usual hospital treatment for collagenase + chloramphenicol based burns. We included 25 *Wistar* rats divided into 3 groups according to treatment type used: Group A, Collagenase + Chloramphenicol (10 rats), Group B, Platelet Gel (10 rats) and Group C, control (5 rats). Products were administered on alternate days in all animals for 30 days and lesions were clinically and histologically analyzed. In group A, erythema was observed in all evaluated animals, where the presence of crust was a steady, with one animal exception. The presence of exudate occurred in two animals in this group. In group B, erythema and crust were observed in all animals and there was no exudate in any animal this group. In group C, all animals showed erythema, but the presence of crust occurred in only 1 animal. There was no exudate in the animals. In statistical analysis significant difference was observed ($p < 0.01$) for crust formation between Group B (Platelet Gel) and Group C (control). No significant differences were observed for other characteristics. In histological analysis, group A showed a slight amount of blood vessels, moderate macrophages and fibroblasts amounts, and slight collagen fiber presence. Group B showed moderate blood vessel, macrophage and fibroblast amounts and slight collagen

fiber presence. In group C, moderate fibroblast, macrophage and blood vessel amounts were observed and slight collagen fiber presence. Reepithelialization normally occurred in most animals from all groups. Statistical analysis showed there was no significant difference among groups in histopathological evaluation. For pharmacoeconomics results, platelet gel showed better cost and effectiveness compared to collagenase + chloramphenicol based treatment. Thus, we accomplish the collagenase and platelet gel effectiveness on injuries caused by burns in rats had compatible and similar clinical and histological results and platelet gel showed better economical results in relation to collagenase ointment.

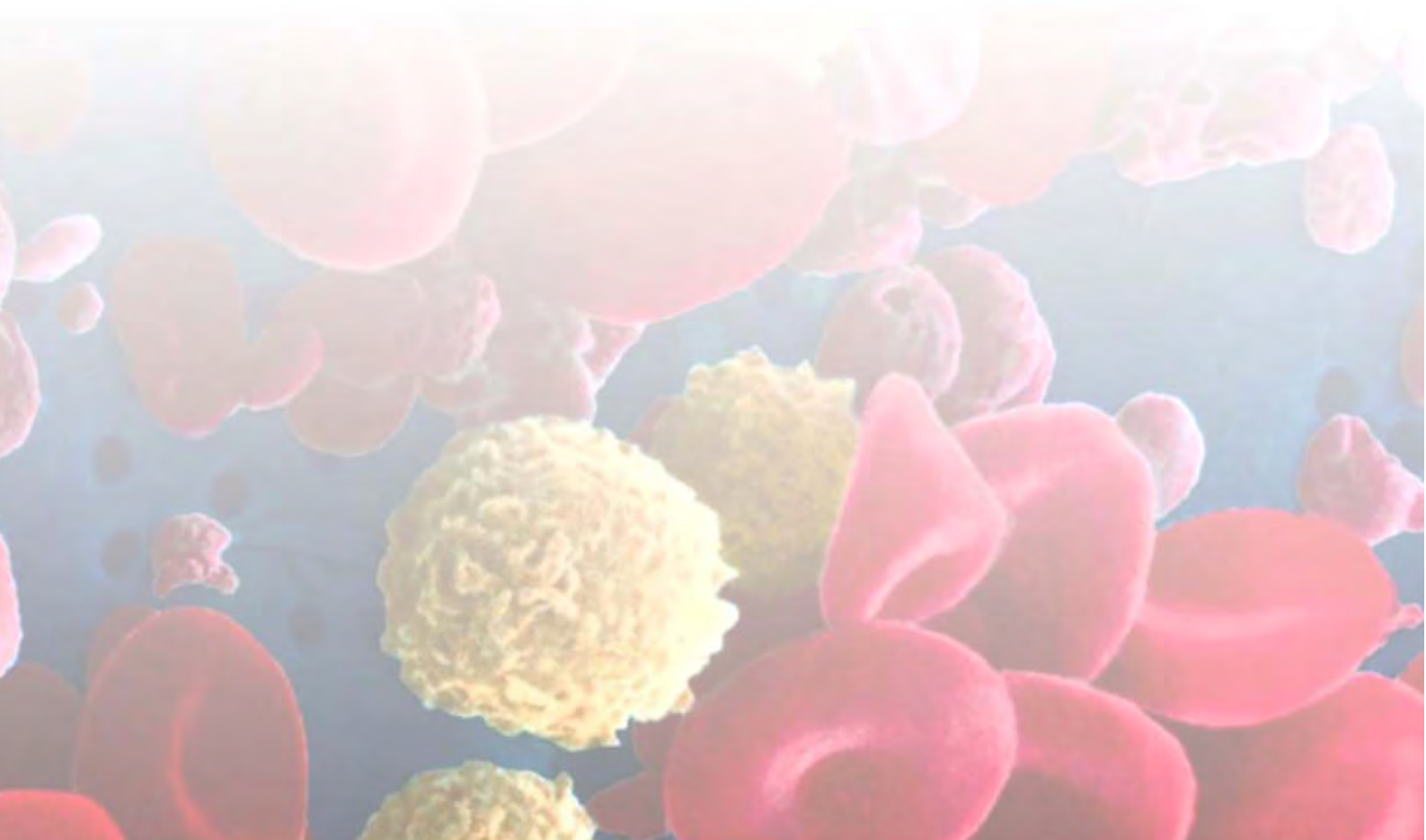
Key Words: bio bandages, Effectiveness, Pharmacoeconomics, Skin Lesions

Sumário



1. Introdução.....	19
1.1. Pele.....	20
1.2. Queimaduras.....	21
1.2.1. Aspecto epidemiológico das queimaduras.....	29
1.3. Farmacoeconomia.....	30
2. Objetivos.....	34
3. Casuística e Métodos.....	36
3.1. Casuística.....	37
3.2. Metodologia.....	38
3.2.1. Obtenção do concentrado de plaquetas randômicas (CP)...	40
3.2.2. Obtenção do concentrado de plaquetas por aférese (CPA).	41
3.2.3. Controle de Qualidade dos CPs.....	41
3.2.4. Obtenção do Gel de Plaquetas.....	42
3.2.5. Obtenção da trombina humana.....	43
3.2.6. Análise Histológica.....	43
3.3. Procedimentos estatísticos.....	44
4. Resultados.....	45
4.1. Resultados Clínicos.....	46
4.2. Resultados Histopatológicos.....	48
4.3. Farmacoeconomia.....	50
5. Discussão.....	51
6. Conclusão.....	57
7. Referências Bibliográficas.....	59
Anexos.....	65

1. Introdução



1.1. Pele

A pele é uma estrutura complexa, formada por camadas que revestem todo o nosso corpo, estendendo-se com as mucosas e órgãos, desempenhando funções essenciais para a sobrevivência. Possui um conjunto de estruturas superficiais com características elásticas, áspera e sob condições normais tem capacidade de se autorregenerar, sendo um dos principais elementos de proteção do organismo humano aos agentes de agressão ambiental (Vale, 2005).

A pele tem como função proteger o corpo contra atritos, lesões e penetração de agentes injuriantes, impedir a perda de água, auxiliar na termorregulação, proporcionar excreção através das glândulas sudoríparas, transmitir as sensações recebidas do ambiente para o sistema nervoso central e realizar a proteção contra os raios ultravioletas, absorvendo-os e sintetizando vitamina D (Junqueira; Carneiro, 2004).

O cérebro e a pele têm a mesma origem, ambos derivados do ectoderma. Este folheto embrionário é responsável pela sensibilidade tátil, sendo a primeira a manifestar-se no recém-nascido. No momento do nascimento, os contatos táteis naturais estimulam o aparecimento das funções respiratórias e digestivas. A pele é o único sentido que envolve o corpo, contendo em si vários outros sentidos e, portanto é considerada uma estrutura reflexiva. (Malagutti, 2010)

Duas camadas principais estão presentes na composição da pele: a epiderme e a derme. Além do subcutâneo (hipoderme), existe uma terceira camada variável, geralmente composta por tecido adiposo (Blanes, 2004)

A epiderme é composta por um epitélio estratificado, pavimentoso e queratinizado, no qual é possível encontrar quatro tipos celulares distintos, os quais são classificados em queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (Junqueira; Carneiro, 2004). Os queratinócitos são as células presentes em maior número formando cinco zonas morfologicamente distintas: estrato basal (germinativo), estrato espinhoso, estrato granuloso,

estrato lúcido e estrato córneo, sendo que os outros três tipos celulares permanecem dispostos entre os queratinócitos (Carter *et al*, 2003).

A derme é um tecido conjuntivo responsável pela sustentação da epiderme, além de promover a união da pele à hipoderme ao tecido celular subcutâneo (Junqueira; Carneiro, 2004). Duas camadas compõem a derme: a camada papilar, mais superficial, delgada, frouxa, formando cristas (papilas) dérmicas na face de contato com a epiderme e a camada reticular, mais profunda, espessa e densa, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, com grossas fibras de colágeno do tipo I, também chamado de *colágeno intersticial* ou *fibrilar*. (Carter *et al*, 2003). Em seres humanos e suínos, a pele é suprida pelos vasos músculo-cutâneos, enquanto que em cães e outros animais de pele não aderida possuem vasos cutâneos diretos, divididos em três níveis interconectados: o plexo profundo, subdérmico ou subcutâneo, o plexo médio ou cutâneo e o plexo superficial ou subpapilar (Fleckenell, 1994).

Um acidente causando uma lesão de pele de menor ou maior intensidade pode ocasionar um dano grave para o paciente, sendo a pele o principal órgão de percepção permitindo a transmissão de sensações físicas e emocionais. (Malagutti, 2010)

Existem algumas complicações que podem ocorrer no reparo da pele, em situações nas quais a cicatrização de feridas localizadas nos membros é inviabilizada pela pouca elasticidade da pele, escassez de tecidos locais ou a associação frequente de lesões ortopédicas com perda cutânea (Ross *et al*. 1974;).

1.2. Queimaduras

As queimaduras são lesões traumáticas causadas, na maioria das vezes por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos atuando nos tecidos de revestimento do corpo humano, podendo ocasionar destruição parcial-

superficial (limitada à epiderme e porção superior da derme) ou total (destruição da epiderme, derme, tecido subcutâneo podendo invadir músculos, tendões e ossos) (Vale 2005; Blanes, 2006; Carvalho, 2002; Crisostemo *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2004).

Vários fatores influenciam direta ou indiretamente no prognóstico e na gravidade de uma lesão térmica, sendo classificada de acordo com a extensão, área queimada, presença ou ausência de infecção e pelo grau da queimadura. (Serra *et al.*, 2004)

Segundo a literatura, as queimaduras podem ser classificadas em primeiro grau (Grau I), segundo grau (Grau II) e terceiro grau (Grau III) (Medeiros *et al.*; 1999, Crisostemo *et al.*, 2004, Gomes; 2001).

Segundo Medeiros *et al.* (1999), as queimaduras de primeiro grau (grau I) são aquelas que atingem a camada mais extensa da pele, clinicamente a epiderme. A região atingida encontra-se hiperemiada, com ausência de bolhas ou flictenas. Este tipo de queimadura não provoca alterações hemodinâmicas, tampouco é acompanhada da alteração clínica significativa. (Crisostemo *et al.*, 2004, Gomes; 2001). (figura 1)

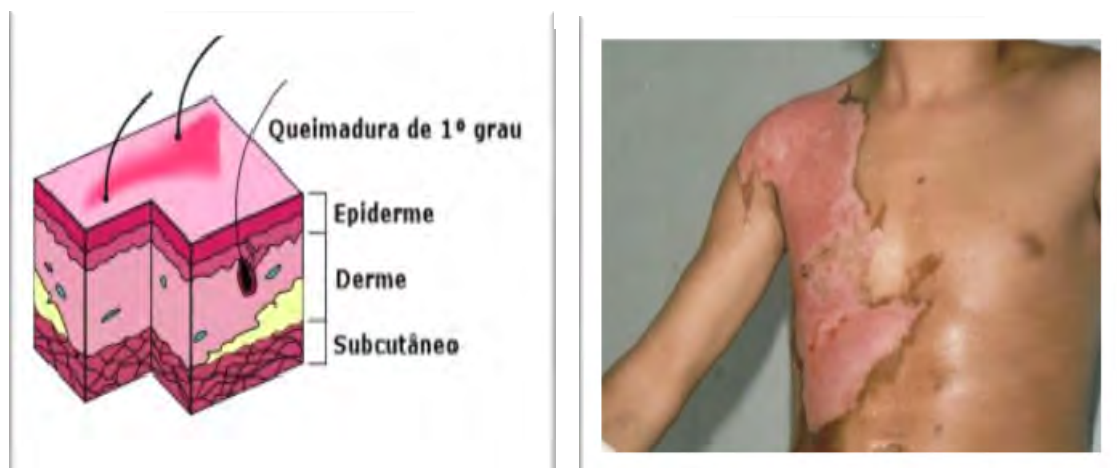


Figura 1 - Refere-se a queimadura de primeiro grau demonstrando o comprometimento da epiderme. (Falabaella, 2006)

Esse tipo de queimadura é considerado superficial, tendo como principais causas a exposição excessiva ao sol, escaldura e faísca. Clinicamente apresenta lesão seca sem bolhas e coloração rosada (figura.1). Essa lesão é considerada dolorosa e o tempo de cicatrização varia de 2 a 5 dias com descamação, sem escarificação (Richard *et al*, 1994)

As queimaduras de segundo grau (grau II) envolvem a epiderme e parte da derme. Seu reconhecimento é simplificado, pois a característica clínica mais marcante é a formação das bolhas úmidas ou flictenas, com coloração rosada a vermelho purpura, apresentando dor intensa à manipulação.(Medeiros *et al.*; 1999, Crisostemo *et al.*, 2004, Gomes; 2001). (figura 2). É causada pelo contato com líquidos ou sólidos quentes, faíscas e substancias químicas, sendo seu tempo de cicatrização de 5 a 21 dias, sem a necessidade da realização de enxerto.



