

JOSÉ OCTAVIO GONÇALVES DE FREITAS

**PEPTÍDEO RELACIONADO COM GENE DE
CALCITONINA E SUBSTÂNCIA P EM PELE
DE RATOS APÓS EXPANSÃO CUTÂNEA.**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.**

SÃO PAULO

2013

JOSÉ OCTAVIO GONÇALVES DE FREITAS

**PEPTÍDEO RELACIONADO COM GENE DE
CALCITONINA E SUBSTÂNCIA P EM PELE DE
RATOS APÓS EXPANSÃO CUTÂNEA.**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.**

ORIENTADOR: Prof.^a Dr.^a LYDIA MASAHO FERREIRA

COORIENTADORES: Prof. Dr. BERNARDO HOCHMAN

Prof. Dr. GERSON CHADI

SÃO PAULO

2013

Freitas, José Octavio Gonçalves de

Peptídeos CGRP e SP em pele de ratos após expansão cutânea / José Octavio Gonçalves de Freitas. – São Paulo, 2013.

xiii, 80p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Neuropeptides SP and CGRP in rat skin after skin expansion.

1. Neuropeptídeos. 2. Substância P. 3. Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina. 4. Expansor cutâneo. 5. Inflamação Neurogênica. 6. Pele.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA TRANSACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

Ao Grande Arquiteto do Universo pelas oportunidades, vida e sapiência.

A Octavio Gonçalves de Freitas, meu pai, pela constante ajuda, incentivo, apoio, educação, honestidade e amor; por me ensinar a ser um homem honrado e crente em seus deveres.

A Yara Toschi de Freitas, minha querida mãe, por todo amor jorrado e ainda constante em minha vida, pela preocupação, apoio e ensinamentos até hoje presentes.

A Deise Augusto Gonçalves de Freitas, esposa amada e querida, companheira incansável e inseparável nestes 34 anos de convivência, pela paciência, torcida, amor e compreensão.

A Camila Augusto Gonçalves de Freitas e Victor Augusto Gonçalves de Freitas, meus adorados filhos, sempre presentes e atuantes em minha vida, pela dedicação, ajuda, apoio e preocupação que sempre demonstraram.

Aos meus irmãos, meus sogros, meus residentes e preceptores de meu Serviço, pelo apoio demonstrado de forma tão diversa, sincera e espontânea ao longo da vida.

A todas as pessoas que me amam, que presenciaram as minhas dificuldades durante essa jornada e que foram privadas da minha companhia para que eu contribuísse com esse pequeno passo à Ciência.

AGRADECIMENTOS

A minha especial Orientadora, **PROF.^a DR.^a LYDIA MASAKO FERREIRA**, Chefe e Professora Titular de Cirurgia Plástica da UNIFESP, Coordenadora da Divisão de Medicina III da CAPES / CNPq, Pesquisadora 1B, pela confiança, paciência e ciência que me passou.

Ao meu Coorientador, **DR. BERNARDO HOCHMAN**, Professor Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela amizade desenvolvida e confiança e ensino.

Ao meu Coorientador, **PROF. DR. GERSON CHADI**, Professor Titular do Departamento de Neurologia, Chefe do Laboratório de Fisiopatologia Neurocirúrgica-LIM45 da FMUSP, por sua sabedoria e por todo seu tempo dedicado com carinho.

À **PROF.^a DR.^a JESSICA MAXIMINO**, Pesquisadora Científica do Laboratório de Fisiopatologia Neurocirúrgica (LIM-45) da FMUSP, pelo excelente trabalho laboratorial, apoio científico e grande contribuição na realização desse trabalho.

Aos meus amigos Cirurgiões Plásticos, **GUILHERME LAPIN, PAULO R. Q. E. SANTO, RINALDO FISCHLER E ANDRÉ LUÍS RIBEIRO** e à Fisioterapeuta **ÉRICA CALCAGNO**, pelo incentivo e ajuda constante.

Aos alunos do Curso de Aperfeiçoamento de Pesquisa Científica em Cirurgia da UNIFESP, **MICHELE AKEMI NISHIOKA, PAOLA MONTEIRO, ARAINY SUÉLYN ANTUNES, SILVILENA BONATI, FELIPE FENELOW**,

JULIANA BORGES, CÁSSIA SORIANO PONTES, pelo auxílio em laboratório, apoio e incentivo.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, **MARTA REJANE REIS DA SILVA, SANDRA DA SILVA, SILVANA S. OLIVEIRA**, pela paciência, atenção e apoio.

Aos ratos que doaram suas vidas para a conclusão deste trabalho, meu respeito e amor.

Os meus **SINCEROS AGRADECIMENTOS** a todos que, direta ou indiretamente, tornaram esse trabalho possível.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	7
3. LITERATURA	9
4. MÉTODOS	16
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	50
8. REFERÊNCIAS	52
NORMAS ADOTADAS	60
ABSTRACT	62
APÊNDICES	65
ANEXOS	76
FONTES CONSULTADAS	80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ambientação, classificação e isolamento de cada animal no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia pela Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP (Prof.^a Dra. Lydia Masako Ferreira)..... 18
- Figura 2. Expansor (Eurosilicone/Cirurgia Plástica Unifesp/-005/11) de 5cm x 3cm x 1,5cm com válvula remota..... 19
- Figura 3. Marcação do local de incisão e implante do expansor. Dorso de rato epilado (escápulas em amarelo). Retângulo preto (apoiado sobre a linha que une o pontos A e B) é o local de colocação do expansor de 3 cm x 5 cm x 1,5cm, linha preta vertebral (L) de 3 cm é o local de incisão para acesso e o círculo preto à direita do animal é o local de colocação da válvula do expansor. 21
- Figura 4. Gabarito de Polipropileno sobre o rato com as medidas reproduzidas da Figura 2 para incisão, descolamento, colocação do expansor (A) e válvula (C). 22
- Figura 5. Implante do expansor, vista superior, após 2 semanas (rato pertencente ao Grupo EN): A. Inclusão do expansor; B. Inclusão da válvula..... 23
- Figura 6. Implante do expansor - vista superior, em expansão máxima após duas semanas (rato pertencente ao Grupo EN). 24
- Figura 7. Retirada da amostra de pele da área do expansor..... 25

Figura 8. Dermátomo sendo aplicado corretamente.	26
Figura 9. Área doadora (AD) após a aplicação do dermatômo (D).	27
Figura 10. Obtenção da amostra de pele parcial.	28
Figura 11. Obtenção da amostra para análise. Fotomicrografia das amostras corada em HE (10x), mostrando espessura constante.	29
Figura 12. Quantificação de SP na pele expandida de ratos. (*= $p < 0,05$)	34
Figura 13. Quantificação de pró-CGRP na pele expandida de ratos. (*= $p < 0,05$)	35
Figura 14. Quantificação de CGRP na pele incisada de ratos. ($p > 0,05$)	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CGRP	Calcitonin gene-related peptide (Peptídeo ligado ao gene Calcitonina)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilenodiaminotetracético)
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid (Ácido tetracético Etileno Glicol)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Isocianato de Flureceína)
Grupo CO	Expansor vazio
Grupo EN	Expansão normal 15 dias
Grupo ME	Meia expansão (11 ml)
Grupo EI	Expansão imediata
NP`s	Neuropeptídeos
NK1	Neurokinin-1 (Neuroquinina 1)
PBS	Phosphate-buffered saline (Fosfato Salino tamponado)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecilsulfato de sódio)
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SP	Substance P (Substância P)
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha (Fator Alfa de necrose Tumoral)
WB	Western blot analysis, Western blotting (Análise Western Blot)
PVDF	Polyvinylidene fluoride (Fluoreto de polivinilideno)

RESUMO

A inflamação neurogênica é um dos primeiros eventos de cura. Após um estímulo nociceptivo na pele, ocorre a liberação de neuropeptídeos (NP 's) – substâncias pró-inflamatórias – que são produzidas pelos neurônios do gânglio da raiz dorsal e secretadas nas terminações nervosas da pele, provocando a fase inflamatória da cicatrização das feridas. A expansão da pele é amplamente utilizada em cirurgia plástica como um recurso para ganho real de pele para rotação de retalho e, assim, cobrir grandes defeitos decorrentes da perda de pele na remoção de tumores, acidentes de várias origens e reconstrução de partes do corpo humano; mas nada se sabe sobre a ação dos neuropeptídeos CGRP e SP nessas áreas de tecido cutâneo expandido. OBJETIVO: Investigar os neuropeptídeos SP e CGRP na pele cutânea expandida. MÉTODOS: 28 ratos *Wistar*, separados em quatro grupos (n = 7): Grupo CO - (expansor vazio); Grupo EN - (expansão normal, 15 dias); Grupo ME - (meia expansão, 11 ml) e o Grupo EI - (expansão instantânea no dia da coleta). Depois de anestesia geral, cada grupo apresentou um expansor de pele de 22 ml de capacidade e o Grupo CO apenas o expansor vazio; o Grupo EN, o expansor inflado com metade da capacidade (11 ml) no implante e uma semana depois, inflado com mais 11 ml; Grupo ME igual ao grupo EN, mas com apenas metade da capacidade do expansor (11 ml) imediatamente após o implante e o Grupo EI, expansor sendo insuflado com a capacidade total (22 ml) no dia da coleta. Em seguida, cada rato foi submetido à morte induzida, indolor, antes da coleta de amostras, que foram padronizadas quanto ao volume e área, utilizando-se dermatômetro elétrico fixado em 500 μm e *punch* de oito milímetros. Esta amostra foi enviada para a quantificação de CGRP e SP por *Western blotting*. RESULTADOS: Em relação à presença de NP's na

pele de ratos, diminuiu a concentração do neuropeptídeo SP, sendo a maior concentração do grupo CO, e tendo a seguir o grupo ME, o grupo EI e o grupo EN; o neuropeptídeo CGRP obteve valores semelhantes na avaliação de CGRP-5kDa (neuropeptídeo efetivo) e a manutenção das concentrações dos grupos CO, ME e EI. Houve uma queda acentuada na concentração do grupo EN. CONCLUSÃO: A lenta e progressiva expansão da pele inibe a liberação de neuropeptídeos SP, reduzindo a resposta inflamatória independente do volume observado.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Em Cirurgia Plástica, os maiores desafios consistem em perdas cutâneas importantes e sua escassez leva à conduta de realização de retalhos ou enxertos.

Nota-se isso, com efetividade, em áreas maiores com necessidade de cobertura cutânea onde a existência de mecanismo de expansão se faz mister.

Em nosso país, a significativa prevalência de acidentes de trânsito, tumores extensos de pele (pela ineficiência de diagnóstico prévio e tratamento rápido e adequado) e os defeitos advindos de queimaduras (CUNHA *et al.*, 2002) tornam a expansão tecidual de áreas adjuntas ao defeito a ser reparado uma das únicas possibilidades a ser utilizada.

Têm-se investido no conhecimento de fatores de estudo do mecanismo fisiológico, alterações estruturais e bioquímicas da pele expandida.

Sobre a pele expandida temos conhecimentos advindos da gestação humana (JOHNSTON, 1990; ALMEIDA JÚNIOR, 2009; MENDONCA & COUTINHO-NETTO, 2009; PAN *et al.*, 2009) e dos costumes dos povos indígenas da Amazônia como o alargamento de lábios e lóbulos de orelha (CUNHA *et al.*, 2002).

O expansor de tecido consiste em um balão de silicone que é introduzido sob a pele, sob a tela subcutânea, superficial ou profundamente, na fáscia muscular e insuflado com solução salina através de válvula remota ou fixa no dispositivo.

Isto provoca aumento em área de pele, a fim de que, após a retirada do expansor, se possa reconstruir a área próxima cuja resolução dependia de acréscimo de pele ou retalho de rotação dela advinda (WALLENGREN & HAKANSON, 1987; SCHOLZEN *et al.*, 1998).

Desde CODIVILLA em 1905, passando em 1984 por RANDOVAN a expansão tecidual é estudada (CUNHA *et al.*, 2002). Na Cirurgia Plástica, a reconstrução mamária é a que mais utiliza o expansor (CUNHA *et al.*, 2002), assim como em correção de alopecia (HOCHMAN *et al.*, 2013), reconstrução de defeitos por acidentes, reconstrução de orelha externa (HARA *et al.*, 1996) e outras partes do corpo humano (HARA *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2000; HOCHMAN *et al.*, 2008).

As três propriedades físicas da pele (tensão, viscoelasticidade e extensibilidade) estudadas por GIBSON (1969 apud FUJISAWA *et al.*, 1995), como o adelgaçamento da pele estudado por CUNHA *et al.* (2002), reordenação dos componentes teciduais estudada por CUNHA *et al.* (2002) observando a modificações nas microfibrilas de colágeno que se tornam mais compactas pela expansão, observa-se também o aumento de mitoses celulares (HOCHMAN *et al.*, 2013) que demonstra aumento em área do setor expandido. Na expansão cutânea com expansores de tecido observa-se na microscopia espessamento da camada espinhosa da epiderme e diminuição dos espaços intercelulares (STEINHOFF *et al.*, 2003).

Os apêndices cutâneos – como glândulas sudoríparas e sebáceas – não se alteram ou apresentam deformação durante o processo de expansão (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). Já os vasos sanguíneos, conforme CHADI *et al.* (2008), encontram-se dilatados e funcionais, aumentados em número e tamanho.

Em compensação, a tela subcutânea apresenta-se com atrofia significativa ao final da expansão (STEINHOFF *et al.*, 2003).