Figura 2 - Refere-se a queimadura de segundo grau demonstrando o comprometimento da epiderme e parte da derme. (Falabaella, 2006)

As queimaduras de terceiro grau (grau III) são aquelas que acometem a totalidade das camadas da pele (epiderme e derme); em muitos casos outros tecidos tais como tecido celular subcutâneo, músculos e tecidos ósseos. Apresentam um aspecto esbranquiçado ou marmóreo e há redução da elasticidade tecidual, tornando-se mais rígida. (Medeiros *et al.*; 1999, Crisostemo *et al.*, 2004, Gomes; 2001). (figura 3)



Figura 3 - Refere-se a queimadura de terceiro grau demonstrando o comprometimento da epiderme, derme e tecido subcutâneo. Falabaella, 2006)

Essas queimaduras tem como principais causas o contato com líquidos ou sólidos quentes, faíscas, substancias químicas e elétricas. Não possui dor local, mas dolorosa nas áreas circundantes de espessura parcial e superficiais. O tempo de cicatrização nas áreas extensas podem necessitar de meses para cicatrizar com enxertos de pele. Em áreas menores podem necessitar semanas com ou sem necessidade de enxertos de pele. (Irion, 2005)

O principal objetivo do tratamento de lesões térmicas é a restauração dos tecidos lesados. O processo de cicatrização desses tecidos pode ocorrer por primeira intenção (sem perda tecidual), segunda intenção (perda tecidual e formação de tecido de granulação) e por terceira intenção (lesão cirúrgica com infecção), envolvendo processos biológicos complexos que são mediados por eventos celulares e moleculares (Blanes; 2006, Ross *et al.*; 1974, Serra *et al.*; 2004).

Segundo Balbino (2005), o processo de cicatrização de lesões compreende estágios interdependentes e simultâneos, que são descritos em fases dinâmicas e sobrepostas entre si. Essas fases são chamadas de inflamatória, proliferativa e de remodelação. Esse processo tem início no momento da lesão, onde ocorrem estímulos para deposição, ativação e recrutamento de plaquetas, as quais são responsáveis pela formação do trombo, que por sua vez limita a perda de constituinte circulatório para o

interstício celular e fornece matriz provisória para alicerçar a migração de células.

Os macrófagos são as células inflamatórias mais importantes da fase inflamatória. Permanecem do terceiro ao décimo dia, fagocitando bactérias, desbridando corpos estranhos e direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação (Mandelbaum *et al*, 2003). A eliminação dos tecidos desvitalizados por fagócitos típicos das fases mais iniciais da resposta inflamatória (neutrófilos e macrófagos) apresenta maior importância nas lesões dérmicas profundas. Estas células inflamatórias influenciadas pela baixa tensão de oxigênio, alta concentração de ácido láctico e pH baixo, são responsáveis pela produção de diversos fatores de crescimento e citocinas que iniciam o processo de reparo tecidual, atraindo fibroblastos e queratinócitos de áreas adjacentes à lesão (Eming *et al* 2007). Com o aumento da concentração local dos fatores de crescimento as citocinas se elevam, os processos de regeneração vascular e fibroplasia se intensificam através da angiogênese, migração e proliferação fibroblástica, formando um tecido rico em elementos vasculares, celulares e a produção do tecido de granulação, que aos poucos vai se alastrando, preenchendo o vazio resultante dos tecidos eliminados (Balbino *et al.*, 2005).

A ativação das plaquetas pela trombina liberam através de seus grânulos vários mediadores inflamatórios como ADP (Adenosina difosfato), a fibronectina e fibrinogênio, cuja função é de agregação celular. Os fatores de crescimento TGFB –*Transforming Growth Factor* e PDGF – *Growth factor receptor-derived platelets*, formam um gradiente quimiotático orientando a migração das células de circulação e regiões adjacentes, envolvidos com a instalação da resposta inflamatória (Greenhalgh; 1998).

Os leucócitos polimorfonucleares, especificamente os neutrófilos, chegam ao início da lesão tissular e permanecem por um período de 1 a 2 dias sendo responsáveis pela fagocitose (Mandelbaum *et al.*;2003, Balbino *et al.*; 2005).

Por volta de terceiro ao quinto dia aparecem os macrófagos com a função de orquestrar a reparação tissular por meio da liberação e mediadores

lipídicos (leucotrienos), proteínas (frações do complemento e fatores de coagulação), enzimas (colagenases) e mediadores peptídicos (fatores de crescimento e citocinas). Estes mediadores tem a função de estimular a migração e proliferação de diferentes tipos celulares e a produção da matriz extracelular. Os macrófagos também fagocitam material não viável e debridam corpos estranhos e a sua presença no sítio inflamatório caracteriza o início da segunda fase de cicatrização, a proliferação.

A fase da proliferação é subdividida em três etapas: epitelização; fibroplasia e angiogênese. (Greenhalgh; 1998).

As células essenciais da fase de epitelização são os queratinócitos, que após sofrerem diferenciação fenotípica, migram da borda para o centro da lesão, regenerando o tecido lesado extenso e profundo. A migração dos queratinócitos é mediada por fatores de crescimento TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*) e EGF (*Epidermal Growth Factor*) que induz a produção de fibronectina e colágeno auxiliando essa movimentação (Mandelbaum, *et al.*; 2003, Babino *et al.*;2005).

O ressecamento do leito da lesão dificulta a migração celular aumentando o período de cicatrização. Concomitantemente à epitelização, ocorre a fase de fibroplasia e angiogênese, sendo, respectivamente, os fibroblastos e células epiteliais os elementos essenciais nesta fase. O influxo de neutrófilos e macrófagos para a região lesada ativa, através do gradiente quimiotática, libera fatores de crescimento os quais juntamente com os fibroblastos ativados migram para o centro da lesão através da rede de fibrina e da fibronectina, sendo induzidos a sintetizar o colágeno. (Babino *et al.*;2005)

Os fibroblastos produzem vários componentes da matriz extracelular (colágeno tipo I e II, elastina, glicosaminoglicanas e proteoglicanas) e sofrem diferenciação fenotípica transformado-se em miofibroblastos, por um mecanismo até então desconhecido. Os miofibroblastos ativam o fechamento da lesão por contração assim que o epitélio recobre a lesão, sofrendo apoptose (Mandelbaum, *et al.*; 2003, Babino *et al.*;2005).

A matriz celular passa por modificações na sua composição favorecendo a fixação e a imobilidade das células. Os fibroblastos são células com mudanças mais acentuadas, passando a secretar grande quantidade de colágeno, tornando-se o principal componente da cicatriz em formação. A fase de fibroplasia caracteriza-se pelo início do tecido de granulação, o qual é formado por uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico, contendo macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados. A fase de fibroplasia por sua vez necessita de oxigenação e nutrição, que são fornecidos pelos novos vasos sanguíneos, formados pela ação de fatores de crescimento sobre as células vasculares, processo esse denominado de angiogênese (Crovetti *et al.*; 2004).

Na fase de remodelação, a célula mais importante é o fibroblasto por produzir fibronectina, ácido hialurônico, proteoglicanas e colágeno essencial para a migração celular e regeneração tecidual, sendo a resistência da cicatriz determinada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão organizadas. (Mandelbaum, *et al.*; 2003.)

A fase de remodelação envolve sucessivas etapas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição do colágeno feita a princípio de maneira aleatória, sendo a seguir orientada pela organização da fibronectina e pela tensão aplicada ao tecido. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno resultando numa aparência mais regular da cicatriz. Ao final dessa etapa, os anexos da pele sofrem regeneração limitada aparentando uma cicatriz pálida devido à regeneração precária dos melanócitos, constituindo uma cicatriz hipovascularizada onde ocorre uma diminuição de todos os elementos celulares do tecido conjuntivo, inclusive fibroblastos (Balbino *et al.*; 2005),

O processo de cicatrização de lesões é um complexo biológico muito bem caracterizado em nível microscópico, porém sua regulação em nível molecular é pobremente conhecida. (Carter; 2003).

Os fatores de crescimento polipeptídicos, como os fatores derivados da ativação plaquetária (PDGF) e o fator de crescimento de transformação (TGF-

β), mediam atividades consideradas essenciais para o início da cicatrização, através do recrutamento, estimulação e proliferação de células para posterior deposição da matriz extracelular. Ambos os fatores de crescimento são liberados através da degranulação de plaquetas, quando estas são ativadas pela trombina (Ross *et al.*; 1974, Barbieri; 2004, Carter; 2003).

O PDGF, particularmente, estimula a mitogenicidade e quimiotaxia de fibroblastos, neutrófilos e macrófagos para produzirem e secretarem outros fatores de crescimento envolvidos em diversas fases do processo de cicatrização. Regula a produção de proteínas da matriz extracelular, inibe a produção de proteases, determinando a fase de remodelação (Ross *et al.*; 1974, Mandelbaum, *et al.*; 2003, Crovetti *et al.*; 2004, Carter; 2003).

O TGF- β é também um potente agente quimiotático para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, tem ação sob os queratinócitos e induz a síntese de proteínas da matriz extracelular (MEC). O TGF- β participa também da diferenciação de miofibroblastos e do processo de angiogênese. (Carvalho, 2002).

Experimentalmente diversos estudos clínicos têm demonstrado que os fatores de crescimento aceleram o processo de cicatrização com reparação tecidual, através do seu uso tópico (Carter, 2003).

Durante séculos, o tratamento tópico das lesões tissulares busca melhores resultados cicatriciais em menor tempo possível. Os relatos datam da pré-história através do uso de cataplasmas de folhas e ervas, evoluindo para métodos mais aperfeiçoados como os emplastos de ervas, mel e a desinfecção com álcool proveniente do vinho e vinagre (Carter, 2003).

Hipócrates em 300 a.C. sugeriu aplicações nas lesões infectadas de calor, pomadas e remoção de material necrosado. Com o surgimento de armas de fogo, as lesões tornaram-se mais difíceis de curar e somente com o avanço dos conhecimentos em química, é que surgiram os primeiros compostos de cloro e iodo para limpeza e remoção de material não viável das lesões (Blanes, 2005).

Atualmente a proposta do tratamento de lesão com curativos tópicos inclui princípios de limpeza, desbridamento mecânico e/ou químico, ambiente local favorável ao processo de cicatrização em suas diversas fases, bem como diversos tipos de coberturas para as lesões a base de papaína, carvão ativado, hidrocolóides, filmes de poliuretano, entre outros (Blanes, 2005, Mandelbaum *et al.*, 2003).

As perspectivas atuais para o tratamento tópico direcionam para pesquisas no campo da bioengenharia tecidual abordando a síntese de substâncias proteicas e químicas (fatores de crescimento) envolvidas nos fenômenos cicatriciais sendo proposto para tal fim inovações como o “biocurativo”. Os biocurativos obtidos a partir da adição “*in vitro*” de trombina e gluconato de cálcio ao plasma humano rico em plaquetas, estimulam a degranulação das plaquetas para liberação de fatores de crescimento (PDGF e TGF- β), de maneira a atuar diretamente no processo de cicatrização (Carter, 2003)

1.2.1. Aspecto epidemiológico das queimaduras

As queimaduras são consideradas um problema de saúde pública mundial. Estima-se que em todo o mundo, cada ano, mais de 6,6 milhões de pessoas sofrem vários tipos de queimaduras e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a quinta causa de morte violenta em todo o mundo, sendo responsável por 322.000, em 2002. Nos EUA, as queimaduras correspondem a quarta causa por injúria. No Brasil, estima-se que pelo menos 1.000.000 de indivíduos queimem-se por ano, sem haver restrição de sexo, idade, procedência ou classe social. Isso trás um forte impacto econômico, levando em consideração o tempo de tratamento prolongado (Zhang *et al*, 2010; Silva, 2008; Penn *et al*, 2012; Brigham, *et al* 1996)

No Brasil, as queimaduras ocupam o terceiro lugar entre as internações por acidentes e violências. As queimaduras geram incapacidade prematura do indivíduo, sequelas estético-funcional, incalculáveis custos emocionais e

sociais nas vítimas e seus familiares e impacto sócioeconômico na sociedade, tendo em vista o tratamento prolongado. Assim, a queimadura é considerada um problema de saúde pública. (Malagutti, 2010)

Para o sistema de Saúde brasileiro, as consequências desses agravos representam um aumento de gastos com emergência, assistência e reabilitação mais onerosa do que a maioria dos procedimentos médicos convencionais (Krug *et al*, 2002).

Os agentes causadores de queimaduras estão diretamente relacionados com as características geográficas, climáticas, sociais e demográficas de cada país. Alta densidade populacional, pobreza e analfabetismo são os principais fatores demográficos associados com um alto risco para queimaduras (Lima *et al*, 2008).

Nos hospitais de emergência, durante a fase aguda do tratamento, e no atendimento ambulatorial, esses pacientes necessitam de atenção especializada, de reabilitação física e psicológica com sobrecarga sobre a estrutura e o funcionamento dos serviços de saúde. (Lima *et al*, 2008)

Acidentes por queimaduras, não podem ser considerados uma doença instalada, com determinado curso e desfecho, e sim, um agravo que acomete o indivíduo repentinamente e de forma brutal, levando a uma internação inesperada. O crescimento dos gastos em saúde depende do mercado, ou seja, do encontro entre os que querem adquirir os bens e serviços de saúde e aqueles que os oferecem (Krug *et al*, 2002).

1.3. Farmacoeconomia

O consumo traduz-se sob a forma de compra de bens e serviços sendo, portanto, um gasto efetivamente realizado. A demanda geral por um bem reflete as intenções de compra em paralelo com os diversos níveis de preço. O consumo de saúde é um consumo final em oposição ao consumo intermediário efetuado em vista da produção dos bens (Cramer *et al*, 1998).

O setor saúde apresenta estruturas de mercado complexas e nada óbvias. Essas estruturas influenciam criticamente os padrões de atendimento médico e não podem ser ignoradas. Pelo lado da oferta, o lucro não é por si só um motivo adequado para explicar o "mercado" da saúde, como é para outros tipos de bens e serviços, dado que há um grande número de instituições públicas e privadas não lucrativas que prestam serviços de saúde. Como tais serviços não podem ter um preço "a priori" definido no mercado torna-se difícil medir a preferência dos consumidores por eles. A própria medicina estatal, em um grande número de países desenvolvidos garante direitos ao consumo de tais serviços àqueles que não podem pagar pelos mesmos. Pelo lado da demanda, os consumidores não escolhem entre os serviços de saúde e os demais bens e serviços através de uma "racionalidade na escolha", e sim pela necessidade ou não de consumo de tais serviços. Esse consumo geralmente não é previsível e ocorre em situações de forte conteúdo emocional/psicológico. Quem vai fixar que tipos de serviços vão ser consumidos é, em última instância, o médico, aquele que faz o diagnóstico, e não o paciente (Cramer *et al*, 1998).