Em relação à inervação da pele, no único estudo encontrado sobre expansão de fibras nervosas (JIANG *et al.*, 2007), não foi citado nada sobre a fisiologia desta expansão bem como suas consequências biológicas, inclusive o autor descreve como “assunto a ser pesquisado”. Sabe-se que a inervação cutânea é responsável pela homeostase primária da mesma e tem influência direta sobre a cicatrização e sobrevivência de retalhos cutâneos (ROOSTERMAN *et al.*, 2006).

O sistema nervoso está presente na pele numa complexa trama tridimensional, principalmente na derme, e tem funções na imunidade, na regulação dos anexos cutâneos, na termorregulação, na homeostase e também na cicatrização e na modulação inflamatória (BESNE, DESCOMBES, BRETON, 2002; LIANG *et al.*, 2004; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009).

A SP é uma taquicinina com 11 aminoácidos, produzida no corpo do neurônio do gânglio da raiz dorsal, transportada por via axonal, estocada e liberada a partir de terminações nervosas cutâneas (STEINHOFF *et al.*, 2003; CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008). A SP é um NP que age por meio de receptores de membrana NK-1 (KAHLER *et al.*, 1993), causando: degranulação de mastócitos, ativação de queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, e linfócitos B e T. Essas células, por sua vez, liberam uma ou mais substâncias imunomoduladoras e pró-inflamatórias como histamina, TNF- α , prostaglandina D2, leucotrieno B4, neurocinina 1, interleucinas IL-1 α , IL-1 β e IL-8, além de provocar quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos (MCGOVERN, JONES, SHARPE, 1995; FURUTANI *et al.*, 1999; QUINLAN *et al.*, 1999; SONG *et al.*, 2000; SCHMELZ & PETERSEN,

2001; STEINHOFF *et al.*, 2003; ROOSTERMAN *et al.*, 2006). Por essa diversidade de funções, a SP está relacionada a processos na pele, como vasodilatação, prurido, extravasamento plasmático (em pele murina e humana), ativação do sistema imunológico e cicatrização (THEOHARIDES *et al.*, 1998; ROOSTERMAN *et al.*, 2006; CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008).

O CGRP é um neuropeptídeo com 37 aminoácidos que em humanos apresenta duas isoformas, α e β , diferentes entre si por três aminoácidos (MOORE & SALVATORE, 2012). O α -CGRP é expresso, preferencialmente, pelas terminações nervosas da pele, enquanto o β -CGRP é encontrado, sobretudo em terminações entéricas e na epiderme (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). Na pele, o CGRP está localizado, frequentemente, nas mesmas fibras nervosas que o SP e, quando liberado, ativa receptores CGRP1 e CGRP2 localizados em: mastócitos, macrófagos, fibroblastos, melanócitos, células dendríticas, queratinócitos e linfócitos B e T (BRAIN & CAMBRIDGE, 1996; SCHMELZ & PETERSEN, 2001; STEINHOFF *et al.*, 2003; ROOSTERMAN *et al.*, 2006). O pró-CGRP (15 kda) é um precursor de ambas as isoformas do CGRP, mensurável, sobretudo, no gânglio da raiz dorsal. A partir desse local, o CGRP é levado à terminação nervosa por via axonal, em sentido antidrômico, e estocado na terminação nervosa (MISHIMA *et al.*, 2011). Da mesma forma que a SP, o CGRP está envolvido em processos complexos, ainda não completamente compreendidos, relacionados, sobretudo, às atividades pró-inflamatórias na fase aguda da inflamação (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). Entre seus efeitos locais ressalta-se como potente vasodilatador via óxido nítrico, a supressão de linfócitos T, a modulação do processo cicatricial, a quimiotaxia de

células inflamatórias e a consequente modulação da dor (BRAIN & GRANT, 2004; BIRKLEIN & SCHMELZ, 2008).

O bloqueio do potencial de ação das fibras A- δ e C da pele, por expansores, cutâneos pode reduzir a liberação de NP's cutâneos diante de um estímulo nociceptivo, inibir a complexa cascata de mediadores inflamatórios (RODRIGUES *et al.*, 2011), assim como suprimir a deflagração da inflamação neurogênica (PETERS *et al.*, 2006), potencialmente atrasando o início do reparo cicatricial.

Não foram encontrados estudos que relacionassem a influência dos expansores cutâneos com a secreção de NP's pelas terminações nervosas cutâneas, inclusive SP e CGRP, após um estímulo nociceptivo. Ressalta daí a importância de averiguar comparativamente se os expansores cutâneos utilizados na prática clínica poderiam modular, inibindo ou potencializando, a liberação desses NP's na pele.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Investigar os neuropeptídeos CGRP e SP em pele de ratos submetida à ação de expansor de tecido.

3. LITERATURA

3. LITERATURA

3.1 Cicatrização e Neuropeptídeos

WALLENGREN, CHEN, SUNDLER (1999) estudaram a cicatrização de lesões padronizadas em ratos, após a secção do nervo ciático e a depleção de neuropeptídeos pela capsaicina. Os autores usaram 115 ratos com lesões cutâneas padronizadas com *punch* de três milímetros até o subcutâneo nas patas traseiras e os distribuíram em quatro grupos: (1) grupo controle; (2) grupo tratado previamente com capsaicina; (3) grupo com secção do nervo ciático e (4) grupo tratado com capsaicina somado à secção do nervo ciático. As lesões foram acompanhadas por biópsias com *punch* de seis milímetros nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21, utilizando inspeção macroscópica, histológica e imuno-histoquímica para SP, CGRP, VIP, NPY e PGP 9.5. Uma redução parcial dos NP's no local da lesão foi devidamente constatada nos grupos experimentais. Os autores não observaram atraso no fechamento da lesão entre os grupos e, constatando que uma denervação total não foi obtida, os mesmos concluíram que as fibras nervosas residuais, seus respectivos estoques de NP's e ramos nervosos colaterais são suficientes para prover uma cicatrização normal.

WEIDNER *et al.* (2000) investigaram a SP e o CGRP na pele de humanos quanto à capacidade de vasodilatação, extravasamento proteico, liberação de histamina e efeitos sensitivos, através de microdiálise (MD) com ELISA. A MD com ELISA permitiu determinar o extravasamento proteico na pele de humanos *in vivo* de maneira atraumática em 53 voluntários saudáveis. Assim, cinco fibras ocas de plasmaferese foram

introduzidas na face volar do terço médio do antebraço esquerdo, perpendiculares ao eixo ósseo, a uma profundidade média de 0,6 milímetro, distando quatro centímetros um do outro. As fibras foram perfundidas com solução de Ringer por 60 minutos e depois foi realizado estímulo com SP e CGRP e comparadas com a prostaglandina E2 (substância vasodilatadora) e codeína (substância degranuladora de mastócitos) por 30 minutos. O produto da diálise foi colhido a cada 15 minutos e enviado para análise fotométrica. Os autores observaram que: (1) tanto SP como CGRP não provocaram sintomas locais, como dor e coceira; (2) a SP produziu vasodilatação dose-dependente e extravasamento proteico, provavelmente por dilatação de vênulas pós-capilares; (3) o CGRP produziu vasodilatação mais duradoura e potente que a SP, agindo sobre as arteríolas pré-capilares, portanto sem extravasamento proteico e (4) SP causa liberação de histamina, mas apenas em concentrações mais elevadas.

BESNE, DESCOMBES, BRETON (2002) estudaram a inervação na epiderme em relação à idade e local anatômico em humanos (mulheres brancas). Foram realizadas 82 biópsias em pacientes entre 20 e 93 anos, distribuídos em grupos a cada década de vida, retiradas de quatro locais anatômicos submetidos a cirurgias plásticas estéticas: pálpebra superior, área pré-auricular, abdome (infraumbilical) e mama (polo inferior). Foi realizada imuno-histoquímica nas peças com marcador de células nervosas PGP 9.5 e calculada a área epidérmica ocupada por terminações nervosas. Os autores concluíram que a densidade de inervação epidérmica em função da idade diminuiu nas pálpebras, não se alterou no abdome e aumentou nas mamas.

SMITH & LIU (2002) estudaram a cicatrização de lesões em ratos recém-nascidos, após a depleção de neuropeptídeos pela capsaicina. Os autores usaram 65 ratos recém-nascidos com lesões cutâneas padronizadas com *punch* cutâneo de quatro milímetros na região periescapular no 12.º dia pós-natal (DPN) e os dividiram em dois grupos: (1) grupo controle e (2) grupo tratado, previamente, com capsaicina em injeções subcutâneas no 2.º e no 9.º DPN. Após o uso de um marcador de divisão celular (BRDU), as cicatrizes foram biopsiadas nos dias 3, 5, 7, 11 e 21 do experimento. Foram medidos a área e o volume do ferimento e as peças foram para IHQ. Uma redução parcial dos NP's no sítio da lesão foi devidamente constatada nos grupos experimentais. Os autores observaram que a redução de CGRP na lesão estava associada à cicatrização retardada, que se traduziu em maior área e volume de cicatrização, retenção de crostas prolongada e reepitelização atrasada.

LIANG *et al.* (2004) compararam a quantidade de nervos no modelo de cicatriz hipertrófica de fêmeas de porco *Red Duroc* (FPRD) em relação à cicatriz hipertrófica humana. Os autores fizeram lesões no dorso de duas FPRD e biopsiaram as lesões com dez dias, um mês e cinco meses. As amostras humanas foram obtidas durante o tratamento de seis pacientes queimados. Foi realizado IHQ e as imagens foram analisadas em computador para avaliação de densidade de nervos e fração da área com nervos. Os resultados mostraram que o tecido nervoso estava aumentado na cicatriz da FPRD, assim como em cicatrizes hipertróficas humanas, como descrito na literatura, porém sem diferença estatística. Os autores concluíram que esses resultados corroboraram com a validação do modelo animal da FPRD para estudo de cicatrizes hipertróficas.

DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS (2005) estudaram a influência da SP na cicatrização da pele de ratos, após um ferimento padronizado com laser de CO₂ até 50% da derme. Dessa forma, foram injetados no ferimento, de maneira exógena, a SP e o *Spantide II*, um antagonista de SP, e a pele coletada em espessura total até o panículo carnoso, nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 pós-ferimento, congelada e enviada para imuno-histoquímica (IHQ). Foi estabelecido um *score* histológico considerando-se os vários aspectos microscópicos do processo cicatricial. Como resultado, a cicatrização apresentou-se com menor *score* histológico diante de baixas concentrações de SP, como no grupo controle e no grupo *Spantide II* e, inversamente, a cicatrização teve melhor qualidade histológica diante de concentrações mais altas de SP.

ESTEVES JUNIOR (2009) investigaram o efeito da administração tópica de CGRP por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. Foram utilizados 60 ratos submetidos à realização de retalho cutâneo randômico e distribuídos igualmente em quatro grupos: (1) grupo controle, simulação; (2) grupo iontoforese, placebo; (3) grupo controle de absorção, com simulação de estímulo elétrico e uso de CGRP e (4) grupo tratado com iontoforese de CGRP. Analisando as áreas de necrose dos retalhos, os autores concluíram que a administração tópica de CGRP por iontoforese é eficaz em aumentar a viabilidade de retalhos randômicos em ratos.

MISHIMA *et al.* (2011) estudaram os efeitos do CGRP sobre membros isquêmicos de ratos. Para elucidar o papel do CGRP na angiogênese durante a isquemia, os autores utilizaram seis ratos não produtores de CGRP (RNP) e os compararam a seis ratos produtores de

CGRP (RP) após provocarem isquemia unilateral em membro posterior por ligadura de artéria e veia femorais. Os autores mensuraram os níveis de CGRP na pele e em nervos periféricos, assim como o pró-CGRP no corpo celular do neurônio do gânglio da raiz dorsal. Eles observaram aumento nos níveis de CGRP na pele e nos nervos periféricos, assim como aumento nos níveis de pró-CGRP no corpo neuronal durante a isquemia em RP. Nesses mesmos ratos, os autores observaram melhor recuperação do fluxo sanguíneo em relação aos RNP, demonstrando um importante papel do CGRP na angiogênese, além de suas já conhecidas propriedades vasodilatadoras.

MISERY (2011) revisaram a influência das interações entre sistema nervoso periférico e a pele, com enfoque nas dermatites atópicas e no estresse. A relação anatômica que as terminações nervosas da pele têm com certas células pode guardar distância de menos de 300 nm entre si e há significativa liberação de substâncias neuromoduladoras nesse espaço, o que, segundo os autores, tem comportamento de sinapses. A maior parte das substâncias liberadas nesses espaços são NP's, sendo que a SP pode inibir a apresentação de antígenos e linfócitos; e o CGRP inibe o contato e atrasa reações de hipersensibilidade, o que pode justificar o efeito imunossupressor da radiação ultravioleta. Devido a isso, há significativa influência do sistema nervoso central em desordens inflamatórias, autoimunes e atópicas. Na dermatite atópica há aumento de SP, CGRP e VIP, assim como da própria inervação local. E o estresse psicológico do indivíduo participa ativamente disso, agravando a reação inflamatória através da inflamação neurogênica e degranulação de mastócitos. Os autores preconizaram, como perspectivas, que as drogas que inibem a inflamação neurogênica e NP's poderiam oferecer maior controle sobre as

atopias cutâneas, assim como terapias que alterem o estado psicológico do paciente (JIANG, SHIBATA, WANG, 1994; FUJISAWA *et al.*, 1995).

Os resultados alcançados por estes autores sugerem que a expansão de nervos não tem um efeito deletério sobre a propriedade de promover axônios dos tubos das células de Schwann e de que a expansão é dependente não só da viscoelasticidade dos nervos, como também do reforço da proliferação das células de Schwann.

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Desenho de pesquisa

A presente pesquisa é um estudo primário, experimental, analítico, prospectivo, autocontrolado e unicego. Foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob número 0005/11 (Apêndice 1).

4.2 Amostra

Foram utilizados 28 ratos *Wistar-EPM* (*Rattus norvegicus*) adultos, machos, com peso entre 250 e 350 gramas, oriundos do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (CEDEME) da Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP). Os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia pela Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP (Prof.^a Titular Lydia Masako Ferreira). Os animais foram confinados em biotério, em gaiolas individuais de plástico, com tampa metálica própria para dispor o recipiente com água e ração comercial, consumidas *ad libitum*. O ambiente foi mantido, por meio de dispositivos eletrônicos, a uma temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, manutenção do grau de umidade e de um período controlado de 12 horas de luz. Os animais tiveram um período de uma semana para ambientação antes da manipulação experimental.



Figura 1. Ambientação, classificação e isolamento de cada animal no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia pela Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP (Prof.^a Dra. Lydia Masako Ferreira).

A - Armário contendo gaiolas individuais;
B - Detalhamento da rotulação de cada gaiola

4.3 Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente (www.randomization.com) em quatro grupos de sete ratos cada um. Foi realizado o experimento no dorso de cada animal com o expansor designado para tal, como segue:

- Grupo CO: Grupo controle (somente expansor).
- Grupo ME: Grupo meia expansão (metade do volume)
- Grupo EI: Grupo expansão imediata (22 ml expandidos/dia coleta)

- Grupo EN: Grupo expansão normal (22 ml/2 semanas)

4.4 Desenvolvimento do expansor para ratos

O expansor especialmente desenhado para este projeto é resultado do trabalho de criação conjunta do pesquisador e equipe de desenvolvimento da Empresa Eurosilicone[®] (Avignon, França). Possui como especificações características de volume (22 ml) e tubo do expansor (10 cm) ligado à válvula remota de insuflação (2 cm de diâmetro).

O pesquisador optou por desenvolver este expansor criado com o nome “**Expansor Cutâneo para Ratos Wistar, Cirurgia Plástica-Unifesp/Eurosilicone-005/11**” (Figura 2).



Figura 2. Expansor utilizado no estudo (Eurosilicone/Cirurgia Plástica Unifesp/-005/11).

Cada expansor possui as dimensões de 5cm x 3cm x 1,5cm com válvula remota de 2 cm de diâmetro.

4.5 Preparo dos animais

Os animais foram submetidos à anestesia geral por via intramuscular no membro posterior esquerdo, utilizando-se cloridato de xilazina e quetamina (uso veterinário), misturados na proporção de 1:2, respectivamente, sendo injetado 1 ml/kg. Após a indução anestésica, os animais foram dispostos em decúbito ventral e foi realizada epilação do dorso, de forma padronizada, com tricótomo elétrico (WAHL®) (Anexo 1).

4.6 Implante dos expansores

Foram traçadas, sobre a linha sagital posterior, duas linhas transversas, uma passando pelo ângulo inferior das escápulas do animal (direita e esquerda) e outra pelas espinhas ilíacas ântero-superiores do animal (direita e esquerda); sobre a linha interescapular (A-B) foi colocado gabarito pré-confeccionado em poliuretano transparente tendo um retângulo de cinco centímetros por três centímetros (local da colocação do expansor), um centímetro abaixo é encontrada a linha “L” de três centímetros, onde foi realizada a incisão cutânea sobre a linha sagital posterior do animal a fim de introduzir, superiormente, o expansor e, inferiormente, a válvula de insuflação. A válvula de insuflação do expansor foi implantada no tecido subcutâneo sobre a crista ilíaca direita de todos os animais (Figuras 3 e 4).

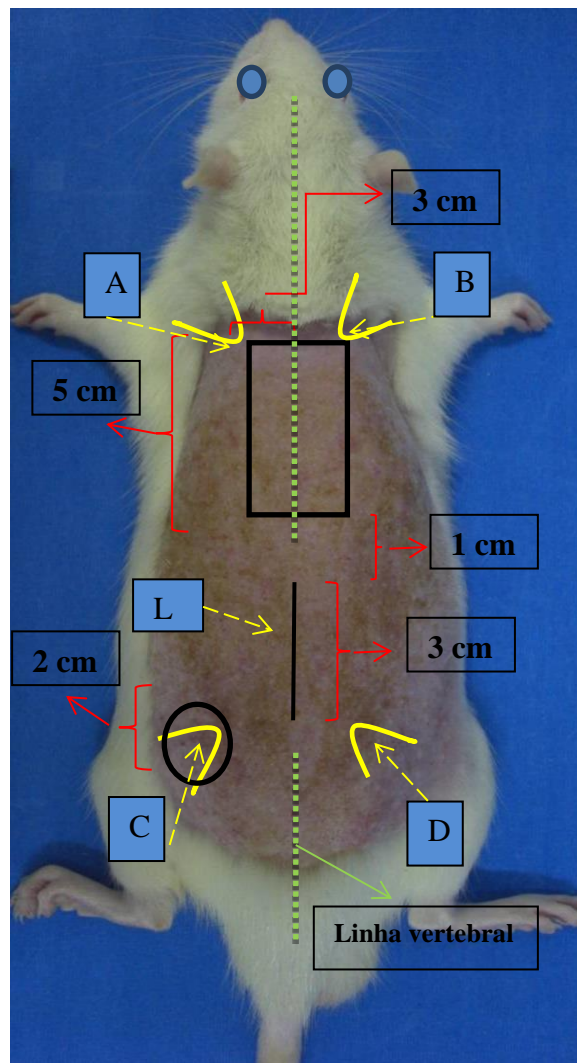


Figura 3. Marcação do local de incisão e implante do expansor.

Dorso de rato epilado (escápulas em amarelo). Retângulo preto (apoiado sobre a linha que une o pontos A e B) é o local de colocação do expansor de 3 cm x 5 cm x 1,5cm, linha preta vertebral (L) de 3 cm é o local de incisão para acesso e o círculo preto à direita do animal é o local de colocação da válvula do expansor.

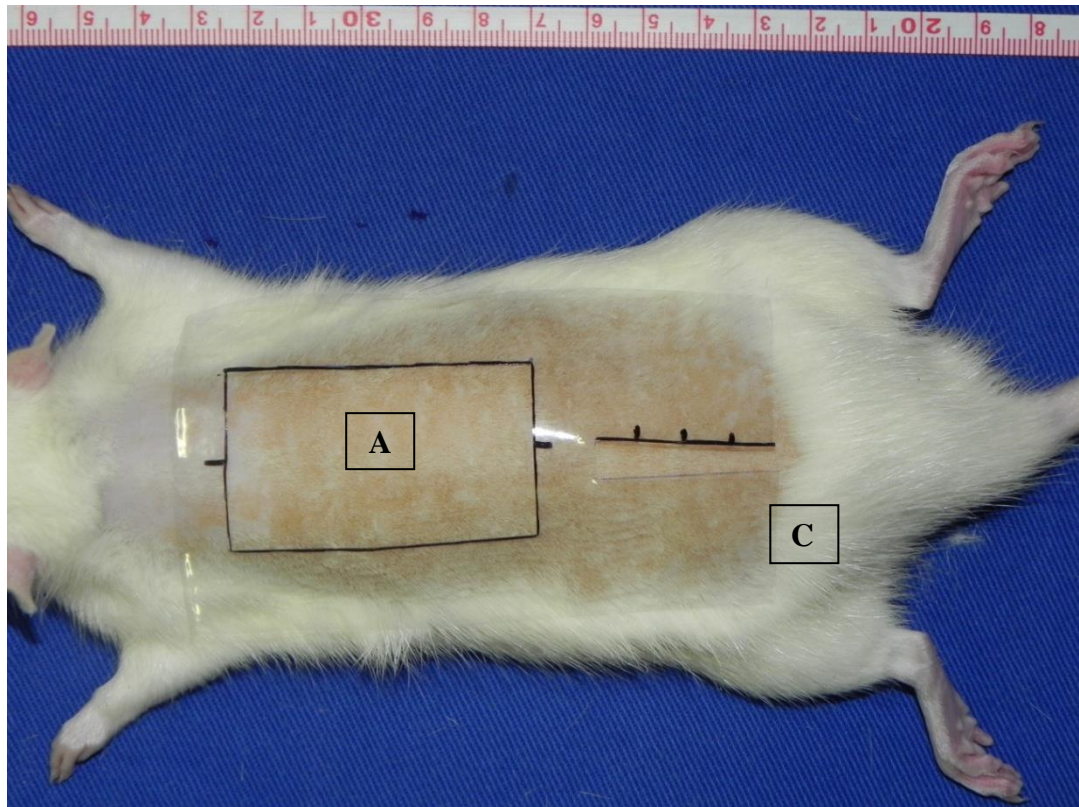


Figura 4 – Demarcação da área de implante do expansor.

Gabarito de Polipropileno sobre o rato com as medidas reproduzidas da Figura 3 para incisão, descolamento, colocação do expansor (A) e válvula (C).

Incisando-se a pele do dorso do animal sobre a linha vertical (L) em um curso de três centímetros distante seis centímetros da linha interescapular A-B ultrapassando pele e panículo carnoso do animal, descola-se, superiormente, com tesoura romba, até a linha escapular inferior de onde se isola uma área descolada de cinco centímetros por três centímetros que receberá o expansor. Pela incisão dentro do mesmo plano descolou-se por meio de divulsão romba a região ilíaca direita do animal (área de 2cm^2) que receberá a válvula remota do expansor (Figuras 5 a 7).

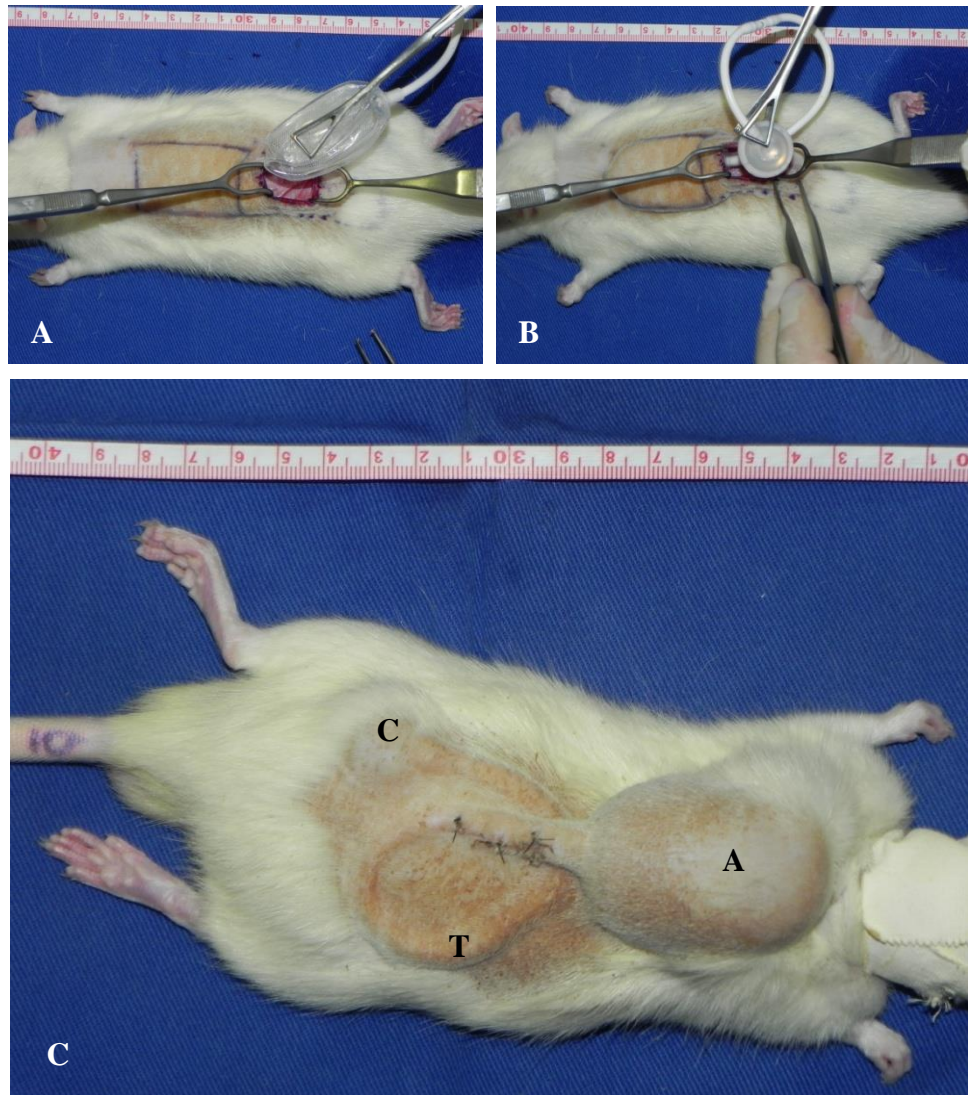


Figura 5 - Técnica operatória de implante do expansor.

A - Vista superior, após 2 semanas (rato pertencente ao Grupo EN): A. Inclusão do expansor;

B - Inclusão da válvula;

C - Vista superior, identificando-se expansor (A) , válvula (C) e conector (T)



Figura 6. Implante do expansor - vista superior.

Em expansão máxima após duas semanas (rato pertencente ao Grupo EN).

4.7 Obtenção e preparo das amostras de pele

O rato, após morte assistida e indolor, foi firmemente segurado nas suas extremidades caudal e cranial do tronco e arqueado, de modo a manter a pele do dorso esticada e expor a região onde o expansor foi colocado.