Rotineiramente os profissionais de saúde são questionados quais as melhores opções de tratamento para os pacientes. Na década de 80, a grande preocupação com o tratamento do paciente era a eficácia, segurança do tratamento, fornecendo que havia de melhor, não importando com o custo desse tratamento (Bootman *et al*, 1996).

Durante esse período, em alguns países foram realizados estudos a respeito da capacidade dos planos de saúde público e privado em arcar com custos de medicamentos e correlatos. Diante deste fato, chegou-se a conclusão de que em 30 a 40 anos os sistemas de saúde entrariam em colapso. Com essas informações começou a nascer uma preocupação com os gastos em saúde, que originou um movimento chamado *managedcare*, que pode ser traduzido como "atendimento gerenciado à saúde", ou uma preocupação econômica administrativa das ações de saúde, que estimulou no aparecimento de uma nova ciência denominada Farmacoeconomia (Bisson, 2007).

Sabe-se que é necessário melhorar a prescrição. No entanto, subjacente a esta intenção está a de reduzir os custos de medicamentos. As preocupações socioeconômicas são tanto de quem paga como de quem quer vender. Tal como acontece com outras áreas da produção e do comércio, os quais são fornecedores de bens que mais tem se preocupado em demonstrar as vantagens econômicas dos seus produtos. Neste caso, é a indústria farmacêutica quem, paralelamente à análise da eficácia e da segurança dos medicamentos, mais tem investido em demonstrar o impacto econômico destes (Folland *et al.*, 1997).

O objetivo da investigação em farmacoeconomia é identificar, medir e comparar os custos (os recursos consumidos) e os resultados (efetividade, qualidade de vida, utilidade, eficácia, segurança, morbidade, mortalidade) da utilização dos medicamentos. A farmacoeconomia é, portanto, a aplicação da economia da saúde especificamente aos medicamentos, e não pode ser considerada uma ciência ou técnica individualizada (Bisson, 2007).

A farmacoeconomia não está relacionada com uma ciência em particular; ela é uma compilação de ciências. Os métodos de pesquisa usados pelos cientistas são:

- ✓ Análise de custo-minimização;
- ✓ Análise custo-efetividade
- ✓ Análise custo-benefício;
- ✓ Análise custo-utilidade;
- ✓ Qualidade de vida ajustada por anos de vida.

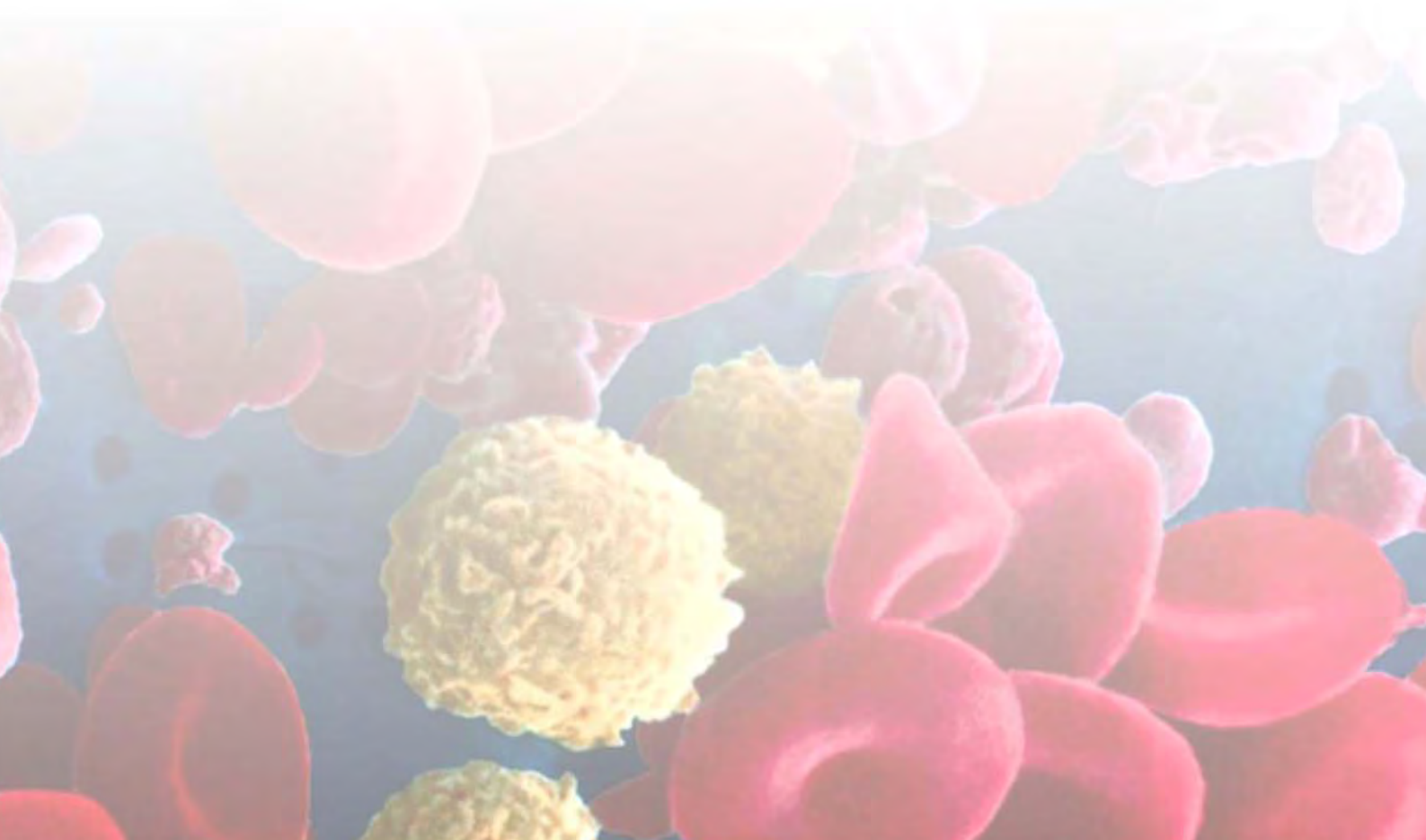
São retiradas de várias ciências, incluindo economia, epidemiologia, farmácia, medicina e ciências sociais (Cramer *et al.*, 1998).

Os estudos farmacoeconômicos têm sido realizados principalmente pela indústria farmacêutica. A maioria desses estudos é solicitada pelo marketing das indústrias farmacêuticas, que utilizam os resultados, como uma nova promoção, procurando estabelecer vantagens sobre os outros medicamentos já comercializados. Por outro lado, devido sua própria formação, as maiorias dos médicos preocupam-se essencialmente em conhecer a eficácia e a segurança

dos medicamentos que prescreve e está pouco treinada para compreender e interpretar os estudos econômicos (Bisson, 2007).

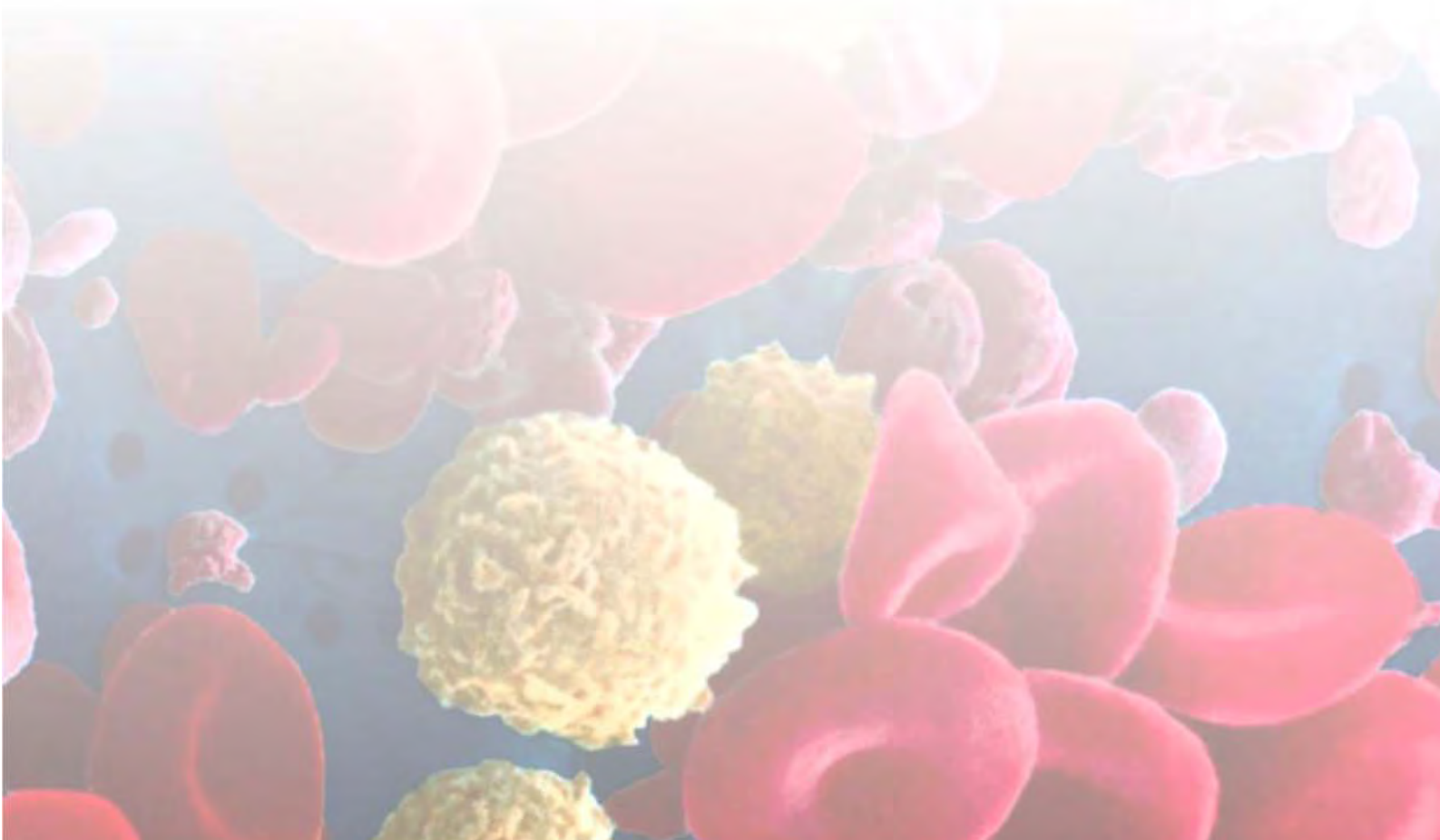
A avaliação econômica de custos de tratamentos não é de grande preocupação para o médico prescritor, e sim para os gestores de saúde pública ou privada (Cramer *et al*, 1998).

2. Objetivos



- Avaliar a eficácia e efetividade do Gel de plaquetas em ratos *wistar* com lesões de pele sofridas por queimaduras por escaldamento, simulando acidentes domésticos;
 - Realizar farmacoeconomia, analisando tempo de tratamento e custo do produto em relação ao protocolo já estabelecido.
-

3. Parasuística e Métodos



3.1. CASUÍSTICA

Foi realizado estudo clínico prospectivo, com modelo de *coorte* temporal longitudinal, utilizando 25 ratos da raça *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*) adulto, em virtude da facilidade de obtenção, baixo custo de manutenção e alta resistência à infecção. Esse estudo foi realizado no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período entre agosto a dezembro de 2012.

A pesquisa foi encaminhada ao Comitê de Ética e Pesquisa e à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu/SP. Foi elaborado um documento esclarecendo os detalhes da pesquisa respeitando todas as normas e princípios éticos em experimentação animal determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Foram incluídos neste estudo somente ratos da raça *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), em idade adulta, macho, com peso de 200 – 300 gramas.

3.2. METODOLOGIA

O delineamento experimental (Grupos experimentais) foi elaborado da seguinte maneira:

- Grupo A contendo 10 ratos e identificados com ficha azul (figura 4)
- Grupo B contendo 10 ratos e identificados com ficha amarelas (figura 5)
- Grupo C, grupo controle contendo 5 ratos e identificados com ficha cor de rosas (figura 6)



Figura 4 - identificação Grupo A



Figura 5 - identificação Grupo B



Figura 6 - identificação Grupo controle

Todos os ratos desse estudo foram sedados com Cloridrato de Cetamina com concentração de 80mg/kg, e administrado na dose de 20mg/animal. Esse medicamento foi associado com Cloridrato de Xilazina com concentração 10mg/Kg, sendo administrando na dose de 2,5 mg/animal. Para realização desse procedimento foi realizado um processo de contenção, com firmeza, porém de forma gentil, colocando-se as mãos firmemente sobre o dorso e a

caixa torácica, e a cabeça imobilizada com o polegar e o indicador, imediatamente atrás da mandíbula. O monitoramento ocorreu antes, durante e após o procedimento anestésico, que avaliou a presença ou ausência de determinados sinais como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e alterações da frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), que sofrem modificações de acordo com os planos atingidos da anestesia.(HALL *et al*, 1991)

O monitoramento dos animais ocorreu através de observação visual, quanto ao padrão respiratório, presença de secreções nasais ou oculares e diarreia, sintomas esses que podem acusar anormalidades, e desta forma retirados do procedimento.

Após ter detectado a sedação e anestesia dos animais, procedeu a realização da depilação por tração no dorso com dimensões de 5 X 5 cm. (figura 7).



Figura 7 - Depilação por tração no dorso – dimensões de 5x5 centímetros

Para obtenção da lesão foi simulado um acidente doméstico, escaldado por água quente, em seu ponto de ebulição 110°C. Após 2 horas ao acidente administrou-se Dipirona Sódica 15mg/kg a cada 6 horas via oral, e Cloridrato Tramadol 2,5mg/kg a cada 8 horas também por via oral, ambos diluídos em água, para melhor analgesia dos animais.

Todos os ratos foram submetidos a lesões térmicas e tratados como descrito na tabela 1.

Tabela1 - Classificação dos grupos segundo o tipo de tratamento.

Grupo	Tratamento
A	Tratamento convencional
B	Tratamento Gel de Plaqueta
C	Não tratado (controle)

Tratamento convencional:

Para o tratamento convencional utilizou-se pomada Kollagenase® (Cloranfenicol + Colagenase), laboratório Cristália (Reg. MS n 1.0298.0049) em dias alternados, com objetivo de promover o desbridamento das queimaduras. Esse é um medicamento cicatrizante, atuando como fibrinolítico de uso adulto com indicação para úlceras, escaras, queimaduras e feridas.