Utilizando-se um dermatomo elétrico PADGETT® (Anexo 2), foi retirado um fragmento "B" de pele parcial do dorso do rato, com espessura de 500, contendo a reta A no centro de uma área com no mínimo dois centímetros de largura (Figuras 8 a 12).

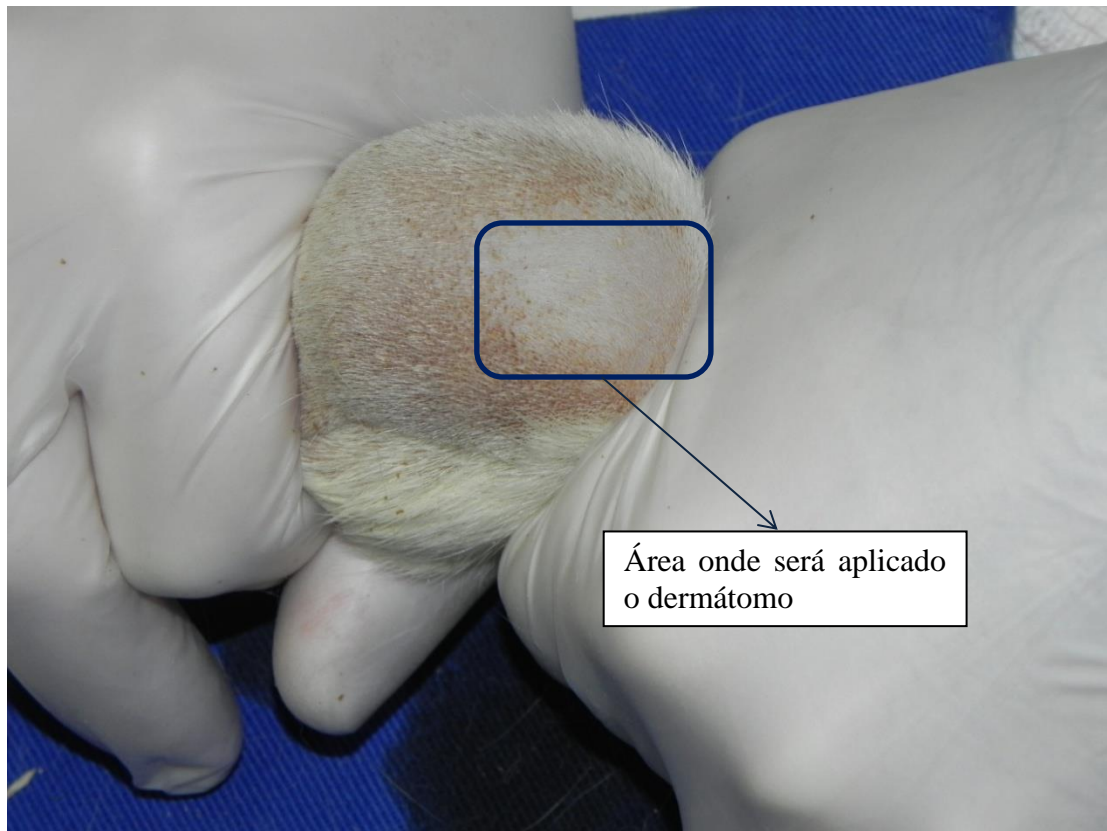


Figura 7. Retirada da amostra de pele da área do expansor.

O pesquisador deve segurar firmemente o tronco do rato já morto, com o expansor presente, arqueá-lo levemente, (apoiando suas mãos sobre uma superfície estável) e esticar a pele do dorso com os dedos. Na área retangular azul será aplicado o dermatomo (D) que retirará o local de onde será colhida a amostra

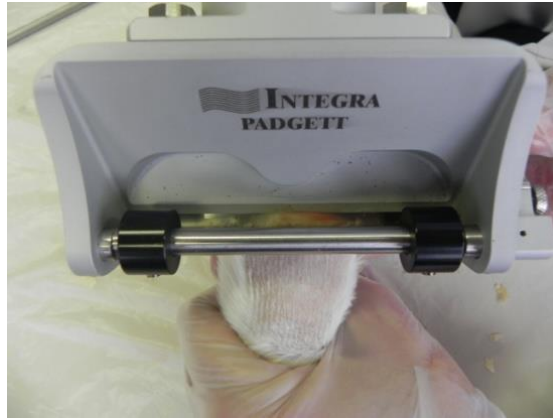


Figura 8. Dermátomo sendo aplicado corretamente.



Figura 9. Área doadora (AD) após a aplicação do dermátomo (D).

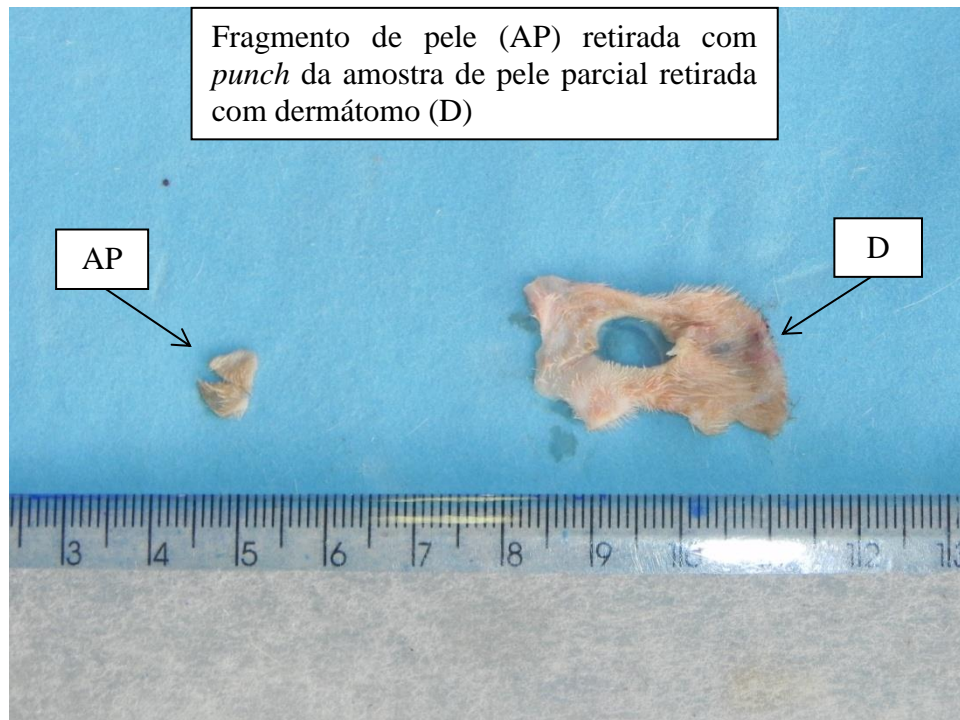


Figura 10. Obtenção da amostra de pele parcial.

Área doadora no dorso do rato (D) após exérese da amostra de pele parcial com dermatômo é retirada com *punch* de 8 mm (AP) e dividida ao meio, originando duas amostras.

Foi utilizado um *punch* cutâneo de oito milímetros (Anexo 3) no centro da área retirada com dermatômo elétrico, conferido com 500 μm , para obter as amostras que foram enviadas para análise (Figura 10).

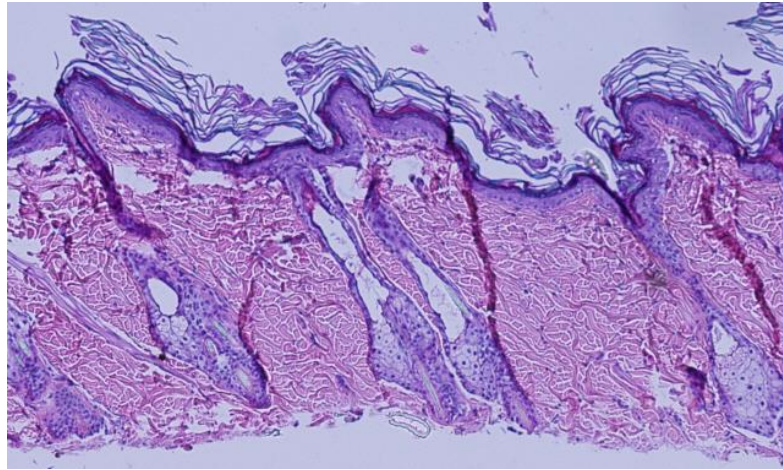


Figura 11. Obtenção da amostra para análise. Fotomicrografia das amostras corada em HE (10x), mostrando espessura constante.

As amostras retiradas com o *punch* foram imediatamente colocadas em tubos de *Eppendorff* 2,0 ml, secos, previamente catalogados com numeração aleatória. Esses tubos foram congelados em gelo seco e mantidos em *freezer* a -20°C até a realização do *Western blotting*.

4.8 Extração de Proteínas e *Western blotting*

As amostras retiradas de cada animal foram homogeneizadas em solução tampão para extração da proteína total. Primeiramente, as amostras foram lisadas e homogeneizadas, com auxílio de um homogeneizador, utilizando-se 350 μL de tampão de lise constituído de NP40 (1%), deoxicolato de sódio (0,5%), SDS (1%), EDTA (1mmol/L), EGTA (1mmol/L) e coquetel inibidor de proteases (Sigma, 1%) em PBS (Ph 7,4). Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C ; o sobrenadante foi obtido e a quantidade de

proteína foi determinada, usando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

As amostras foram diluídas em tampão de lise a fim de se obter quantidade de 60µg em 25µL, que foram desnaturadas à 100°C durante três minutos e aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida a 12% para fracionamento. Em um dos poços da placa, foram aplicados 5µL de marcador de peso molecular (*Kaleidoscope*, pré-corado, *Bio-Rad*, EUA). O tampão de corrida foi preparado com Trizma® (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e SDS (0,1%), as proteínas foram separadas através de aplicação de 100 volts durante 1 hora e 30 minutos.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (*Bio-Rad*) utilizando tampão de transferência gelado contendo Trizma® (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e metanol (10%) durante 1 hora, a 100 volts.

A membrana foi então incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados durante 15 minutos, em temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi constituída à base de leite (10%) em TBS-T (tampão tris-salina com *tween* 20 a 0,05%). Após este bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anticorpo policlonal antissubstância P feito em cabra (1/100, Santa Cruz), e anticorpo policlonal anti-CGRP feito em coelho (1/300, Sigma) diluídos todos em leite (3%) em TBS-T, durante 24 horas, à 4°C sob agitação constante. Após esta incubação, as membranas foram lavadas por duas vezes em TBS-T por dez minutos e incubadas com o anticorpo secundário anti-cabra (1/2000, GE) e anti-coelho (1/10.000, GE) conjugados a uma peroxidase (HRP-conjugado), diluídos em leite (3%) em TBS-T e incubados durante uma hora, em temperatura ambiente.

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas por duas vezes com TBS-T e uma vez com TBS durante dez minutos cada. A reação aconteceu através de incubação com reagente quimioluminescente (*Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, ECL kit*, Perkin Elmer, EUA) durante exatamente um minuto. As membranas foram expostas a filme sensível à quimioluminescência (*Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences*) durante o período de 30 segundos a cinco minutos, segundo orientação do fabricante para cada anticorpo, e revelados.

Após revelação dos filmes, as membranas foram lavadas e submetidas a nova marcação com anticorpo contra a beta-actina, uma proteína, a fim de normalizar os valores proteicos. Para isso, as membranas foram incubadas com anticorpo primário contra β III-*tubulin* diluído a 1:30.000 (Sigma, EUA) em TBS-T contendo BSA a 1%, durante uma hora em temperatura ambiente seguida de duas lavagens com TBS-T por dez minutos cada e de incubação, por 45 minutos à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (anti-coelho, HRP conjugado, *Amersham*) diluído a 1/10.000 em TBS-T com BSA 1%. Após estas incubações as membranas foram lavadas como descrito anteriormente, seguidas da reação e revelação do filme. Os filmes foram quantificados através de densitometria óptica, usando um sistema de análise de imagens (CHADI *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2011).

4.9 Análise estatística

As quantidades de SP e CGRP nas amostras de pele foram obtidas em unidades de valores arbitrários, apresentadas como média, desvio padrão e valores máximos e mínimos. Todos os dados foram avaliados em seu conjunto por análise de variância (ANOVA) para se detectar diferenças significantes. Os grupos também foram avaliados aos pares utilizando-se o teste de Tukey para estabelecer diferenças entre cada grupo. Fixou-se em 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade ($p < 0,05$), para a rejeição da hipótese de nulidade da presente pesquisa.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os Grupos de Expansão imediata (EI) e Expansão em duas semanas (EM) tiveram redução significativa na quantidade de SP na pele de ratos em relação ao grupo Controle e Meia expansão (Figura 12). O teste de ANOVA resultou em $p=0,035$. A comparação pareada pelo teste de Tukey mostrou diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos.

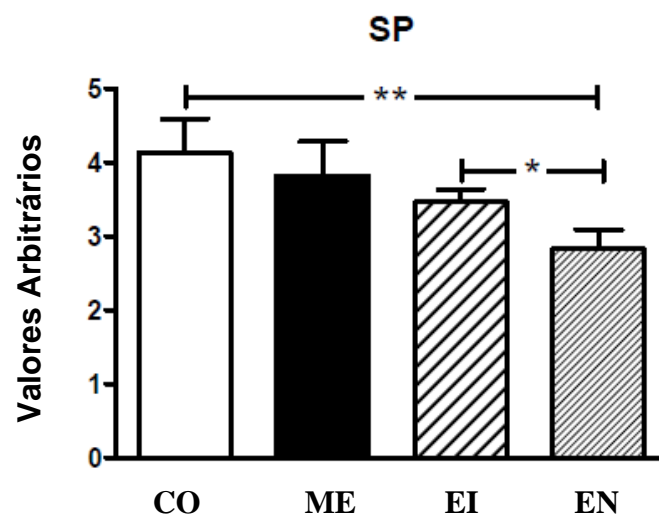


Figura 12. Quantificação de SP na pele expandida de ratos. (*= $p<0,05$)

Todos os grupos foram capazes de inibir a presença de pró-CGRP na pele de ratos em relação ao grupo Controle, mas não houve diferença entre os grupos, com exceção do Grupo de Expansão Normal (EN). O teste de ANOVA mostrou $p=0,0029$ para o Grupo EN. A comparação pareada pelo teste de Tukey mostrou diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos CO e ME e grupos ME e EN. A quantificação de pró-CGRP na pele incisada de ratos (Figura 13).