Gel de Plaquetas (*home made*):

Foram selecionadas unidades de Concentrado de Plaquetas randômicas e coletadas por aférese para a preparação do gel, bem como obtenção de trombina humana.

3.2.1. Obtenção do concentrado de plaquetas randômicas (CP)

Realizada através da coleta de bolsas de sangue total de doadores de sangue fidelizados (no mínimo 4 doações nos últimos 18 meses). Este critério foi utilizado para minimizar os efeitos de coleta de doador de sangue em janela imunológica.

Essas bolsas foram submetidas à centrifugação de 2.300 rpm em centrífuga refrigerada (22°C), por cinco minutos, obtendo-se o plasma rico em plaquetas (PRP), este é novamente centrifugado a 4.100rpm (22°C), por dez minutos. Obtém-se então, o concentrado de plaquetas com volume final de 50

a 70 ml, devendo permanecer em repouso, sob a mesma temperatura, por aproximadamente uma hora, até que ocorra a desagregação plaquetária espontânea. Esta bolsa foi processada de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Processamento de Hemocomponentes do Hemocentro de Botucatu/UNESP.

De acordo com a legislação (RDC 57 de 16/12/2010), o concentrado de plaquetas tem validade de 3 a 5 dias para fins transfusionais, dependendo do tipo de plastificante da bolsa de conservação. Findo este prazo, o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu resgata essas unidades de CP que iriam para descarte e inicia um processo de controle de qualidade dessas plaquetas com a finalidade de utilizá-las na confecção do gel.

3.2.2. Obtenção do concentrado de plaquetas por aférese (CPA)

Obtidos a partir do procedimento de coleta por Aférese (Plaqueta Aférese), utilizando *COBE Spectra Apheresis System*. Essas plaquetas são oriundas de coleta específica de doador de sangue fidelizado (no mínimo 4 doações nos últimos 18 meses). Este critério foi usado para minimizar os efeitos de coleta de doador de sangue em janelas imunológica. Esta bolsa foi processada de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Processamento de Hemocomponentes do Hemocentro de Botucatu/UNESP.

O prazo de validade e o processamento do CPA seguem os mesmos padrões do CP.

3.2.3. Controle de Qualidade dos CPs

As características dos CPS produzidos pelo Hemocentro de Botucatu são definidas por publicações científicas e pela legislação vigente para este hemocomponente, que são:

- ✓ Volume de 45 a 60mL
 - ✓ Número de plaquetas por unidade $\geq 5,5 \times 10^{10}$
 - ✓ $< 0.2 \times 10^9$ glóbulos brancos por unidade
-

- ✓ $< 1.0 \times 10^9$ glóbulos vermelhos por unidade
- ✓ $< 6.5 \times 10^8$ linfócitos por unidade
- ✓ pH 6.4 - 7.4

Com a expiração do prazo de validade para fins transfusionais, as unidades de CPs são enviadas ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu e armazenadas para congelamento a -30°C em *pools* de até 12 unidades. Esses pools recebem o rótulo de “não liberados” até que os testes de qualificação deste lote estejam finalizados. Os Testes de Qualificação da matéria prima são: Hemocultura (BactAlert®), Determinação do numero de Plaquetas e Dosagem de PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas) e VEGF (Fator de crescimento vasoendotelial).

3.2.4. Obtenção do Gel de Plaquetas

É preparado um creme-base onde são adicionadas substâncias lipossolúveis como óleos e vitaminas, importantes no processo de cicatrização e também em manter o leito da lesão hidratado. Em seguida são incorporados os princípios ativos derivados dos CPs e Trombina humana purificada. Todo esse procedimento é realizado em área limpa e câmara de fluxo laminar (Figura 8). O produto final é envasado em bisnagas estéreis de 60g (Figura 9).



Figura 8 - Produção do Gel de Plaquetas *home made* em câmara de fluxo laminar e área limpa. Fonte: Arquivo Pessoal

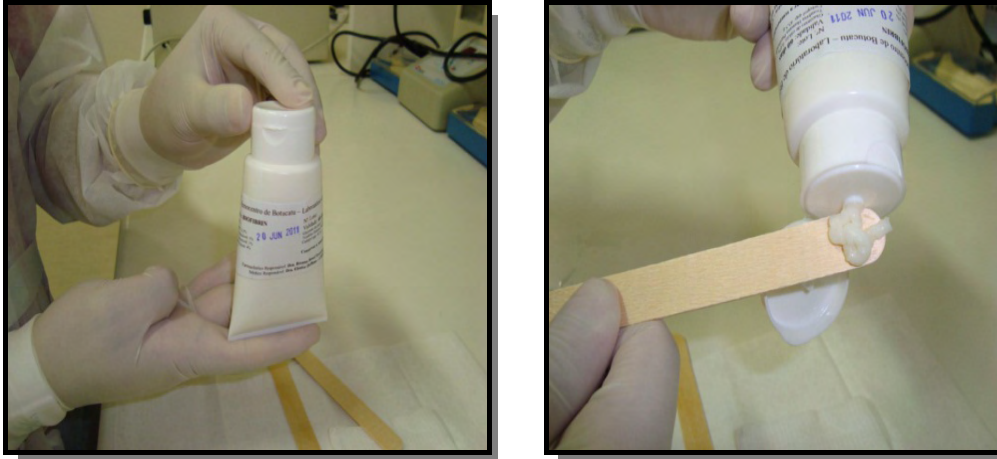


Figura 9 -Gel de Plaquetas envasado em embalagem de 60g. Fonte: Arquivo Pessoal

3.2.5. Obtenção da trombina humana

Obtida a partir da adição do Gluconato de Cálcio a 10% na proporção de 0,2mL para cada 1,0mL de soro e incubado a 37°C por 30 minutos. Extraíu-se por centrifugação o sobrenadante (trombina) e fracionado em alíquotas armazenado a -28°C.

O tratamento com gel de plaquetas foi realizado como o tratamento convencional, ou seja, utilizando o produto em dias alternados.

A aplicação do Gel de plaquetas e da pomada Kollagenase® foram monitoradas através de exames clínicos e foto documentação das áreas tratadas. O acompanhamento sequencial da cicatrização também foi realizado por foto documentação em dias alternados, totalizando 30 dias, sendo utilizados os parâmetros iniciais e avaliação da formação do novo tecido. (ANEXO 1)

3.2.6. Análise Histológica

Ao final do procedimento, os animais foram submetidos à Eutanásia, pelo método químico em câmara com gás carbônico, assegurando que o animal não passe por nenhum sofrimento. Depois de constatada a morte do animal através da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea, foi

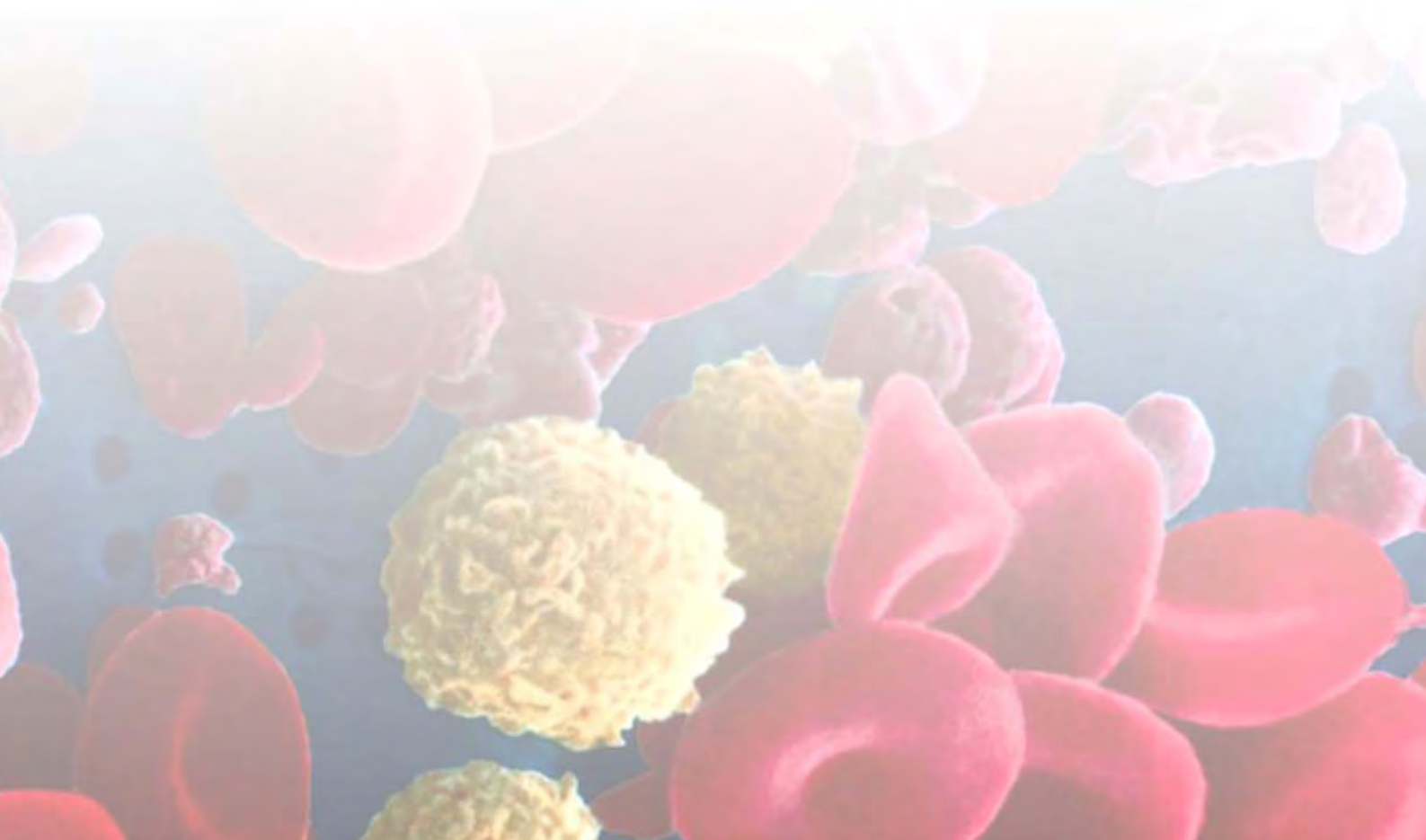
realizada a remoção da área lesada através da técnica de *punch*. A amostra foi acondicionada em frasco plástico contendo solução conservante (formol tamponado 10%) com volume aproximadamente igual a 10 vezes o volume da peça, onde permaneceu por um período igual a 24 horas.

Posteriormente, estes foram hemisseccionados, desidratados em soluções crescentes de etanol a 70, 95 e 100° GL, diafinizados em xilol e incluídos em parafina (técnica histológica convencional). Secções histológicas de 5 μ foram obtidas a partir das amostras emblocadas em parafina e posteriormente submetidas à coloração Hematoxilina/Eosina (HE) para avaliação das características do processo inflamação-reparo e epitelização visualizada em microscópio óptico *Olympus CH2*, ocular 10X-T/18L no aumento 40, 100 e 400 vezes.

3.3. Procedimentos estatísticos

Foi realizada análises estatística pelo método *Kruskal-Wallis* (análise não paramétrica) utilizando software SAEG (Sistema de Análises Estatística e Genética), 2007.

4 Resultados



Os pesos médios dos animais avaliados nesse estudo estão expressos na tabela 2:

Tabela 2 - Peso médio dos ratos da raça *Wistar* em cada grupo

Grupo A	Grupo B	Grupo C
247,0 g	247,8 g	241,4 g

4.1. Resultados Clínicos

No Grupo A, após o tratamento com Kollagenase[®], foram analisados 10 ratos os quais apresentaram eritema em todas as lesões avaliadas. As crostas foram classificadas de acordo com o acometimento das lesões e neste grupo, 30% (3/10) dos animais apresentaram crosta em 1/3 da extensão da lesão; 20% (2/10) apresentaram crosta em 2/3 da lesão; 40% (4/10) apresentaram crosta em 3/4 da extensão da lesão e 10% (1/10) não apresentaram crosta. Foi observada a presença de exsudato em 20% (2/10) dos animais desse grupo. Estes resultados estão expressos na tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação clínica das lesões do Grupo A (Kollagenase[®])

n	Eritema	Crosta	Exsudato
1	P	+++	A
2	P	+	A
3	P	+	A
4	P	+++	A
5	P	+	A
6	P	++	P
7	P	A	P
8	P	+++	A
9	P	++	A
10	P	+++	A

P: presente; A: ausente; +: crosta presente em 1/4 da lesão; ++: crosta presente em 2/4 da lesão; +++ crosta presente em 3/4 da lesão.

No Grupo B, após o tratamento com gel de plaquetas, todos os animais avaliados apresentaram eritema nas lesões observadas. As crostas foram igualmente classificadas como no Grupo A e estiveram presentes em todos os animais, diferenciando-se quanto ao grau de acometimento, sendo que 80% (8/10) dos animais apresentaram crosta em 3/4 da lesão; 10% (1/10) apresentaram crosta em 2/4 da lesão e em 10% (1/10) dos animais observou-se crosta presente em 1/3 da lesão. Não foi observada a presença de exsudato nos animais deste grupo. Estes resultados estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação clínica das lesões do Grupo B (Gel de Plaquetas)

n	Eritema	Crosta	Exsudato
1	P	+	A
2	P	+++	A
3	P	+++	A
4	P	+++	A
5	P	+++	A
6	P	+++	A
7	P	+++	A
8	P	++	A
9	P	+++	A
10	P	+++	A

P: presente; A: ausente; +: crosta presente em 1/4 da lesão; ++: crosta presente em 2/4 da lesão; +++ crosta presente em 3/4 da lesão.

No Grupo C (controle) todos os animais avaliados apresentaram eritemas nas lesões observadas. As crostas ocorreram somente em 20% (1/5) dos animais e ainda assim em 1/3 da lesão. Neste grupo, não observou a presença de exsudato. Estes resultados estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação clínica das lesões do grupo C (Controle)

N	Eritema	Crosta	Exsudato
1	P	A	A
2	P	+	A
3	P	A	A
4	P	A	A
5	P	A	A

P: presente; A: ausente; +: crosta presente em 1/4 da lesão; ++: crosta presente em 2/4 da lesão; +++ crosta presente em 3/4 da lesão.

Na análise estatística foi observada diferença significativa ($p < 0,01$) para formação de crosta entre o Grupo B (tratados com gel de plaquetas) e o Grupo C (Controle). Não foram observadas diferenças significativas para outras características.

4.2. Resultados Histopatológicos

No procedimento histológico foram analisadas as seguintes estruturas: presença de vasos sanguíneos (Tabela 6), macrófagos (Tabela 7), fibroblastos (Tabela 8), fibras colágenas (Tabela 9) e epitélio (Tabela 10).

Tabela 6 - Análise Histológica dos vasos sanguíneos

Grupos (n)	Vasos sanguíneos		
	Discreto	Moderado	Intenso
A (10)	60% (6)	20% (2)	10% (1)
B (10)	30% (3)	40% (4)	30% (3)
C (5)	ausente	80% (4)	20% (1)

Tabela 7 - Análise Histológica dos macrófagos

Grupos	Macrófago		
	Discreto	Moderado	Intenso
A (10)	30% (3)	50% (5)	20% (2)
B (10)	20% (2)	60% (6)	20% (2)
C (5)	20% (1)	80% (4)	ausente

Tabela 8 - Análise Histológica dos Fibroblastos

Grupos	Fibroblastos		
	Discreto	Moderado	Intenso
A (10)	10% (1)	70% (7)	20% (2)
B (10)	10% (1)	80% (8)	10% (1)
C (5)	20% (1)	40% (2)	40% (2)

Tabela 9 - Análise Histológica das Fibras Colágenas

Grupos	Fibras Colágenas		
	Discreto	Moderado	Intenso
A (10)	60% (6)	40% (4)	ausente
B (10)	60% (6)	20% (2)	20% (2)
C (5)	80% (4)	20% (1)	ausente

Tabela 10 - Análise Histológica do Epitélio

Grupos	Epitélio	
	Normal	Anormal
A (10)	80% (8)	20% (2)
B (10)	70% (7)	30% (3)
C (5)	60% (3)	40% (2)

A análise estatística demonstrou que não há diferença significativa entre os grupos na avaliação histopatológica.

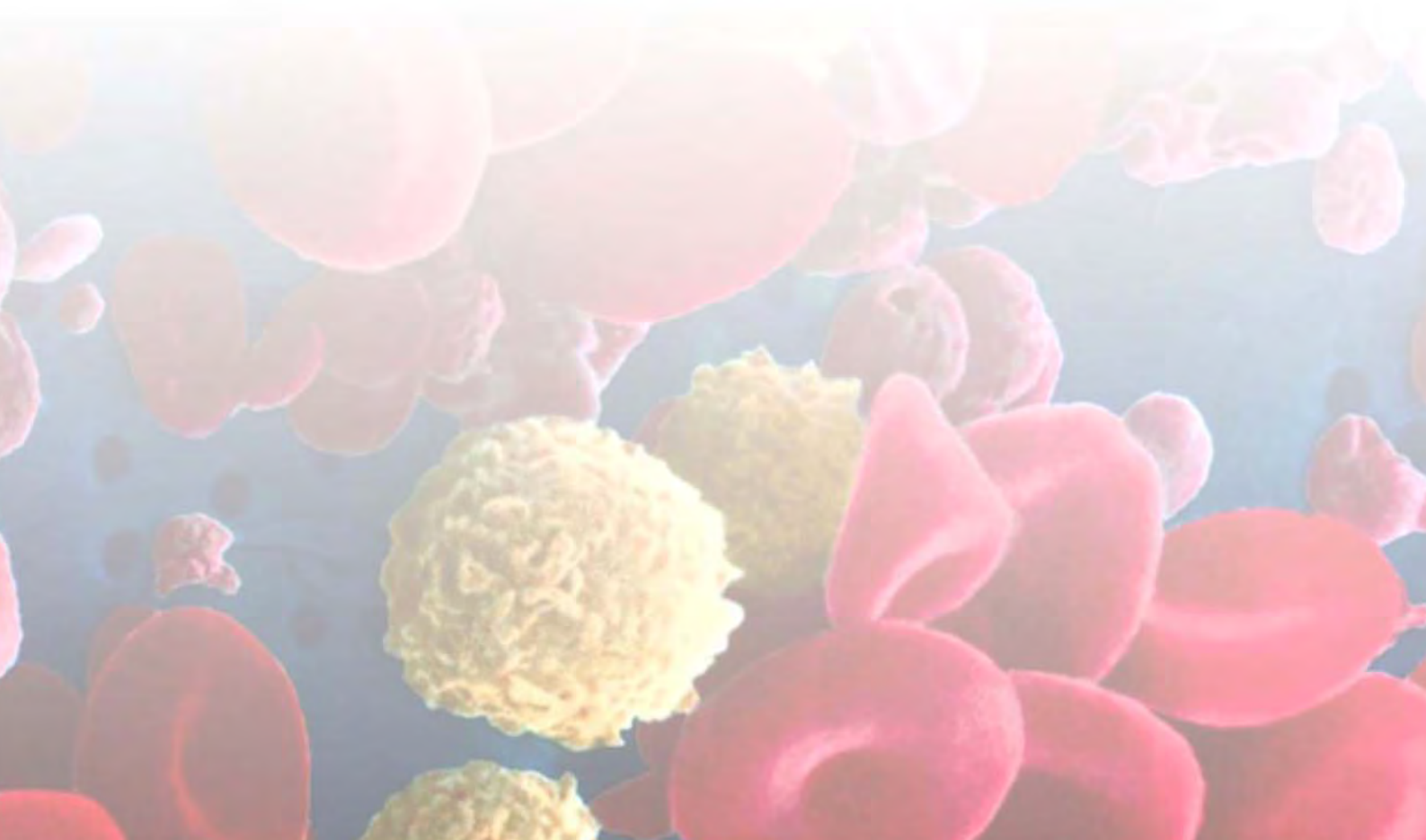
4.3. Farmacoeconomia

Seguindo a análise de custo-efetividade dos produtos objetos deste estudo, no Grupo A foi utilizado 90 gramas de Kollagenase® para o tratamento total, tendo um custo de R\$ 84,00 de acordo com a tabela Brasíndice, janeiro 2013; entretanto, no Grupo B foi utilizado 120 gramas do Gel de plaquetas, com o custo de R\$10,40 (*fonte*: Laboratório de Engenharia Celular – Hemocentro UNESP). Estes resultados estão expressos na tabela 11.

Tabela 11: Custo-efetividade da Kollagenase® X Gel de plaquetas *home made*

Produto	Quantidade	Valor
Kollagenase®	90 gramas	R\$ 84,00
Gel de plaquetas	120gramas	R\$10,40

5. Discussão



As queimaduras são um problema de saúde pública, pois trazem sequelas estéticas funcionais que comprometem a qualidade de vida do paciente. Muitas vezes esses pacientes, devido ao tratamento, são impossibilitados de trabalhar, o que gera custos para o estado.

A ciência tem a função de contribuir para minimizar estes efeitos, através de estudos que promovam uma melhor qualidade de vida para o paciente e redução de gastos por parte do estado.

Foi baseado nestes fatos, que o presente estudo foi elaborado. Para avaliarmos a ação da Kollagenase® e Gel de plaquetas *home made* sobre queimaduras de primeiro grau foi necessário estabelecer algumas variáveis para observações clínicas e histológicas.

As variáveis clínicas eritema, crosta e exsudato foram determinadas baseando-se em dados do protocolo da Sociedade Brasileiras de Cirurgia Plástica, 2008.

As variáveis histológicas macrófagos, fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e tecido epitelial foram selecionadas baseando-se na literatura (Robbins,1999), que relatam a ação dessas variáveis e seu papel no processo cicatricial.

Nos resultado clínicos observados, eritema foi uma variável que ocorreu em todos os animais dos grupos estudados. Este fato se explica devido às condições normais do processo de cicatrização no qual as células endoteliais vasculares começam a proliferar para formar um tipo de tecido especializado chamado de tecido de granulação. Este tecido é um importante indicador da cicatrização. (Robbins,1999; Mandelbaum *et al*, 2003; Andrade *et al*, 2010). Segundo Balbino *et al*, 2005, os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento, são ativados e migram das margens da lesão para o centro. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte (Balbino *et al*, 2005).

De acordo com a literatura, a crosta tem uma importante função de isolar a ferida do meio externo, prevenindo a penetração de agentes infecciosos. A formação da crosta ocorre pela liberação do exsudato filtrado, aparecendo na superfície da pele (Silva, 2006). Com a evolução do processo inflamatório na lesão, a matriz extracelular, que inicialmente era composta por proteínas plasmáticas e plaquetas, também se modifica passando a ser composta por fibroblastos e vasos neoformados. Os fibroblastos locais passam a produzir grandes quantidades de fibronectina, colágeno, aumentando também a síntese de proteoglicanas e glicosaminoglicanas. Este conjunto de substâncias confere à área lesionada uma camada cruenta conhecida por crosta. Esta camada é o microambiente ideal e protetor para a movimentação celular, atuação dos fatores de crescimento, proliferação celular e indução da angiogênese (Peacock, 1984; Balbino *et al*, 2005).

Os resultados mostram que os animais do grupo B apresentaram crostas maiores em relação aos animais dos grupos A e C, havendo diferença significativa ($p < 0,01$), para formação de crosta entre o Grupo B (tratados com gel de plaquetas) e o Grupo C (Controle). Isso sugere que o tratamento com um composto bioativo como o Gel de Plaquetas *home made* rico em fatores de crescimento como TGF- β , PDGF e EGF poderia ter estimulado a migração de macrófagos e fibroblastos das margens da ferida para o seu centro, resultado assim na intensa formação da crosta visualizada. A Tabela 8 mostra que 80% dos animais do Grupo B apresentaram quantidades moderadas de fibroblastos na análise histológica.

O exsudato é um fluido que também está presente no processo inflamatório. Entretanto, se o exsudato tem características purulentas, é possível que haja contaminações por microorganismos. Neste estudo, a presença de exsudato ocorreu somente em 2 animais do grupo A, e mesmo assim em proporções mínimas. Este fato nos mostra que o processo cicatricial aconteceu independente do medicamento utilizado ou sem a utilização do medicamento.

A angiogênese é etapa fundamental do processo de cicatrização, na qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes (Folkman, 1992). Em resposta à lesão tecidual, a angiogênese é processo dinâmico, finamente regulado por sinais presentes tanto no soro quanto na matriz extracelular local (Risau, 1997). Durante o processo cicatricial, a formação de novos vasos sanguíneos torna-se necessária para a formação do novo tecido de granulação, correspondendo às células dos vasos sanguíneos a cerca de 60% do tecido de reparo. (Arnold, 1991)

Na análise histológica dos vasos sanguíneos, o grupo controle apresentou um grande número de vasos sanguíneos no processo final da cicatrização em comparação com os animais dos outros grupos, porém sem diferenças estatísticas significantes. Este fato nos mostra que no grupo controle, o processo de cicatrização necessitou de uma demanda maior de angiogênese para a formação do tecido de granulação.

Os monócitos do sangue periférico infiltraram-se no local da ferida tanto inicialmente quanto durante o transcorrer do processo cicatricial. Essa infiltração ocorre em resposta a agentes quimiotáticos, como por exemplo, o PDGF. A liberação dos fatores provenientes das plaquetas, assim como a fagocitose dos componentes celulares, como fibronectina ou colágeno, contribui também para a ativação dos monócitos, transformando-os em macrófagos que são as principais células envolvidas no controle do processo de reparo (Balls, 1994; Carter, *et al*, 2003).

O macrófago ativado é a principal célula efetora do processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas. Além desse papel na fagocitose de fragmentos celulares, os macrófagos também secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos microvasos. (Kierszenbaum, 2004, Clark, 1996 Singer, 1999) Os macrófagos produzem vários fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- β , o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o

VEGF, que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação (Singer, 1999)

Em nossa análise histológica, os macrófagos apareceram moderadamente nos 3 grupos estudados, o que nos sugere que a migração dessas células acontecem independentemente do uso de medicamentos sobre as áreas queimadas.

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (Junqueira & Carneiro, 2004). Os fibroblastos são estimulados a produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização (Kierszenbaum, 2004).

No presente estudo, a análise de fibroblastos foi feita no 30º dia e a quantidade de fibroblastos encontrada apresentou-se moderada nos 3 grupos analisados, sem diferenças estatísticas significantes, não havendo relação com o uso de medicamentos sobre as lesões.

O fibroblasto produz a substância fundamental amorfa-mucopolissacarídeos envolvidos com a produção e orientação das fibras colágenas bem como o tamanho dessas fibras e a síntese propriamente de colágeno (Junqueira & Carneiro, 2004).

À exceção dos ferimentos que atingem apenas superficialmente a epiderme, todos os demais serão repostos pela formação de tecido conjuntivo fibroso, que é constituído na sua totalidade por fibras colágenas (Aun, 1995).

As primeiras fibras colágenas surgem em quatro a cinco dias. No início da fase proliferativa, a síntese e a lise de colágeno se dão simultaneamente. Qualquer intensificação da lise ou atraso ou diminuição da síntese podem causar a deiscência de uma ferida ou anastomose. (Hunt, 1993.)