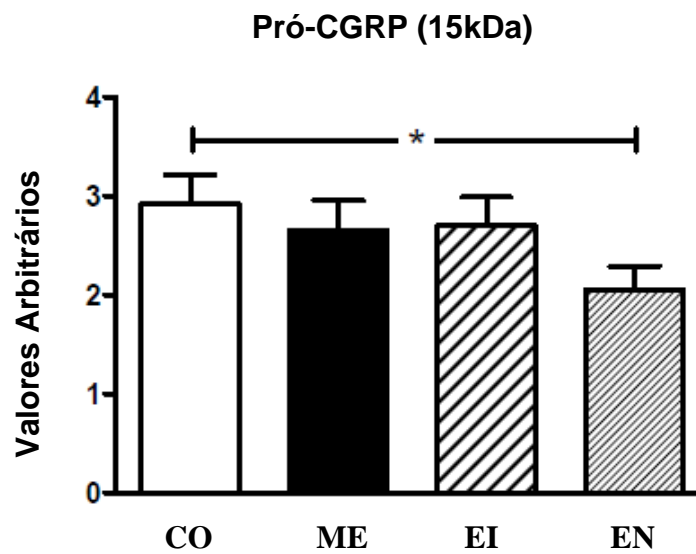


Figura 13. Quantificação de pró-CGRP na pele expandida de ratos. (*= $p < 0,05$)

Nenhum grupo foi capaz de inibir a presença de CGRP na pele de ratos em relação ao Controle, porém houve pequena diferença entre os grupos. O teste de ANOVA mostrou $p=0,003567$. A comparação pareada pelo teste de Tukey não mostrou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos. A quantificação de CGRP na pele incisada de ratos (Figura 14).

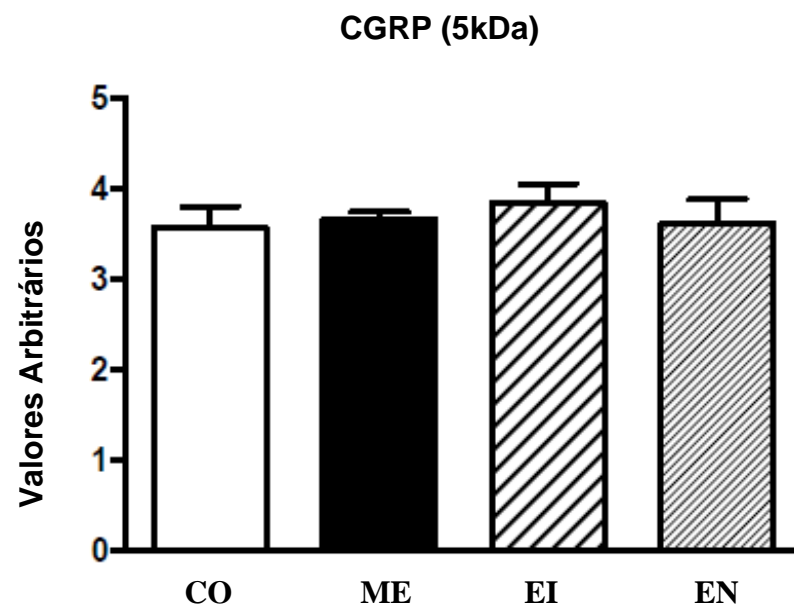


Figura 14. Quantificação de CGRP na pele incisada de ratos. ($p>0,05$)

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A expansão cutânea sempre foi utilizada como ganho tecidual para reparo ou cobertura de locais onde a cobertura cutânea fosse necessária.

LIANG *et al.* (2004) e JIANG, SHIBATA, WANG (1994), observaram alterações significativas em pele expandida de região mastoide para confecção de orelhas em microtias humanas. Este estudo sugere que se deve atentar para algo que ocorre, provavelmente, na estrutura neurológica, que poderia provocar tais alterações.

Paralelamente, desde CHVAPIL *et al.*, em 1979, a literatura é farta de trabalhos, demonstrando que os anestésicos locais podem influenciar no processo cicatricial, sobretudo nas fases mais iniciais da cicatrização. Em 2003, BROWER & JOHNSON avaliaram os mais importantes estudos *in vivo* e *in vitro*, que demonstravam alterações morfológicas importantes na fase inflamatória e na fase proliferativa da cicatrização, como: redução da força de quebra da cicatriz, redução da síntese de colágeno, aumento do tempo de cicatrização, aumento das taxas de infecção, diminuição da quantidade de fibras de colágeno e redução da vascularização da cicatriz.

A cicatrização cutânea consiste em um processo complexo envolvendo inflamação, epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de matriz intersticial realizado por diferentes tipos de células, como: queratinócitos, fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais (BROWER & JOHNSON, 2003). A inflamação neurogênica (IN) é o primeiro conjunto de eventos na fase inflamatória e, portanto, no processo cicatricial.

CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, em 2008 apontaram diversos estímulos que disparam a IN, como: calor, lesões tópicas, agentes irritantes, alérgenos, luz ultravioleta e agentes microbianos. Segundo ZEGARSKA, LELIŃSKA, TYRAKOWSKI (2006), o estresse mecânico também estimula as fibras sensitivas da pele, que levam um impulso para processamento medular, mas também desencadeia um reflexo axonal com estimulação antidrômica dos nervos sensitivos ao redor do estímulo inicial, levando à liberação de neuropeptídeos (NP's) pelas terminações nervosas livres da pele, incluindo a substância P (SP) e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP), ambos essencialmente pró-inflamatórios, apesar do CGRP ter também algumas atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). Os NP's iniciam uma cadeia de eventos em cascata e dão origem a processos inflamatórios, imunológicos e sensoriais (dor, prurido e vasodilatação ou *flare*).

Diversas células com receptores específicos dos NP's são ativadas, como: mastócitos, queratinócitos, fibroblastos, melanócitos, neutrófilos, linfócitos, entre outros. E uma diversidade de fatores são liberados, como: histamina, TNF- α , prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, além de iniciar a quimiotaxia de células imunomoduladoras (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008). Os eventos da IN têm influência direta na cicatrização normal (ESTEVEZ JUNIOR *et al.*, 2009). Outros autores também apontam que falhas nas vias iniciais da IN podem levar a um atraso no ritmo e na qualidade da própria cicatrização (SMITH & LIU, 2002; DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS, 2005; ROOK & MCCARSON, 2007).

Essas indagações nortearam o presente estudo, que buscou averiguar, de maneira direta, se a expansão cutânea seria capaz de inibir a liberação de

NP's na pele na fase mais incipiente do processo cicatricial (na inflamação neurogênica) e se haveria alguma diferença no grau de inibição entre os mesmos, visto que cada forma de expansão tem potência e durabilidade diferentes.

O modelo adotado foi com ratos *Wistar* para que o trabalho pudesse ser comparado com outros trabalhos da literatura que adotam o mesmo modelo (WALLENGREN, CHEN, SUNDLER, 1999; SMITH & LIU, 2002; DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS, 2005; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2009; MISHIMA *et al.*, 2011). Outros animais de pequeno porte também podem ser adotados, como: cobaia, coelho e *hamster*, mas todos enfrentam o mesmo problema: a cicatrização rápida e eficiente não é igual à de humanos (DRUCKER *et al.*, 1998). Como menciona BROWER & JOHNSON em 2003, há dificuldade em se estudar cicatrização em humanos pelos obstáculos éticos encontrados em se remover amostras da cicatriz para análise, sobretudo, em pacientes sem doenças cicatriciais.

Suturas na incisão ou manipulação das mesmas poderia ser um viés por si só, já que há liberação de substâncias inflamatórias no local da passagem do fio (estímulo nociceptivo) que poderiam alterar a quantificação do *Western blotting*. Além disso, a amostra de pele do trabalho desses autores foi retirada em pele total, por dissecção manual, o que acaba gerando amostras com volumes diferentes de tecido subcutâneo.

No presente estudo, optou-se pelo uso de um dermatomo elétrico para que a espessura de pele fosse sempre constante e não gerasse amostras de maior volume do que outras, e, tampouco, viesse acompanhada, inadvertidamente, de tecido subcutâneo ou panículo carnoso. Não foram encontrados, na literatura, estudos que utilizassem a mesma forma

padronizada de retirada de pele e, portanto com quantidades diferentes de substâncias inflamatórias.

O WB utilizado no presente estudo é um método que quantifica as proteínas marcadas de toda a amostra retirada, portanto tais amostras devem ter volumes homogêneos e padronizados. A espessura total da pele do rato no dorso fica entre 900 e 1000 μ m e os folículos pilosos são abundantes, com profundidade maior que 500 μ m, como mostraram RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON em 2005. O mesmo autor, já apontou que as terminações nervosas se concentravam na epiderme e na metade superior da derme e que os folículos pilosos, por serem ricamente inervados e abundantes em NP's, poderiam mascarar a análise de eventos mais sutis na superfície da pele. Por isso optou-se pela espessura parcial constante de 500 μ m. DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS em 2005, enfatizaram um modelo animal, onde eles utilizaram um *laser* de CO₂ para realizar uma lesão na pele, eliminando aproximadamente 50% da camada mais superficial, para avaliar os efeitos da SP na cicatrização. Apesar de obter uma profundidade padronizada para estudo, a metade mais profunda da pele não é o melhor local para avaliar a resposta cicatricial ou as alterações provocadas pela SP, já que contém diferentes quantidades de terminações nervosas relacionadas a glândulas e folículos pilosos. Todos esses apêndices cutâneos, liberando NP's, "inundariam" as amostras de pele com SP e CGRP, mascarando as quantidades de NP's realmente oriundas das terminações nervosas livres, que é o objeto desse estudo.

Para que o tamanho das amostras fosse semelhante, um *punch* cutâneo de oito milímetros foi usado, no ponto central da área expandida. Considerando que todo o fenômeno analisado acontecia num pequeno

espaço, este diâmetro de oito milímetros de área foi suficiente, já que essa área era a origem do estímulo para liberação de NP's.

Outras interessantes e características peculiaridades tiveram que ser suplantadas para a perfeita adequação do método. Os neuropeptídeos têm estrutura molecular frágil, são facilmente liberados pelas terminações nervosas e têm padrão de disponibilidade na pele e internalização celular pouco estudadas (BRAIN & CAMBRIDGE, 1996; WEIDNER *et al.*, 2000).

A epilação poderia liberar NP's cutâneos, já que a retirada de pelos, seja qual for o método, também implica em microtraumas na pele do rato. Não há na literatura estudos que determinem o tempo de degradação dos neuropeptídeos no interstício da pele e foi necessário determinar em quanto tempo essas substâncias voltam às concentrações fisiológicas na pele após uma epilação. Em estudo realizado, ainda não publicado, detectou-se que a SP e o CGRP voltam aos valores basais em um mínimo de 30 minutos após estímulo único. Sendo assim, estabeleceu-se um tempo de 30 minutos como padrão para se iniciar o experimento após a epilação, quando as concentrações de ambos os neuropeptídeos já estivessem comprovadamente em níveis fisiológicos. Nem DRUCKER *et al.*, em 1998, nem RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON, em 2005, aguardaram algum tempo após a epilação, o que poderia representar viés na quantificação de NP's na pele.

O presente estudo buscou uma maneira de quantificar diretamente os neuropeptídeos na pele para obter resultados mais confiáveis e reprodutíveis. O método de escolha para quantificação direta foi o *Western blotting*. No entanto, foi necessário o desenvolvimento de um processo laboratorial pioneiro para suplantiar certas dificuldades técnicas. O

desenvolvimento do WB para quantificar NP's deu-se no Laboratório de Neurocirurgia Experimental - LIM 45 da Universidade de São Paulo, USP (Coordenador: Prof. Dr. Gerson Chadi).

Pesquisas que investigam neuropeptídeos na pele de animais *in vivo* frequentemente adotam a imuno-histoquímica (IHQ) como método de quantificação (RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON, 2005). A IHQ é um método de quantificação indireta, onde a substância marcada fica fluorescente ao microscópio confocal e é contada por um ou mais operadores humanos através de técnicas de amostragem e estereologia (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON, 2005). A IHQ apresenta as vantagens de ser um método tecnicamente acessível, bem compreendido e pouco oneroso, pois os anticorpos primários e secundários estão entre os mais baratos do mercado. Os marcadores fluorescentes, como a fluoresceína isotiocianato (FITC), foram os primeiros a ser utilizados, demonstrando a localização de neuropeptídeos em fibras nervosas que, em cortes espessos, permite observar o trajeto sinuoso das fibras pelo tecido estudado. Assim, a IHQ é um método morfológico que se presta a determinação topográfica dos elementos imunomarcados e, deste modo, qualitativa de eventos estudados. No entanto, a marcação não é permanente e a maioria dos marcadores tende a perder sua fluorescência num curto período de tempo, principalmente sob a ação de luz, dificultando a documentação de lâminas através de fotografia microscópica. Além disso, tecidos fixados em formalina tendem a ser autofluorescentes, e, quando contêm catecolaminas, podem ser induzidos a emitir fluorescência específica de cor aproximada à emitida pela fluoresceína. A IHQ presta-se bem a informações qualitativas, contudo alguns autores desenvolveram métodos para sua quantificação,

automatizados ou não, que permitissem comparações (HENDERSON, TERENGI, FERGUSON, 2011). No entanto, a quantificação das substâncias é indireta, operador-dependente e pode apresentar significativa variabilidade interexaminadores e imprecisão de resultados. Outras desvantagens da utilização da IHQ para a quantificação são: o manuseio excessivo das amostras e o tempo de execução das fases, dificultando o processamento simultâneo dos grupos experimentais. Entretanto, a maior limitação da IHQ como método quantitativo é a impossibilidade de fazer as marcações de controle de inespecificidade nas mesmas amostras (seções do tecido) submetidas às marcações em questão e controle quantitativo do *background*.