O colágeno é o responsável pela força e integridade de todos os tecidos, sendo que a força e a integridade do tecido de reparação reside no tipo e na quantidade de fibras colágenas (Kleiman, *et al* 1995)

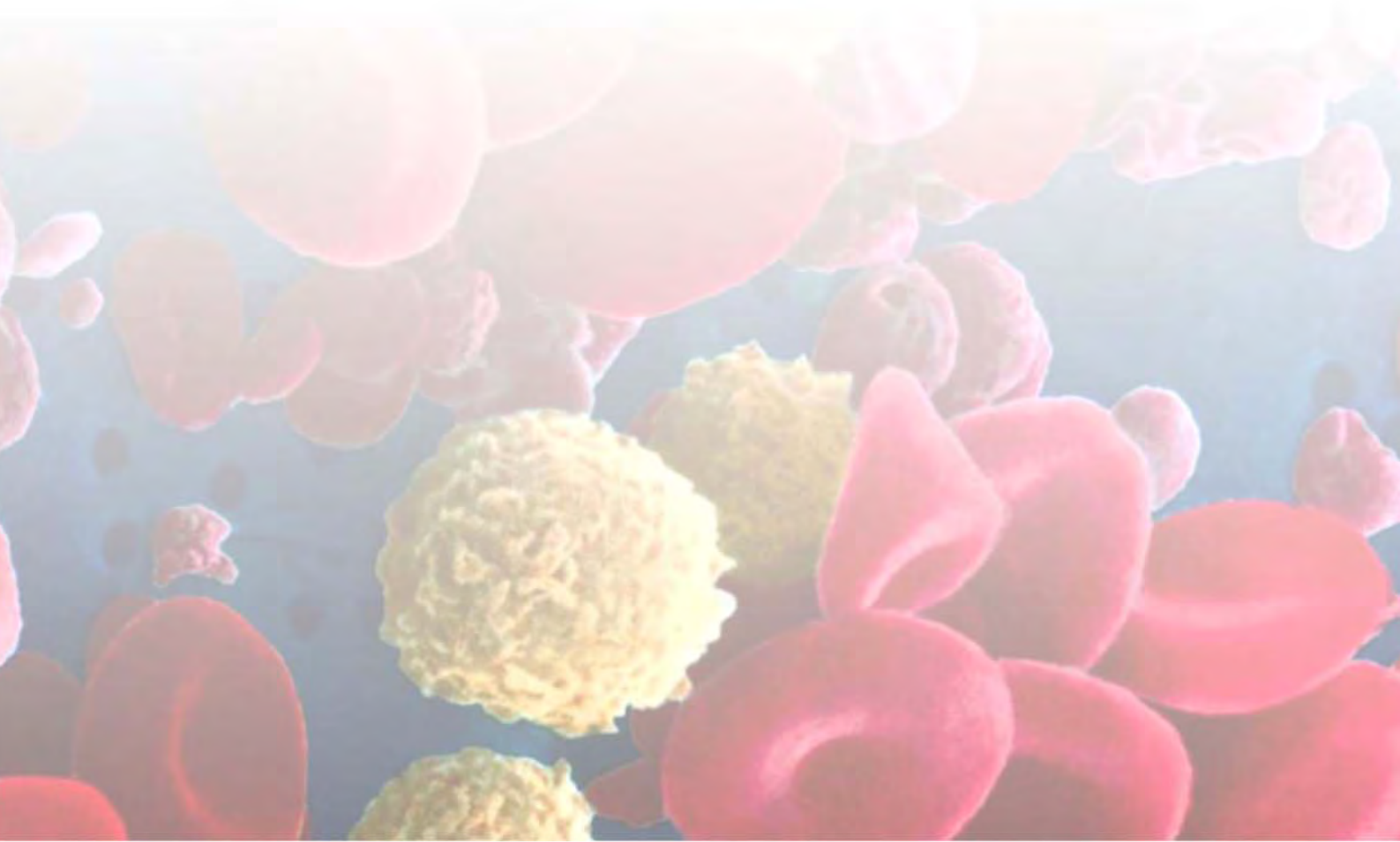
Em nossa avaliação, as fibras colágenas apresentaram-se discretas na maioria dos animais dos 3 grupos, o que nos indica a formação de um tecido de granulação ainda imaturo, principalmente nos animais do grupo C. Apesar destes resultados mostrados na Tabela 9, a formação de crosta foi estatisticamente significativa nos animais do Grupo B (Tabela 4)

A reepitelização é o recobrimento da ferida por novo epitélio e consiste tanto na migração quanto na proliferação dos queratinócitos a partir da periferia da lesão. É importante por reestruturar as funções da epiderme que foram perdidas com a ocorrência da lesão: proteção mecânica, regulação da temperatura local, defesa contra microorganismos e barreira hídrica (Kierszenbaum, 2004).

No presente trabalho, na análise histológica, houve a formação completa do epitélio, principalmente no grupo A. Os resultados histológicos obtidos neste trabalho se equiparam aos dados da literatura relatado por Lange *et al* 2003, onde observaram epitelização quase completa, reação inflamatória aguda praticamente ausente, fibroblastos jovens e vasos sanguíneos amadurecidos, deposição de fibras colágenas e discreto infiltrado de macrófagos e linfócitos. Neste mesmo estudo, no grupo não tratado ocorreram infiltrados moderadamente acentuados de macrófagos e linfócitos, vasos sanguíneos de maior calibre, porém em menor número, presença de tecido conjuntivo frouxo e discreta presença de fibras colágenas.

Em relação à Farmacoeconomia, podemos concluir que diante dos resultados obtidos, o Gel de plaquetas apresentou um custo 8 vezes menor que a pomada Kolagenase®. Em relação à efetividade do tratamento, nas condições experimentais estudadas, não foram observadas diferenças significativas entre eles, exceção observada no grupo de animais tratados com o Gel de Plaquetas em relação à formação de crostas. Este fato nos mostra que o tratamento das queimaduras com o Gel de plaquetas pode impactar economicamente os sistemas de saúde público e privado. Desta forma, o número de pacientes assistidos pode ser maior, com menor custo financeiro e a mesma efetividade.

6. Conclusão



A eficácia da Kolagenase® e do Gel de plaquetas *home made* em lesões causadas por queimaduras em ratos tiveram resultados clínicos e histológicos compatíveis e semelhantes.

O grupo controle apresentou resultados satisfatórios, entretanto houve um maior gasto energético e tempo maior de cicatrização.

O gel de plaquetas apresentou um melhor custo efetividade em relação à pomada Kolagenas

The background of the page features a microscopic view of various cells. Numerous pink, biconcave disc-shaped cells, characteristic of red blood cells, are scattered across the lower half of the image. Interspersed among them are several bright yellow, spherical cells with a granular or textured surface, likely representing white blood cells or platelets. The overall lighting is soft, with a gradient from white at the top to a light blue/purple at the bottom where the cells are concentrated.

7. Referências Bibliográficas

1. ANDRADE, AG; LIMA, C.F., ALBUQUERQUE, A.K.B. **Rev. Bras. Queimaduras**. 2010; 9(1):21-30.
2. ARNOLD, F.; WEST, D.C. **Angiogenesis in wound healing. Pharmacol Ther.** 1991;52:407-22.
3. AUN, F. **Problemas clínicos em pacientes cirúrgicos**. In AUN, F. & BEVILACQUA, R.G. - Manual de cirurgia. 1 ed. São Paulo, E.P.U., 1995. p.147-51.
4. BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos Envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n 1, jan / mar 2005.
5. BALLS, M. **Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing**. Laboratory Animals, v.28, p.193-211, 1994.
6. BARBIERI, C.M.O. et.al. **Fator de crescimento derivado de plaquetas humanas obtidas por uma metodologia rápida e de baixo custo**. Rev. Ciênc. Farm. Araraquara, v.25, n2, p.129-134, 2004
7. BISSON, M.P. **Farmácia Clínica & Atenção Farmacêutica**. 2 ed, Baureri, SP, Manole 2007.
8. BLANES, L. **Tratamento de feridas**. Baptista-Silva JCC, editor. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: 2004. Disponível em: URL:<<http://www.bapbaptista.com>> acesso em 19 dez. 2012.
9. BOOTMAN, J.L.; TOWNSEND, R.J.; MCGHANWF. **Introducion to pharmacoeconomics**. 2 ed Cincinnati, Harvey Whitney, 1996.
10. BRIGHAM, P.A.; MCLOUGHLIN, E.; BURN. **Incidence and medical care use in the United States: estimates, trends, and data sources**. J Burn Care Rehabil, 1996, 17(2):95–107.
11. CARTER, C. A. *et al.* **Platelet – rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing**. Experimental and Molecular Pathology, v.74, p. 244 – 255, 2003.

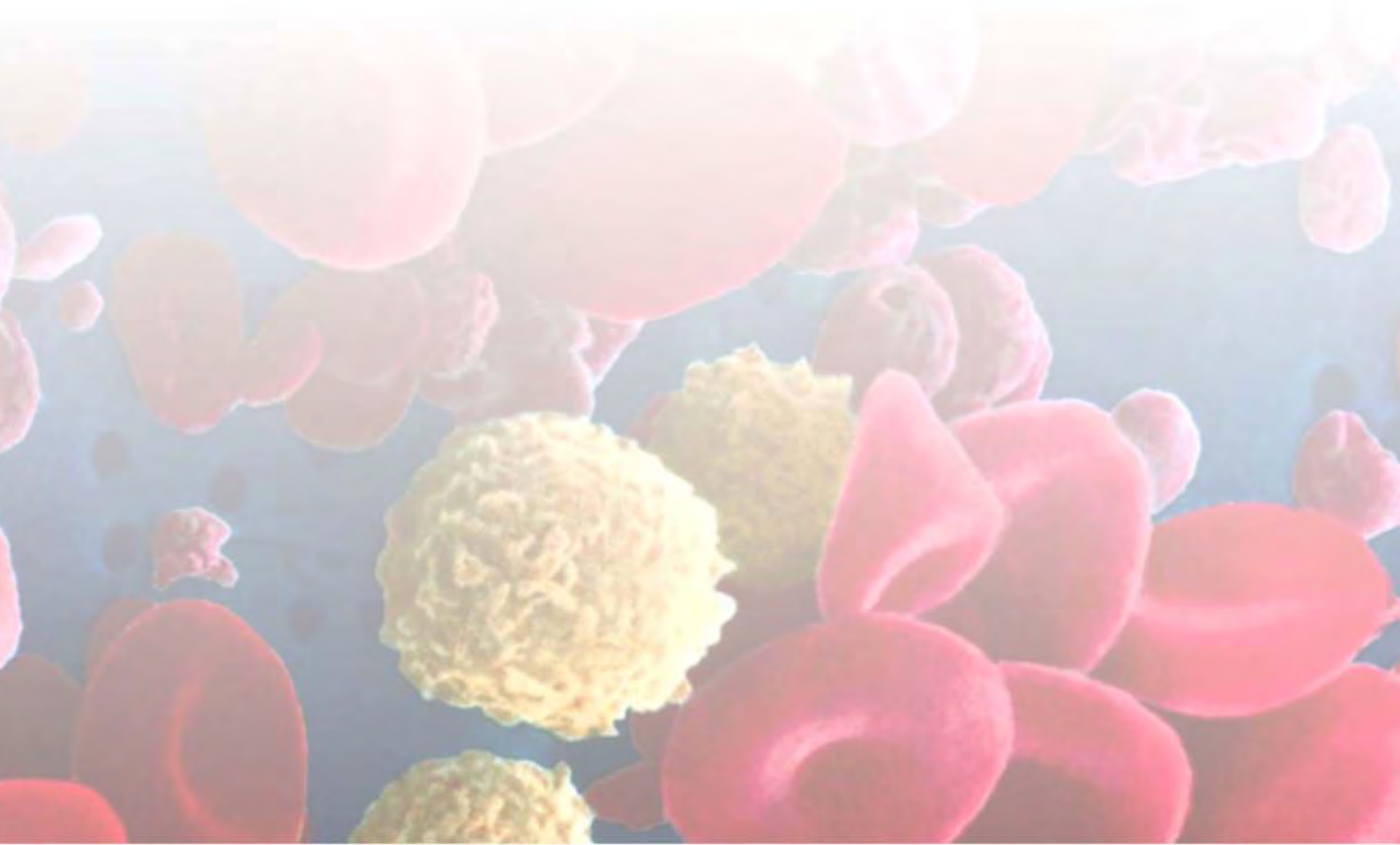
-
12. CARVALHO, P.T.C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos**. 2002. 72p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo.
 13. CLARK, R.A. **The molecular and cellular biology wound repair**. 2nd ed. **New York**: Plenum Press; 1996.
 14. COCHRAN, W. **Sampling Techniques**, 3 edição, Neu York: John Wiley, 1977. 448p
 15. CRAMER, J.A.; SPILKER, B. **Quality of life and pharmacoeconomics an introduction**. New York, Lippincott-Raven, 1998.
 16. CRISOSTEMO, M.R.; SERRA, M.C.V.F.; GOMES, D.R. Epidemiologia das queimaduras. In: MACIEL E, SERRA MC. **Tratado de queimaduras**. São Paulo: Editora Revinter, cap.5, p31-35, 2004.
 17. CROVETTI, G. et.al. **Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds**. Transfusion and Aphaeresis Science. v. 30, p. 145-151, 2004.
 18. EMING, S.A.; WERNER, S.; BUGNON, P.; WICKENHAUSER, C.; SIEWE, L.; UTERMÖHLEN, O., et al. **Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10**. Am J Pathol.2007;170:188-202
 19. FALABELLA, AF. **Debridement and wound bed preparation**. DermatolTher. 2006.
 20. FLECKNELL, P.A. **Refinement of animal use – assessment and alleviation of pain and distress**. *Laboratory Animals*, v.28, p.222-231, 1994. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH 80-23).
 21. FOLKMAN, J.; SHING, Y. **Angiogenesis**. J Biol Chem.1992;267:10931-4
 22. FOLLAND, S.; GOODMAN, A.C.; STANO, M. **The Economics of health and Health care**. 2 ed. Upper Saddle River, Prentice – Hall, 1997.
 23. GOMES, D.R.; GUIMARÃES, J.R. et al. **Condutas Atuais em queimaduras**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
 24. GREENHALGH, D.G. The role of apoptosis in wound healing. **International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, n.9, p.1019-1030, 1998.
-

-
25. HALL, L.W.; CLARKE, K.W. **Veterinary anaesthesia**. 9ed. London: BallièreTindall, 1991. 410p.
 26. HUNT, T.K. & GOODSON, W.H. - **Cicatrização das feridas**. In WAY, L. W. - **Cirurgia Diagnóstico e Tratamento**. 9 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993. p.67-75.
 27. IRION, GLENN, Feridas Nova Abordagens, Manejo Clínico e Atlas em Cores. **Tratamento de Queimaduras**, p 297-317, 2005.
 28. JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. – **Tecidos conjuntivos**. In JUNQUEIRA E CARNEIRO - **Histologia Básica**. 7 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1993. p 65-87.
 29. KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p.319-39
 30. KLEIMAN, I.; SIMÕES, M.J.; GOLDENBERG, S. - **Aspectos atuais do processo de reparação tecidual**. Acta Cir. Bras., 10:2-8, 1995.
 31. KRUG, E.G.; DAHLBERG, L.L.; MERCY, J.A. **Relatorio Mundial sobre Violencia e Saude**. Genebra: Organizaçao Mundial de SAude, 2002
 32. LANGE, F.; KROTH, A.; STEFFANI, J.A.; LORENCETTI, N. **Influência da laserterapia no processo cicatricial de queimaduras de terceiro grau**. Fisioter Bras.2003;4(5):335-40.
 33. LIMA JUNIOR, E.M.; NOVAES, F.L.; PICCOLO, N.S.; SERRA, M.C.V. **Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo**, 2º ed, São Paulo, Editora Atheneu, 2008.
 34. MALAGUTTI, W. **Curativo, estomias e dermatologia: uma abordagem multiprofissional**, São Paulo: Martinari, 2010
 35. MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. **Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares**. **Anbras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, jul/ago. 2003.
 36. MEDEIROS, A.C. *et al.* **Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico**. Acta Cirúrgica Brasileira.São Paulo. v.14 n.4 out./dez. 1999.
 37. PEACOCK JR, E.E. The wound repair. Philadelphia:WB Saunders,1984. p.76-85.
-