Alguns estudos têm utilizado um método de quantificação da secreção de neuropeptídeos no interstício da pele por meio de técnica de microdiálise (MD) seguida de quantificação por ELISA (WEIDNER *et al.*, 2000). A MD é um processo onde cateteres de entrada e de saída são introduzidos na derme com um espaçamento entre si. As substâncias do interstício são então captadas e esse lavado é encaminhado para quantificação proteica pelo difundido método de ELISA (SMITH & LIU, 2002). As vantagens desse método são a quantificação direta, de significativa acurácia, em valores absolutos, com unidades em molar e precisão digital de um leitor específico. Quanto às desvantagens, a MD é tecnicamente complexa e trabalhosa, além de trazer alguns vieses devido à necessidade de cateteres inseridos na pele, que por si só poderiam estimular a liberação de substâncias inflamatórias e imunológicas, como: histamina, serotonina, prostaglandinas, NGF, além de neuropeptídeos (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). A utilização do ELISA também é dispendiosa devido ao alto preço dos anticorpos primários e secundários.

O Radioimunoensaio (RIE) também foi utilizado para detecção de neuropeptídeos em trabalhos científicos na pele (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008). O RIE é um método preciso, específico e relativamente barato. No entanto, seu uso é restrito devido à necessidade de marcadores radioativos que requerem precauções especiais de instalação, manuseio e licença.

Esse estudo utilizou o WB por ser um método viável para detecção de neuropeptídeos na pele, com alta sensibilidade e especificidade, reprodutibilidade e acessibilidade técnica e econômica. No entanto, por se tratar de uma técnica demorada e com várias etapas de execução, o autor acredita que o WB tem sua aplicação prática dificultada, principalmente quando se emprega número de amostras significativo. Por isso, sua utilização costuma ser restrita aos trabalhos de pesquisa, em detrimento de outras metodologias que são mais rápidas e de fácil execução, como a IHQ. A técnica de WB, utilizada nesse estudo, contorna sua principal desvantagem que é a dificuldade técnica decorrente da extração proteica de um tecido de alta densidade como a derme. Tais limitações técnicas foram ultrapassadas adaptando as técnicas clássicas de WB com: (1) manipulação específica das amostras com séries de congelamentos e descongelamentos, maceração mais cuidadosa e uso de homogeneizador mais potente; (2) utilização de reagentes de lise em proporções maiores; (3) inibição de proteases em proporções maiores e (4) utilização de meios de transferência proteica específicos para a pele, como a membrana de PVDF, já que a membrana habitual de nitrocelulose não foi eficaz.

A demarcação visual com caneta da área a ser examinada seria conveniente para o experimento, mas um estudo-piloto demonstrou que a tinta das canetas dermográficas, ao pigmentar as camadas superficiais da

derme, interfere no método de quantificação dos neuropeptídeos na placa de gel do WB. Portanto, qualquer marcação da pele dos ratos com caneta deve ficar fora da área da amostra coletada para análise, e servir apenas de referência operacional para o experimento. Por isso o pesquisador utilizou demarcação da área, com moldes de propileno que seriam inócuos ao método de quantificação por WB.

O WB não distingue qual a localização do neuropeptídeo dentro da amostra, isto é, não é possível dizer se ele está dentro de vesículas nas terminações nervosas, ou se ele já foi excretado e encontra-se no meio intersticial, ou mesmo se já foi internalizado na célula-alvo.

Outros métodos seriam capazes de fazer essa distinção precisamente, sobretudo a MD onde apenas o lavado intersticial é analisado e marcado pelo ELISA (WEIDNER *et al.*, 2000). Estudos, onde a posição exata do neuropeptídeo é de extrema importância, podem se beneficiar mais de MD com ELISA do que com o presente modelo experimental, por isso nenhum método deve ser considerado definitivo. O WB quantitativo permite a análise quantitativa e segura dos neuropeptídeos, pois possibilita a retirada dos valores do *background* do filme e a normatização dos valores específicos do marcador em questão, em cada amostra, pelos valores de um marcador estrutural, no caso a beta-actina.

O CGRP é, comprovadamente, um vasodilatador muito eficaz, como demonstrado por ESTEVES JUNIOR *et al.* (2009), que comprovaram seus efeitos no aumento da viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. Esse efeito é provavelmente devido ao aumento de perfusão do retalho por dilatação duradoura das arteríolas pré-capilares, o que aumentaria o fluxo sanguíneo e a perfusão tecidual, no entanto sem provocar extravasamento plasmático (WEIDNER *et al.*, 2000).

Outros meios químicos e físicos também parecem influenciar a secreção de NP's. RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON em 2005, investigaram a influência de campos magnéticos sobre a liberação de NP's na pele e não observaram diferença na quantificação indireta por IHQ. Considerando as limitações desse método de quantificação, os autores relataram uma secreção menor de SP e uma secreção maior de CGRP nas amostras após o estímulo por campos magnéticos.

Segundo ROOK & MCCARSON, em 2007, a morfina tópica sobre ferimentos retardam a cicatrização. Em estudo onde foram injetados soluções de morfina, antagonistas de receptores NK-1 e NK-2 e morfina combinada com SP, esses autores demonstraram que a morfina atrasou a cicatrização através da inibição de secreção de SP e neurocinina A (NKA), efeito esse revertido ao se injetar esses NP's concomitantemente. O presente estudo mostrou que a expansão cutânea também inibe a liberação de SP e poderiam ter os mesmos resultados da morfina, alterando a morfologia cicatricial e atrasando a cicatrização cutânea. Porém serão necessários mais estudos para a comprovação desse evento.

Para averiguar a possibilidade de que corticoides poderiam inibir a inflamação neurogênica, assim como inibem os processos inflamatórios clássicos, SMITH & LIU, em 2002, testaram corticoides tópicos e sistêmicos, em uso prolongado e pontual, concomitantes a ferimentos em orelhas de ratos. Os autores observaram um aumento nos níveis de SP e NGF após uso crônico de corticoides tópicos (sete dias em ratos), atribuindo a esse mecanismo o advento de dermatite atópica em humanos que fazem uso inapropriado de corticoides tópicos. De fato, MISERY, em 2011, ao escrever um artigo de revisão abrangendo as funções imunológicas do sistema nervoso na pele, ressalta trabalhos que

comprovam as funções imunomoduladoras da SP e do CGRP na pele, sobretudo nas atopias. Segundo os estudos citados, os corticoides parecem não inibir a IN, mas faz-se necessário outros estudos que abordem esse tema diretamente.

A inflamação neurogênica está envolvida nos processos fisiológicos e patológicos da cicatrização (PAVLOVIC *et al.*, 2011); por isso a possibilidade de modular suas fases iniciais (atrasando-a, inibindo-a, ou estimulando-a), traria a perspectiva de controlar tais processos, eventualmente melhorando o tempo de cicatrização normal e corrigindo as cicatrizações patológicas.

O uso de expansores cutâneos é uma das maneiras de influenciar a liberação de NP's e, portanto merecem destaque nas perspectivas para futuro uso clínico, visando controlar eventos fisiológicos e patológicos que envolvem a inflamação neurogênica.

Na área da clínica, doenças cutâneas com origem neuropeptidérgica, como psoríase e dermatites atópicas e o quelóide (AKAISHI, OGAWA, HYAKUSOKU, 2008) poderiam se beneficiar de um complemento terapêutico através da modulação da secreção de neuropeptídeos, visando um melhor controle dessas patologias além do tratamento clássico atual.

Na área da cirurgia, o conhecimento de que a expansão cutânea inibe a liberação de SP pode contribuir para o uso desses expansores cutâneos, quando se desejar inibir a inflamação neurogênica, ou talvez atrasar o processo cicatricial. Na prática cirúrgica, onde certas intervenções podem ser realizadas em indivíduos propensos, a inibição de SP poderia trazer uma redução da contração cicatricial, uma menor resistência dos pontos cirúrgicos e uma cicatrização com menor força tênsil, unicamente pelo uso da expansão cutânea associada. Por outro lado, procedimentos cirúrgicos

onde existe chance de retrações cutâneas, formação de bridas ou qualquer advento de uma cicatrização exacerbada, comum em pacientes queimados ou vítimas de traumas, a expansão cutânea é uma das hipóteses de uso em seu arsenal terapêutico. Assim sendo, protocolos cirúrgicos seriam passíveis de revisão, considerando-se conceitos de modulação de processos inflamatórios.

Da mesma forma, as cicatrizes fibroproliferativas, como cicatrizes hipertróficas e queloides, merecem maiores estudos quanto à inclusão de expansores cutâneos em seu tratamento. Enquanto um modelo animal para estudos de cicatriz hipertrófica estiver sendo desenvolvido (ENGRAV *et al.*, 2011), estudos terapêuticos em humanos com a expansão cutânea concomitante ao já consagrado corticoide, poderia modular sua patogênese e impactar num maior sucesso de prevenção e recidiva pós-cirúrgica.

Uma das perguntas mais relevantes que esse trabalho levanta é sobre a real influência da SP no resultado final da cicatriz. Estudos anteriores mostram que a SP parece, de fato, contribuir para algum retardamento nas fases iniciais da cicatrização que precisariam ser mais bem caracterizados. No entanto, a influência da SP nas fases finais da cicatrização carece de mais estudos em animais e *in vitro*, para depois ser testada em humanos.

O CGRP mostra indícios de não participar de modo direto sobre as alterações cicatriciais descritas por outros autores (SMITH & LIU, 2002; ROOSTERMAN *et al.*, 2006; ZEGARSKA, LELIŃSKA, TYRAKOWSKI, 2006; LEFFLER *et al.*, 2008). São necessários maiores estudos para se definir as consequências das atividades imunomoduladoras e vasodilatadoras do CGRP, assim como sua real função na cicatrização.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. O expansor de tecido na pele de rato, com expansão imediata e a expansão em duas semanas, reduziu a secreção de SP nas terminações nervosas e inibe a inflamação neurogênica pelas vias bioquímicas ativadas pela SP.
2. A meia expansão não influenciou na secreção de SP e CGRP.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses. *Med Hypotheses*. 2008;71(1):32-8.

Almeida Júnior GL. Reconstrução mamária imediata com expensor de tecido: estudo retrospectivo. *Rev Bras Cir Plást*. 2009;24(1):36-42.

Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR, Chadi G. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res*. 2011 Jun 7;1394:90-104.

Besne I, Descombes C, Breton L. Effect of age and anatomical site on density of sensory innervation in human epidermis. *Arch Dermatol*. 2002 Nov;138(11):1445-50.

Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett*. 2008 Jun 6;437(3):199-202.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Brain SD, Cambridge H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol*. 1996 Jun;27(4):607-11.

Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev*. 2004 Jul;84(3):903-34.

Brower MC, Johnson ME. Adverse effects of local anesthetic infiltration on wound healing. *Reg Anesth Pain Med*. 2003 May-Jun;28(3):233-40.

Caviedes-Bucheli J, Munoz HR, Azuero-Holguin MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):773-88.

- Chadi G, Silva C, Maximino JR, Fuxe K, da Silva GO. Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. *Brain Res.* 2008 Jan 23;1190:23-38.
- Chvapil M, Hameroff SR, O'Dea K, Peacock EE, Jr. Local anesthetics and wound healing. *J Surg Res.* 1979 Dec;27(6):367-71.
- Codivilla A. On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *J Bone Joint Surg Am.* 1905 Apr 1;s2-2(4):353-69.
- Cunha MS, Nakamoto HA, Herson MR, Faes JC, Gemperli R, Ferreira MC. Tissue expander complications in plastic surgery: a 10-year experience. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2002 May-Jun;57(3):93-7.
- Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005 Apr;230(4):271-80.
- Drucker M, Cardenas E, Arizti P, Valenzuela A, Gamboa A. Experimental studies on the effect of lidocaine on wound healing. *World J Surg.* 1998 Apr;22(4):394-7; discussion 7-8.
- Engrav LH, Tuggle CK, Kerr KF, Zhu KQ, Numhom S, Couture OP, Beyer RP, Hocking AM, Carrougher GJ, Ramos ML, Klein MB, Gibran NS. Functional genomics unique to week 20 post wounding in the deep cone/fat dome of the Duroc/Yorkshire porcine model of fibroproliferative scarring. *PLoS One.* 2011;6(4):e19024.
- Esteves Junior I, Tacani PM, Liggieri VC, Ruggi BG, Ferreira LM, Liebano RE. Histamine iontophoresis on the viability of random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2009 Jan-Feb;24(1):48-51.
- Ferreira LM, Gragnani A, Furtado F, Hochman B. Control of the skin scarring response. *An Acad Bras Cienc.* 2009 Sep;81(3):623-9.
- Fujisawa K, Hirata H, Inada H, Morita A, Hibasami H. Elongation of wallerian degenerating nerve with a tissue expander: a functional,

morphometrical, and immunohistochemical study. *Microsurgery*. 1995;16(10):684-91.

Furutani K, Koro O, Hide M, Yamamoto S. Substance P- and antigen-induced release of leukotriene B4, prostaglandin D2 and histamine from guinea pig skin by different mechanisms in vitro. *Arch Dermatol Res*. 1999 Jul-Aug;291(7-8):466-73.

Gibson T. Physical properties of skin. *J Anat*. 1969 Jul;105(Pt 1):183-4.

Hara M, Toyoda M, Yaar M, Bhawan J, Avila EM, Penner IR, Gilchrist BA. Innervation of melanocytes in human skin. *J Exp Med*. 1996 Oct 1;184(4):1385-95.

Henderson J, Terenghi G, Ferguson MW. The reinnervation and revascularisation pattern of scarless murine fetal wounds. *J Anat*. 2011 Jun;218(6):660-7.

Hochman B, Nahas FX, Sobral CS, Arias V, Locali RF, Juliano Y, Ferreira LM. Nerve fibres: a possible role in keloid pathogenesis. *Br J Dermatol*. 2008 Mar;158(3):651-2.

Hochman B, Furtado F, Isoldi FC, Nishioka MA, Ferreira LM. Psychological stress and skin wound healing: new highlights. *Psychology of stress: new research*. New York: Nova Science Publishers; 2013

Jiang BG, Shibata M, Wang SH. [Experimental study of peripheral nerve expansion with a tissue expander]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 1994 Feb;32(2):93-6. Chinese.

Jiang HY, Guo DJ, Pan B, Guo WH, Zhuang HX. [Clinical significance of vascular distribution type of the expanded skin in the mastoid region in congenital microtia]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2007 Sep;23(5):389-90. Chinese.

Johnston DE. Tissue expanders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1990 Jan;20(1):227-34.

Kahler CM, Sitte BA, Reinisch N, Wiedermann CJ. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by substance P. *Eur J Pharmacol.* 1993 Nov 16;249(3):281-6.

Leffler A, Fischer MJ, Rehner D, Kienel S, Kistner K, Sauer SK, Gavva NR, Reeh PW, Nau C. The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):763-76.

Li Y, Tian S, Douglas SD, Ho WZ. Morphine Up-regulates expression of substance P and its receptor in human blood mononuclear phagocytes and lymphocytes. *Cell Immunol.* 2000 Nov 1;205(2):120-7.

Liang Z, Engrav LH, Muangman P, Muffley LA, Zhu KQ, Carrougher GJ, Underwood RA, Gibran NS. Nerve quantification in female red Duroc pig (FRDP) scar compared to human hypertrophic scar. *Burns.* 2004 Feb;30(1):57-64.

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003 Dec;75(4):469-86.

McGovern UB, Jones KT, Sharpe GR. Intracellular calcium as a second messenger following growth stimulation of human keratinocytes. *Br J Dermatol.* 1995 Jun;132(6):892-6.

Mendonca RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol.* 2009 Jul;84(3):257-62.

Misery L. Atopic dermatitis and the nervous system. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011 Dec;41(3):259-66.

Mishima T, Ito Y, Hosono K, Tamura Y, Uchida Y, Hirata M, Suzuki T, Amano H, Kato S, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, Watanabe M, Majima M. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Feb;300(2):H431-9.

Moore EL, Salvatore CA. Targeting a family B GPCR/RAMP receptor complex: CGRP receptor antagonists and migraine. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(1):66-78.

Pan B, Jiang HY, Zhuang HX, Zhao YY, Yang QH, He LR, Han J, Wang SJ, Lin LC. [Application of quantitative tissue expansion in ear reconstruction]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2009 Jul;25(4):254-7. Chinese.

Pavlovic S, Liezmann C, Blois SM, Joachim R, Kruse J, Romani N, et al. Substance P is a key mediator of stress-induced protection from allergic sensitization via modified antigen presentation. *J Immunol*. 2011 Jan 15;186(2):848-55.

Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, Seiffert K, Hordinsky MK, Ansel JC, Paus R, Scholzen TE. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol*. 2006 Sep;126(9):1937-47.

Quinlan KL, Song IS, Naik SM, Letran EL, Olerud JE, Bunnett NW, Armstrong CA, Caughman SW, Ansel JC. VCAM-1 expression on human dermal microvascular endothelial cells is directly and specifically up-regulated by substance P. *J Immunol*. 1999 Feb 1;162(3):1656-61.

Radovan C. Tissue expansion in soft-tissue reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1984 Oct;74(4):482-92.

Rajkovic V, Matavulj M, Johansson O. The effect of extremely low-frequency electromagnetic fields on skin and thyroid amine- and peptide-containing cells in rats: an immunohistochemical and morphometrical study. *Environ Res*. 2005 Nov;99(3):369-77.

Rodrigues FV, Hochman B, Wood VT, Simoes MJ, Juliano Y, Ferreira LM. Effects of lidocaine with epinephrine or with buffer on wound healing in rat skin. *Wound Repair Regen*. 2011 Mar-Apr;19(2):223-8.

Rook JM, McCarson KE. Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. *Biochem Pharmacol*. 2007 Sep 1;74(5):752-7.

Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*. 2006 Oct;86(4):1309-79.

Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci*. 2001 Feb;16:33-7.

Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol*. 1998 Apr-Jun;7(2-3):81-96.

Smith PG, Liu M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2002 Mar;307(3):281-91.

Song IS, Bunnett NW, Olerud JE, Harten B, Steinhoff M, Brown JR, Sung KJ, Armstrong CA, Ansel JC. Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). *Exp Dermatol*. 2000 Feb;9(1):42-52.

Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol*. 2003 Nov;139(11):1479-88.

Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Webster E, Chrousos G. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology*. 1998 Jan;139(1):403-13.

Wallengren J, Hakanson R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. *Eur J Pharmacol*. 1987 Nov 10;143(2):267-73.

Wallengren J, Chen D, Sundler F. Neuropeptide-containing C-fibres and wound healing in rat skin. Neither capsaicin nor peripheral neurotomy affect the rate of healing. *Br J Dermatol*. 1999 Mar;140(3):400-8.

Weidner C, Klede M, Rukwied R, Lischetzki G, Neisius U, Skov PS, Petersen LJ, Schmelz M. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin--a microdialysis study. *J Invest Dermatol*. 2000 Dec;115(6):1015-20.

Zegarska B, Lelińska A, Tyrakowski T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep.* 2006 Jan-Feb;58(1):13-21.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos da experimentação animal (no caso do uso dos mesmos) [Internet]. 1991 [citado 2013 Abr 8]. Disponível em: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>.

DeCS Descritores em Ciências da Saúde [Internet]. São Paulo: BIREME; [cited 2010 May 20]. Available from: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira LM. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora; 2008.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Writing and editing for biomedical publication [Internet]. Vancouver (CA); 2007 Oct [cited 2012 May 20]. Available from: <http://www.icmje.org/>

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Nomina anatómica veterinária. 3a ed. New York: Ithaca; 1983.

Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde. Resolução no. 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 1996.

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001.

ABSTRACT

ABSTRACT


The neurogenic inflammation (IN) is one of the first events of healing. Before a nociceptive stimulus in the skin, there is release of neuropeptides (NP's) skin pro-inflammatory substances that are produced by the neurons of the dorsal root ganglia and secreted nerve endings in the skin, triggering the inflammatory phase of wound healing. The expansion skin, widely used in plastic surgery as a resource to gain real skin to skin flap rotation and thus cover large skin defects arising out of the loss is the removal of tumors, accidents of various origins and reconstructions of parts of the human body, but nothing is known about the action of neuropeptides CGRP and SP in these skin areas expanded. **OBJECTIVE:** To evaluate the effect of expanding the skin secretion of NP's SP and CGRP in the skin of mice. **METHODS:** 28 Wistar rats divided into 4 groups (n = 7): group C (empty Expander), EN group (Normal Expansion 15days), group (Half Expansion) and group EI (Instant Expansion on the collection day). After general anesthesia, each group has introduced a skin expander of 22ml capacity with the CO group only without the expander breathes it in no time, EM Group expander inflated with half capacity (11ml) after introducing a week later inflated with 11ml more, equal to group ME but with only half the capacity of the expander (11ml) and nothing else, and EI group expander being inflated with total capacity (22ml), waited a minute before the death of the animal and data collection . Next, each mouse was subjected to induced death painless and a skin sample from each mouse with standardized area and volume were taken from the center line incision with the aid of electric dermatome and 8mm dermal punch. This sample was sent for quantification of CGRP and SP by Western Blotting and followed for statistical analysis. **RESULTS:** In relation to the presence of

NP's in the skin of rats in relation to neuropeptide SP was decreasing concentration being the highest concentration of CO Group and so on with the following GE Group ME and EI, as the neuropeptide CGRP have similar values in the evaluation of CGRP-5kDa (actual measure) and maintenance of the concentrations of CO Groups, ME and EI, as a sharp drop in the concentration EN group (normal expansion). **CONCLUSION:** It was observed that the slower expansion less concentration of neuropeptides soon denervation can be observed. Thus, the slow and progressive cutaneous expansion inhibits the release of neuropeptides reducing the inflammatory response.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP – CEP 0005/11

 <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO 2014</p>	<p>Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina</p>	<p>Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo</p>
		<p>São Paulo, 14 de janeiro de 2011. CEP 0005/11</p>
<p>Ilmo(a). Sr(a). Pesquisador(a) JOSE OCTAVIO GONÇALVES DE FREITAS Co-Investigadores: Lydia Masako Ferreira (orientadora), Bernardo Hochman Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo Patrocinador: Recursos Próprios.</p>		
<p><u>PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL</u></p>		
<p>Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “Terminações nervosas e neuropeptídeos CGRP e SP em pele de ratos após expansão cutânea”.</p>		
<p>CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria B - estudo crônico.</p>		
<p>RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.</p>		
<p>OBJETIVOS: Investigar as terminações nervosas da pele e os neuropeptídeos CGRP e SP na pele expandida em ratos..</p>		
<p>RESUMO: Estudo com ratos Wistar, machos, adultos. Anestésico: ketamina e xilasina. Eutanásia: hiperdosagem anestésica e secção de vasos. Serão constituídos 3 grupos de 12 ratos: grupo 1- será feita incisão na região dorsal do animal e descolamento do setor correspondente a colocação do expansor, simulando a cirurgia de colocação do expansor; grupo 2- será feita a incisão no dorso do animal, descolamento subcutâneo de área pertinente à área ocupada pelo expansor e introdução do expansor de capacidade máxima de 15 ml, redondo com válvula remota. Neste grupo não haverá expansão do mesmo; grupo 3- será feita a incisão no dorso do animal, descolamento subcutâneo da área ocupada pelo expansor e introdução do mesmo com capacidade máxima de 15 ml, redondo com válvula remota. Neste grupo haverá expansão do mesmo iniciando-se uma semana após sua colocação com valor de 5 ml/semana até atingir 15 ml. Após 5 dias, será retirada biópsia cutânea para análise anatomopatológica..</p>		
<p>FUNDAMENTOS E RACIONAL: Em cirurgia plástica, os grandes desafios estão quando existem perdas cutâneas importantes e sua escassez leva a composição de retalhos livres ou enxertos. No Brasil, a grande quantidade de acidentes de trânsito, tumores de pele agigantados pela ineficiência de diagnóstico, tratamento rápido e adequado e os defeitos advindos de queimaduras, tornam a expansão tecidual de áreas adjuntas ao defeito a ser reparado, uma das únicas possibilidades a ser realizada. Este estudo pretende verificar a existência ou não de alterações nervosas na pele expandida em modelo experimental..</p>		
<p>MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo.</p>		
<p>DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 2705,00.</p>		
<p>CRONOGRAMA: 12 meses.</p>		
<p>Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162</p>		<p>1 5</p>



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

OBJETIVO ACADÊMICO: Não envolve obtenção de título.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 9/1/2012 e 8/1/2013.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0005/11

APÊNDICE 2

Tabela de dados obtidos do *Western blotting* para SP, em relação a cada grupo.

SP

CO	ME	EI	EN
68.135	63.124	38.769	29.098
40.381	26.830	29.448	28.919
30.869	33.928	34.458	37.269
35.933	33.523	39.727	27.016
39.260	31.727	28.938	35.241
35.605	33.556	39.199	23.443
38.890	44.926	31.970	16.990

APÊNDICE 3

Tabela de dados obtidos do *Western blotting* para pró-CGRP, em relação a cada grupo.

CGRP 15 Kda

CO	ME	EI	FN
30.519	23.497	33.964	25.640
36.849	36.959	29.053	30.403
38.789	36.219	35.488	22.390
32.813	29.212	28.383	21.170
19.372	16.237	15.337	13.200
18.701	17.615	17.703	17.948
27.370	25.711	29.256	13.050

APÊNDICE 4

Tabela de dados obtidos do *Western blotting* para CGRP (forma ativa), em relação a cada grupo.

CGRP 5 Kda

CO	ME	EI	EN
36.016	34.999	37.240	33.153
38.651	33.423	35.535	29.947
23.148	38.226	30.086	29.497
43.472	36.804	44.034	35.150
37.931	38.340	35.484	38.809
36.187	34.474	45.947	36.673
34.240	39.566	40.833	50.062

APÊNDICE 5

Valores da quantificação de pró-CGRP, SP e CGRP para cada grupo, submetidos a teste de ANOVA.