-
38. PENN, J.W.; GROBBELAAR, A.O.; ROLFE, K.J. **The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review**, *Int J Burns Trauma*, 2012, 2(1):18–28.
 39. RICHARD, R.L.; STALEY, M.J. **burn Care and rehabilitation: Principles and Practice**. Philadelphia, PA: Fa Davis; 1994.
 40. RISAU, W. **Mechanisms of angiogenesis**. *Nature*.1997;386:671-4
 41. ROBBINS AND CONTRAM. **Pathologic bases of disease**, 7th ed, Ed R, Revista ,1999
 42. ROSS, R. *et al.* **A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro***.*Proc.Nat.Acad. Sci.USA*, v. 71, n. 4, p. 1207 –1210, abr. 1974.
 43. SAEG– **Sistema para análise estatística e genética**, versão 9.1. Viçosa: UFV, 2007.
 44. SERRA, M.C.V.F; GOMES, D.R.; CRISOSTOMO, M.R. *Fisiologia e Fisiopatologia*. In: MACIEL, E.; SERRA, M.C. **Tratado de queimaduras**. São Paulo: Editora Revinter, cap. 6, p37-42, 2004.
 45. SILVA, H.T.S.; ALMEIDA, J.S.; SOUZA, S.I.F.; COSTA, I.M.P. **Queimaduras: um estudo de caso na unidade de tratamento de queimados do hospital público do oeste, em Barreiras - BA**. *Rev Digital PesqConquerFac São Francisco de Barreiras*. 2008; 30(3).
 46. SILVA, V.C.C. **O efeito do Laser de Baixa potencia (658 nm) na reparação tecidual de queimadura de Terceito Grau em ratos Wistar**. São Jose dos campos, UNIVAP, 2006.
 47. SINGER, A.J.; CLARK, R.A. **Cutaneous wound healing**. *N Engl J Med*. 1999;341:738-46.
 48. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA PLÁSTICA. **Queimaduras: Diagnostico e Tratamento Inicial**, p 3-4; 2008
 49. VALE, E.C.S.; **Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista**. *An. Bras.Dermatol.* v. 80, n. 1, p. 9 –19, 2005.
 50. ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**, 5º edição, New Jersey: Prontice-Hall, 2009. 994p.
-

51. ZHANG, X.; WEI, X.; LIU, L.; MARTI, G.P.; GHANAMAH, M.S.; ARSHAD, M.J.; STROM, L.; SPENCE, R.; JENG, J.; MILNER, S.; HARMON, J.W.; SEMENZA, G.L. **Association of increasing burn severity in mice with delayed mobilization of circulating angiogenic cells**, Arch Surg, 2010, 145(3):259–266

Anexos



RATO 01

COLAGENASE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº A

Grupo nº 01 Caixa nº 01

Tratamento: COLAGENASE

Espécime Animal: RATO

Quant. 1 Sexo ♂

Dir. Estudo:

Data início 05/11/12

Obs:

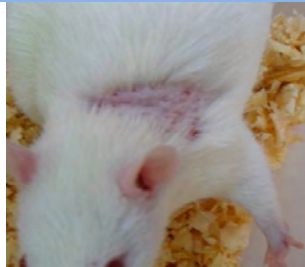
08/11/2012



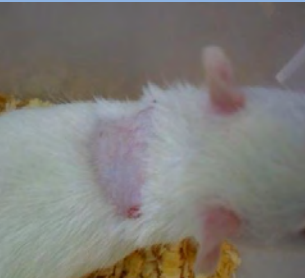
10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº B

Grupo nº 02 Caixa nº 01

Tratamento: GEL DE PLAQUETAS

Espécime Animal: RATO

Quant. 1 Sexo ♂

Dir. Estudo:

Data início 05/11/12

Obs:

08/11/2012



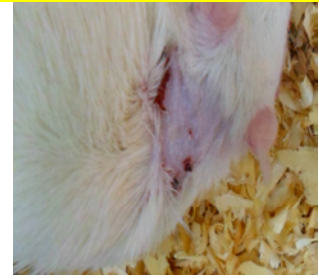
10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



CONTROLE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº C

Grupo nº 03 Caixa nº 01

Tratamento: CONTROLE

Espécime Animal: RATO

Quant. 1 Sexo ♂

Dir. Estudo:

Data início 05/11/2012

Obs:

08/11/2012



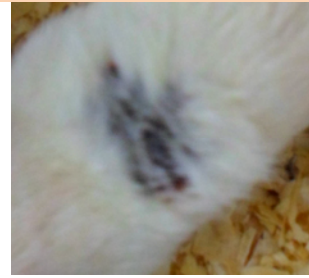
10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



RATO 01

COLAGENASE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



GEL DE PLAQUETAS
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



CONTROLE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012

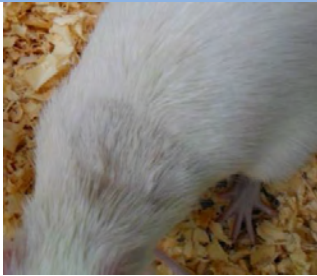


24/11/2012



RATO 01

COLAGENASE
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



GEL DE PLAQUETAS
26/11/2012



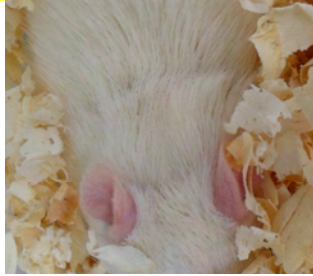
28/11/2012



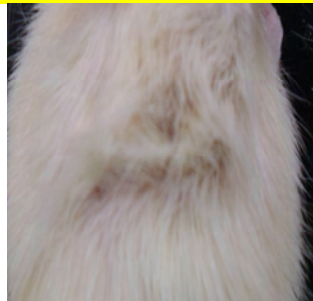
30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



CONTROLE
26/11/2012



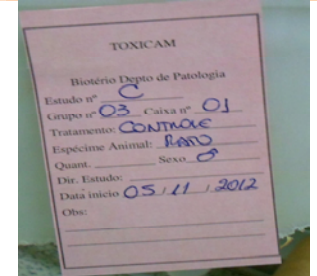
28/11/2012



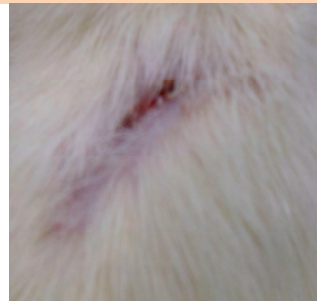
30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº C

Grupo nº 03 Caixa nº 01

Tratamento: CONTROLE

Especime Animal: RATO

Quant. 1 Sexo ♂

Dir. Estudo: 05/11/2012

Data início: 05/11/2012

Obs:

RATO 02

COLAGENASE

TOXICAM

Histórico Depto de Patologia

Estado nº _____ Caixa nº 02

Tratamento: Gel Plaquetas

Exatidão Animal: _____

Quant: _____ Sexo: _____

Dir. Médico: _____

Data Início: _____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

TOXICAM

Histórico Depto de Patologia

Estado nº _____ Caixa nº 02

Tratamento: Gel Plaquetas

Exatidão Animal: _____

Quant: _____ Sexo: _____

Dir. Médico: _____

Data Início: _____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



CONTROLE

TOXICAM

Histórico Depto de Patologia

Estado nº _____ Caixa nº 02

Tratamento: Controle

Exatidão Animal: _____

Quant: _____ Sexo: _____

Dir. Médico: _____

Data Início: _____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



RATO 02

COLAGENASE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



GEL DE PLAQUETAS
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



CONTROLE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



RATO 02

COLAGENASE
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



GEL DE PLAQUETAS
26/11/2012



28/11/2012



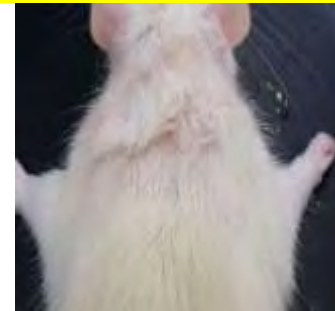
30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



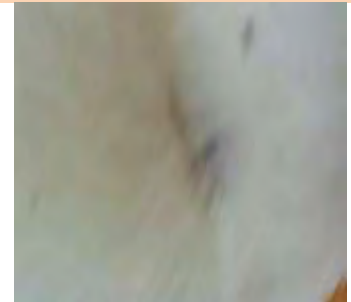
CONTROLE
26/11/2012



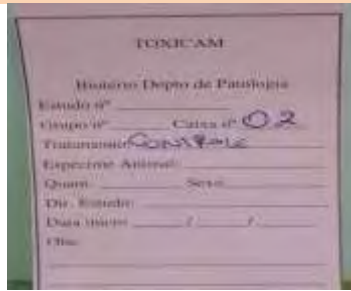
28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



RATO 03

COLAGENASE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estudo nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 03

Tratamento: COLAGENASE

Espécime Animal: _____

Quant. _____ Sexo _____

Dir. Estudo: _____

Data início: ____/____/____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estudo nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 03

Tratamento: GEL PLAQUETA

Espécime Animal: _____

Quant. _____ Sexo _____

Dir. Estudo: _____

Data início: ____/____/____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



CONTROLE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estudo nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 03

Tratamento: CONTROLE

Espécime Animal: _____

Quant. _____ Sexo _____

Dir. Estudo: _____

Data início: ____/____/____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



RATO 03

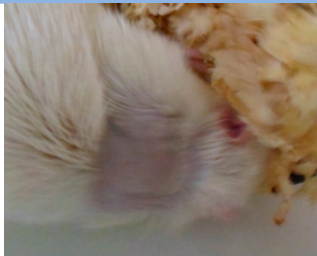
COLAGENASE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



GEL DE PLAQUETAS
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



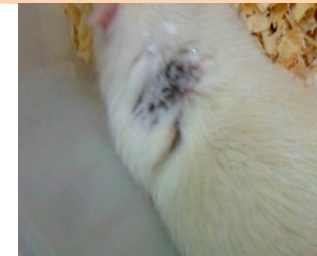
CONTROLE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012

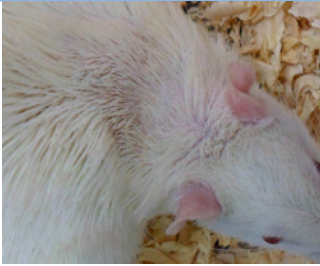


24/11/2012



RATO 03

COLAGENASE
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



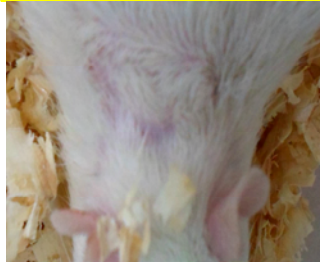
02/12/2012



05/12/2012



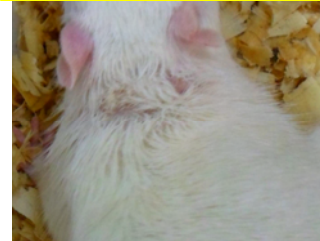
GEL DE PLAQUETAS
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



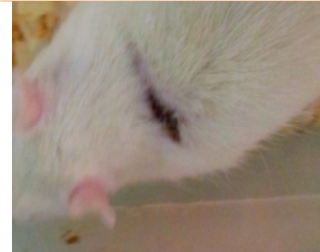
05/12/2012



CONTROLE
26/11/2012



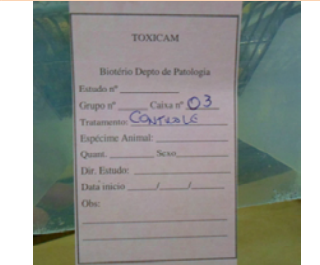
28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº

Grupo nº

Caixa nº

Tratamento

Especie Animal

Quant.

Sexo

Dir. Estudo

Data inicio

Obs:

03

CONTROLE

RATO 04

COLAGENASE

TOXICAM

Histórico Depto de Patologia

Estado nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 04

Tratamiento: Gel Bacterina

Especie Animal: _____

Quant: _____ Sexo: _____

Dir. Estado: _____

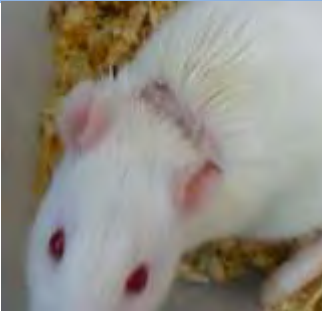
Data Inicio: _____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

TOXICAM

Histórico Depto de Patologia

Estado nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 04

Tratamiento: Gel de Plaquetas

Especie Animal: _____

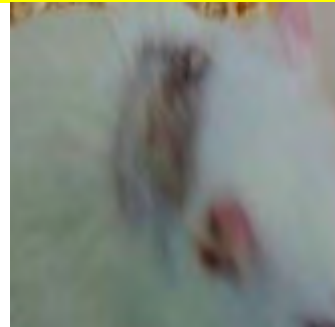
Quant: _____ Sexo: _____

Dir. Estado: _____

Data Inicio: _____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



CONTROLE

TOXICAM

Histórico Depto de Patologia

Estado nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 04

Tratamiento: Controle

Especie Animal: _____

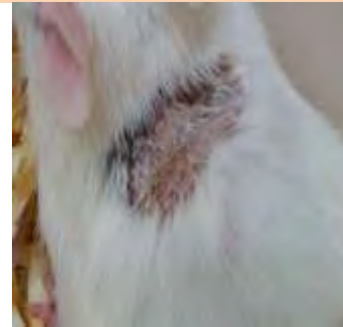
Quant: _____ Sexo: _____

Dir. Estado: _____

Data Inicio: _____

Obs: _____

08/11/2012



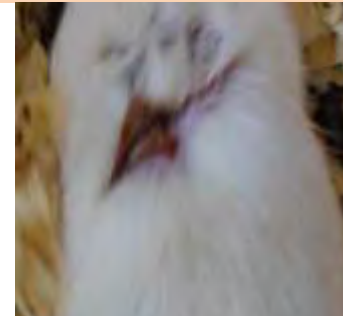
10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



RATO 04

COLAGENASE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



GEL DE PLAQUETAS
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



CONTROLE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



RATO 02

COLAGENASE
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



GEL DE PLAQUETAS
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



CONTROLE
26/11/2012



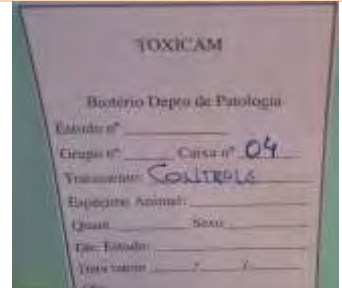
28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



TOXICAM

Biotério Departamento de Patologia

Calendário nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 04

Tratamento: Controle

Especie Animal: _____

Sexo: _____

Idade: _____

Data de Nascimento: _____

Data de Entrada: _____

Data de Saída: _____

Observações: _____

RATO 05

COLAGENASE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 05

Tratamento: Colagenase

Suplemento Alimentar: _____

Quantidade: _____

Data: _____

Nome: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 05

Tratamento: Gel de Plaquetas

Suplemento Alimentar: _____

Quantidade: _____

Data: _____

Nome: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



CONTROLE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 05

Tratamento: Controle

Suplemento Alimentar: _____

Quantidade: _____

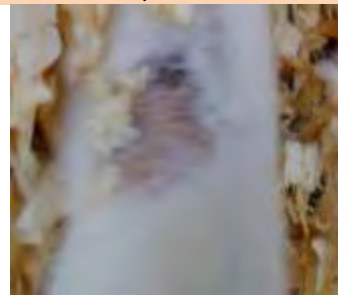
Data: _____

Nome: _____

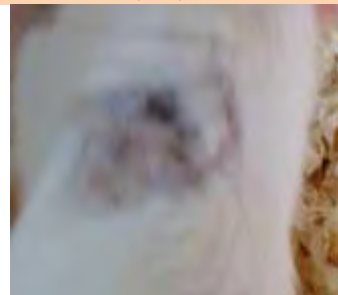
08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



RATO 05

COLAGENASE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



GEL DE PLAQUETAS
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



CONTROLE
16/11/2012



18/11/2012



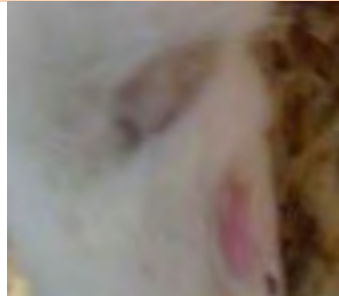
20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



RATO 05

COLAGENASE
26/11/2012



28/112012

GEL DE PLAQUETAS
26/11/2012



28/112012

CONTROLE
26/11/2012



28/112012

30/11/2012

30/11/2012



30/11/2012



02/12/2012

02/12/2012

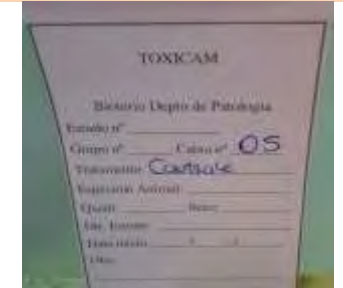
02/12/2012



05/12/2012



05/12/2012



05/12/2012



RATO 06

COLAGENASE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estudo nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 06

Tratamento: COLAGENASE

Espécime Animal: _____

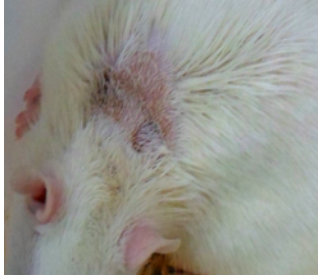
Quant. _____ Sexo _____

Dir. Estudo: _____

Data início: ____/____/____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estudo nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 06

Tratamento: GEL PLAQUETA

Espécime Animal: _____

Quant. _____ Sexo _____

Dir. Estudo: _____

Data início: ____/____/____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012

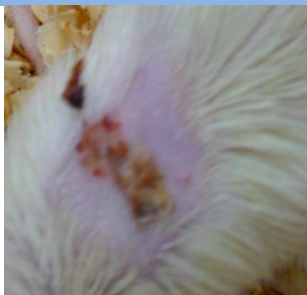


14/11/2012



RATO 06

COLAGENASE
16/11/2012



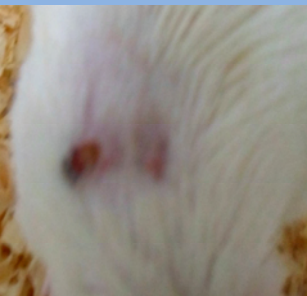
18/11/2012



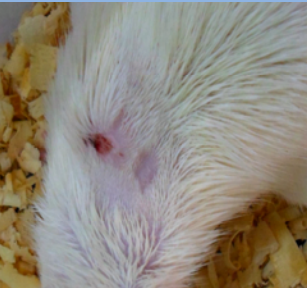
20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



GEL DE PLAQUETAS
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012

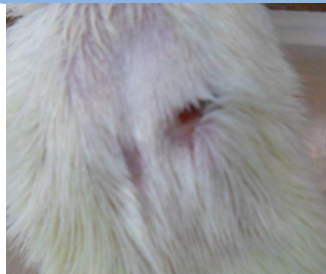


24/11/2012

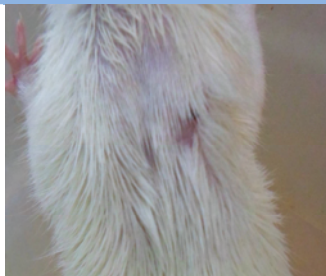


RATO 06

COLAGENASE
26/11/2012



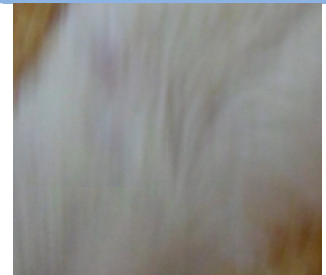
28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



GEL DE PLAQUETAS
26/11/2012



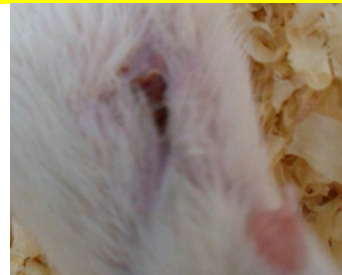
28/11/2012



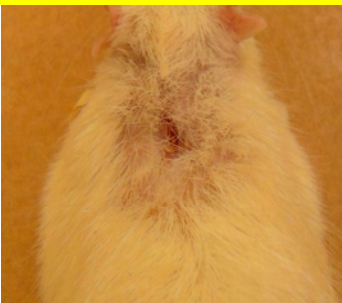
30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



RATO 07

COLAGENASE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 07

Tratamento: Colagenase

Espécie Animal: _____

Quant. _____ Sexo: _____

Dir. Estudo: _____

Data início: ____/____/____

Obs: _____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estado nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 07

Tratamento: Gel de Plaquetas

Espécie Animal: _____

Quant. _____ Sexo: _____

Dir. Estudo: _____

Data início: ____/____/____

Obs: _____

08/11/2012



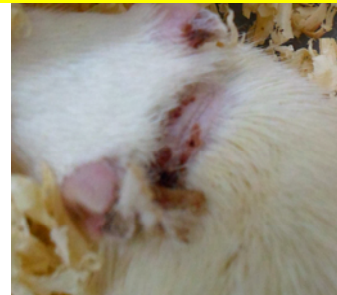
10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



RATO 07

COLAGENASE
16/11/2012



18/112012



20/11/2012



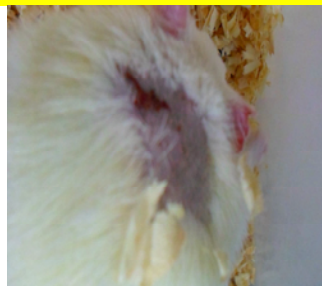
22/11/2012



24/11/2012



GEL DE PLAQUETAS
16/11/2012



18/112012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



RATO 07

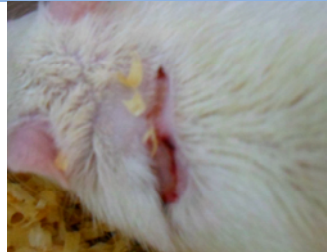
COLAGENASE
26/11/2012



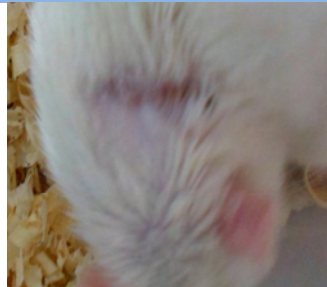
28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



GEL DE PLAQUETAS
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



RATO 08

COLAGENASE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estudo nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 08

Tratamento: COLAGENASE

Espécime Animal: _____

Quant. _____ Sexo _____

Dir. Estudo: _____

Data início: ____/____/____

Obs: _____

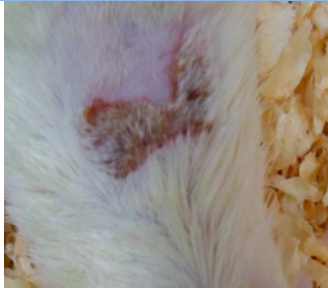
08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estudo nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 08

Tratamento: GEL PLAQUETAS

Espécime Animal: _____

Quant. _____ Sexo _____

Dir. Estudo: _____

Data início: ____/____/____

Obs: _____

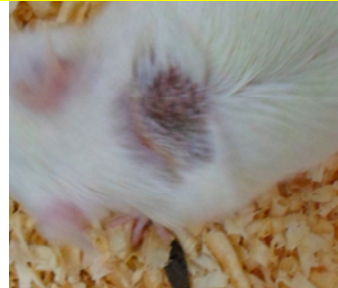
08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012

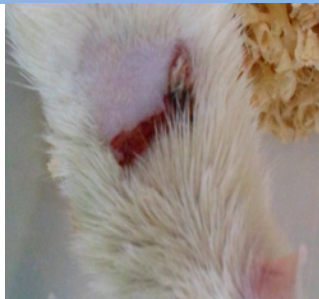


14/11/2012

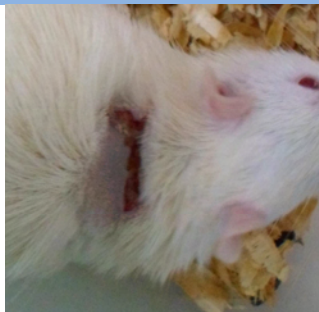


RATO 08

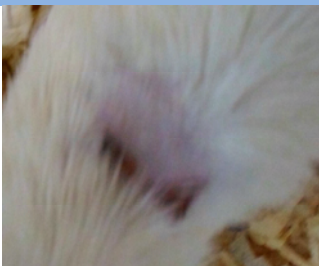
COLAGENASE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



GEL DE PLAQUETAS
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



RATO 08

COLAGENASE
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



GEL DE PLAQUETAS
26/11/2012



28/11/2012



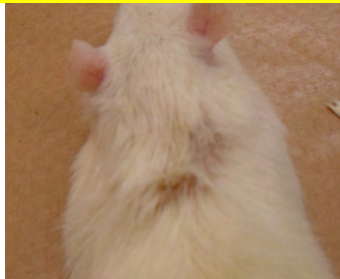
30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



RATO 09

COLAGENASE

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estudo nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 09

Tratamento: COLAGENASE

Especíme Animal: _____

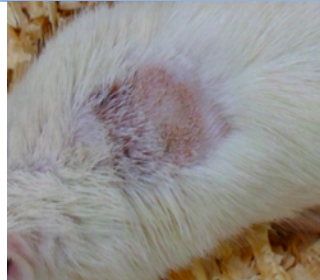
Quant. _____ Sexo _____

Dir. Estudo: _____

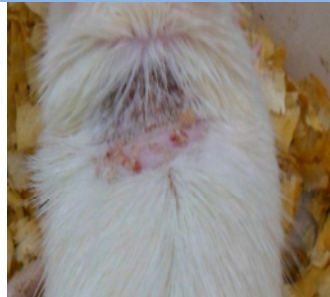
Data início ____/____/____

Obs: _____

08/11/2012



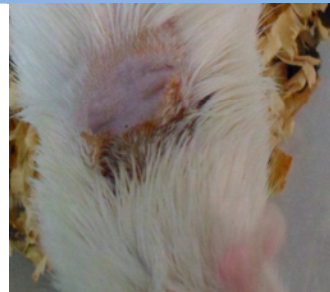
10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

TOXICAM

Biotério Depto de Patologia

Estudo nº _____

Grupo nº _____ Caixa nº 09

Tratamento: Gel Plaquetas

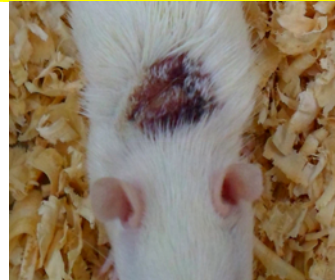
Especíme Animal: _____

Quant. _____ Sexo _____

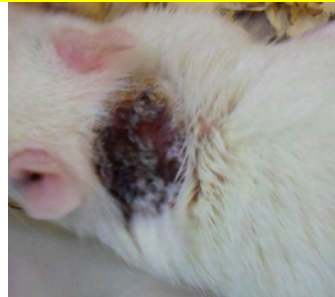
Dir. Estudo: _____

Data início ____/____/____

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



RATO 10

COLAGENASE

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



GEL DE PLAQUETAS

08/11/2012



10/11/2012



12/11/2012



14/11/2012



RATO 10

COLAGENASE
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



GEL DE PLAQUETAS
16/11/2012



18/11/2012



20/11/2012



22/11/2012



24/11/2012



RATO 10

COLAGENASE
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012



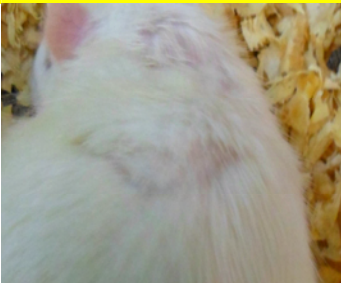
GEL DE PLAQUETAS
26/11/2012



28/11/2012



30/11/2012



02/12/2012



05/12/2012