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
pró-CGRP-15kda	CO	2,558	0,533	2,595	2,020	3,417	7	0,007
	EN	1,821	0,200	1,761	1,712	2,281	7	
	ME	1,893	0,413	1,903	1,231	2,620	7	
	EI	1,930	0,292	2,039	1,433	2,282	7	
SP	CO	0,450	0,125	0,330	0,288	0,666	7	0,002
	EN	0,224	0,083	0,245	0,109	0,383	7	
	ME	0,315	0,183	0,343	0,191	0,543	7	
	EI	0,231	0,057	0,238	0,147	0,312	7	
CGRP-forma ativa-5kda	CO	1,611	0,768	1,423	0,841	2,897	7	0,713
	EN	1,323	0,766	1,122	0,641	2,900	7	
	ME	1,556	0,696	1,138	0,968	2,617	7	
	EI	1,326	0,595	1,233	0,733	2,551	7	

Descrição da quantificação de neuropeptídeos cutâneos para cada grupo, seguido de significância estatística segundo teste de ANOVA. A SP e o pró-CGRP apresentaram diferença estatisticamente significativa entre seus grupos.

APÊNDICE 6

Valores da quantificação de pró-CGRP e SP, submetidos a teste de Tukey.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
pró-CGRP- 15kda	CO EN	0,816	0,220	0,182	0,103	1,299
	CO EI	0,595	0,220	0,022	0,060	1,276
	CO ME	0,768	0,220	0,021	0,090	1,322
	ME EN	-0,071	0,220	0,031	0,675	0,424
	ME EI	-0,060	0,220	0,787	0,712	0,655
SP	CO EN	0,223	0,057	0,029	0,058	0,332
	CO EI	0,029	0,070	0,023	-0,170	0,227
	CO ME	0,227	0,067	0,023	0,044	0,405
	EN EI	-0,210	0,071	0,024	-0,398	-0,018
	EN ME	-0,017	0,067	0,010	-0,209	0,181
	ME EI	0,189	0,070	0,027	0,001	0,388

Resultado das comparações múltiplas pareadas de Tukey para SP e pró-CGRP. Quanto à SP, o grupo CO e o grupo EN apresentaram redução desses NP^S nas amostras em relação ao grupo CO e ao grupo ME, sem diferença entre si. Quanto ao pró-CGRP, todos os grupos apresentaram diminuição da quantidade dessa substância em relação ao grupo CO, sem diferença entre si.

APÊNDICE 7

Randomização do Projeto

TERMINAÇÕES NERVOSAS E NEUROPEPTÍDEOS CGRP E SP EM PELE DE RATOS APÓS EXPANSÃO CUTÂNEA.

1. **Expansão Imediata** _____
2. **Controle Absoluto** _____
3. **Controle(c/ expansor vazio)** _____
4. **Controle(c/ expansor vazio)** _____
5. **Expansão Imediata** _____
6. **Expansão(em duas semanas)** _____
7. **Controle(c/ expansor vazio)** _____
8. **Expansão Imediata** _____
9. **Expansão Imediata** _____
10. **Expansão(em duas semanas)** _____
11. **Expansão Imediata** _____
12. **Controle(c/ expansor vazio)** _____
13. **Controle(c/ expansor vazio)** _____
14. **Expansão Imediata** _____
15. **Controle Absoluto** _____
16. **Controle Absoluto** _____
17. **Controle Absoluto** _____
18. **Controle Absoluto** _____
19. **Expansão(em duas semanas)** _____
20. **Controle(c/ expansor vazio)** _____
21. **Controle Absoluto** _____
22. **Expansão(em duas semanas)** _____
23. **Expansão(em duas semanas)** _____
24. **Expansão Imediata** _____
25. **Expansão(em duas semanas)** _____
26. **Controle Absoluto** _____
27. **Controle(c/ expansor vazio)** _____
28. **Expansão(em duas semanas)** _____

A Randomization Plan from *<http://www.randomization.com>*

28 subjects randomized into 1 block To reproduce this plan, use the seed 17270

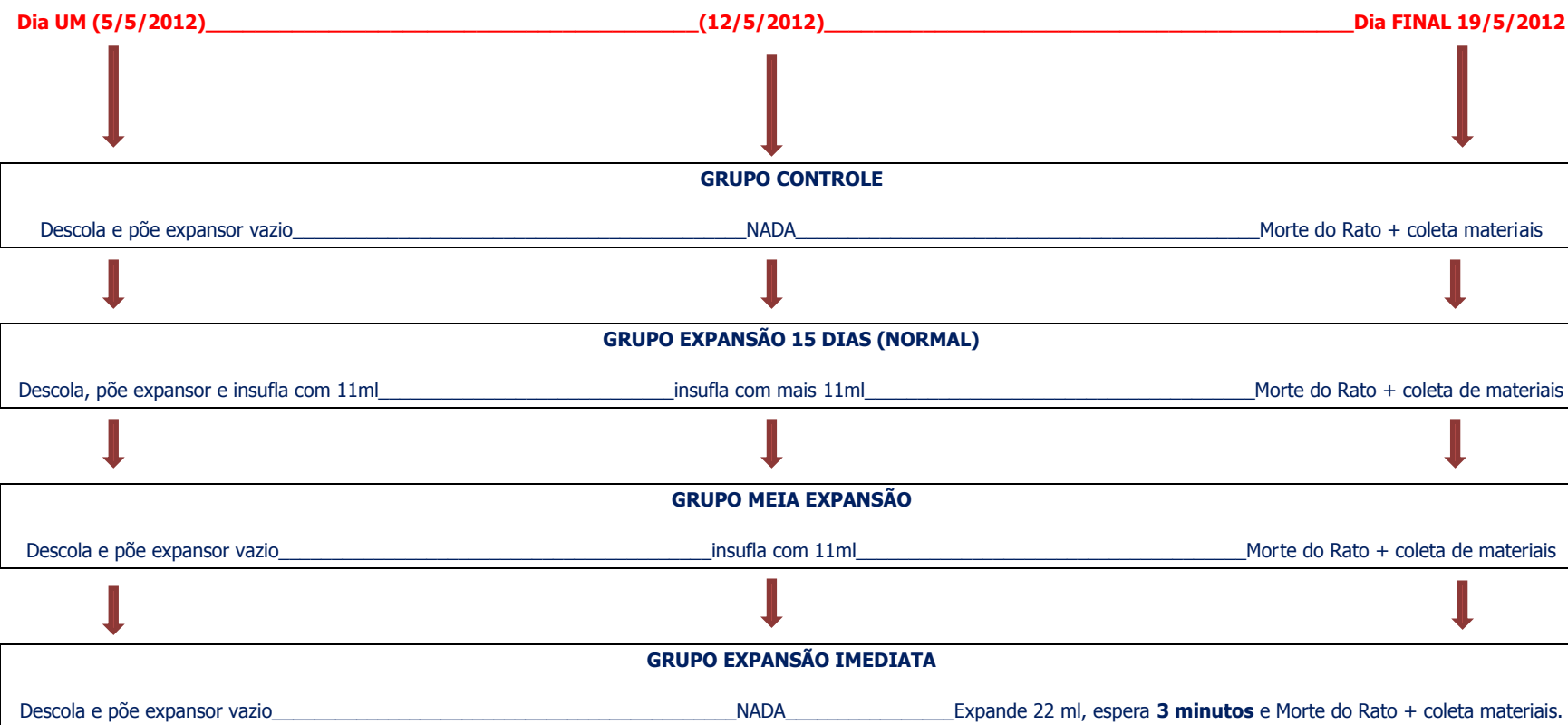
Randomization plan created on terça-feira, 1 de maio de 2012 09:26:17

DESENHO DO PROJETO

NEUROPEPTÍDEOS CGRP E SP EM PELE DE RATOS APÓS EXPANSÃO CUTÂNEA

José Octavio Gonçalves de Freitas

LINHA DO TEMPO



APÊNDICE 9

EUROSILICONE
a GC Aesthetics Company Brasil

São Paulo, 28 de maio de 2013.

DECLARAÇÃO

A Eurosilicone Brasil Importação e Exportação Ltda., cita a Al. Araguaia, 230- Alphaville Industrial – Barueri – SP, CEP: 06455-000, inscrita com o **CNPJ**: 11.015.655/0001-50 IE: 206.279.295.110, **IM**: 5.55302-3 e **CCM**: 555302-3, vem através desta DECLARAR que:-

“O Expansor de Silicone para Ratos WISTAR / EUROSILICONE/ CIRURGIA PLÁSTICA/ UNIFESP-005/11, foi desenvolvido nos laboratórios da EUROSILICONE Francesa pelos seus técnicos e pelo Dr. José Octávio Gonçalves de Freitas, especialmente para sua TESE de Mestrado/Doutorado, não tendo interesse em patenteá-lo ou comercializa-lo a não ser sob solicitação direta.”

Sendo esta a expressão da verdade,

Subscrevemo-nos.

Eddie de Oliveira

Presidente da Eurosilicone Brasil.

ANEXOS

ANEXO 1

Máquina de cortar cabelo (utilizada para epilação dos ratos) – Marca WAHL®

The screenshot shows the WAHL website interface. At the top, there is a navigation bar with 'PRODUTOS' and links for 'Página Inicial', 'Sobre a Wahl', 'Wahl no mundo', 'Contato', 'Login', and 'Registre-Se'. The main header features the WAHL logo and the text 'A MARCA Nº 1 DO MUNDO'. Below this, a breadcrumb trail reads 'Você está aqui: Wahl Brasil > Linha Profissional > Máquinas de Cortar Cabelo > Super Taper'. The left sidebar contains a 'LINHA PROFISSIONAL' menu with categories like 'Lâminas de Corte', 'Máquinas de Aparar Cabelo', 'Máquinas de Cortar Cabelo', and 'Secadores de Cabelo'. A featured image of a woman is accompanied by the text 'Wahl Clipper' and 'Desde 1919, a marca preferida pelos profissionais do mundo inteiro!'. The main content area displays a large image of the Super Taper clipper. To its right, the text 'Super Taper' is displayed. Below the image, a list of features is provided: 'Cortador poderoso com motor vibratório.', 'Ideal para grandes exigências e uso contínuo.', 'Lâmina profissional à prova de ferrugem', 'Motor Shunt de maior potência.', 'Regulador de nível de corte.', and 'A máquina mais vendida da Wahl a nível mundial. 2 anos de garantia.'. An 'ESPECIFICAÇÕES' section lists 'Cutting Length: Pentas: nº1-3mm, nº2-6mm, nº3-10mm, nº4-13mm, nº5-19mm, nº6-25mm.' and 'Meins Voltage: Disponível em 2 voltagens, 110 e 220.'. The footer includes regional links and a list of countries/regions: 'Select country/region: | Wahl Argentina | Wahl Australia | Wahl Brasil | Wahl Canada | Wahl Canada (French) | Wahl China | Wahl España | Wahl Europe | Wahl Germany | Wahl Hungary | Wahl India | Wahl Japan | Wahl Mexico | Wahl Middle East | Wahl North Africa | Wahl Russia | Wahl South Africa | Wahl The Netherlands | Wahl United Kingdom | Wahl USA'.

Fonte:

Wahlglobal [Internet]. Rio de Janeiro: Wahl Clipper Brasil; [citado 2013 Abr 8]. Super Taper. Disponível em:

<http://www.wahlglobal.com/brazil/wahl/linha-profissional/maquinas-de-cortar-cabelo/super-taper.html>

ANEXO 2

Dermátomo Eléctrico – Marca Integra/Padgett®

The screenshot displays the Integra website interface. At the top left is the Integra logo with the tagline 'LIFE UNCERTAINTY'. To the right is a search bar with 'English:US' and a 'Search' button. Below the logo are navigation tabs for Home, About Integra, Products, Investors, Careers, and Contact. The main content area features a large banner for 'Integra™ Jarit® Instruments' with a background image of a honeycomb pattern. A left sidebar contains various utility links such as 'Catalogs', 'Cross Reference', 'Build a Tray', 'Instructions For Use', 'Service and Repair', 'Product Information', and 'Contact Us / Locate a Representative'. The main content area is titled 'Product Information' and includes tabs for 'Product Information', 'Downloads', and 'Request More Info.'. The 'Product Information' tab is active, showing details for the 'Model PI Electric Dermatome'. The text describes the device's development for precision and dependability, highlighting its ability to harvest skin grafts up to six inches wide. A list of features includes: 'Only six-inch powered dermatome available', 'Tested in tissue banks', 'Fewer seams', 'Two, three, four, five and six inch wide grafts', 'Can cover most hands or a small child's face', and 'Constant on/off switch option'. An image of the dermatome and its components is shown on the right. Below the text, order numbers and contact information are provided.

Model PI Electric Dermatome

The Model PI Electric Dermatome was developed in response to requests by leading tissue banks. We gave it all of the superior quality, precision, dependability and value a surgeon has come to expect from Padgett Instruments. Now, you can harvest a skin graft up to six inches wide using Padgett's electric Dermatome Model PI. A six-inch wide graft can cover most adult hands or a small child's face without seams. Facts and Features:

- Only six-inch powered dermatome available
- Tested in tissue banks
- Fewer seams
- Two, three, four, five and six inch wide grafts
- Can cover most hands or a small child's face
- Constant on/off switch option

Order Nubers: 3539-600: PADGETT Model PI Dermatome, complete, 120 Volt
 3539-600-230: PADGETT model PI Dermatome, complete, 230 Volts
 3539-602: Sterile 6-inch Dermatome Blades, Box of 10

If you prefer to receive this Instruction For Use in paper form, please contact our Technical Services Department by phone at 800-654-2673 or by e-mail at ReconUSProductSupportNJ@integralife.com.

Fonte:

Integra LifeSciences [Internet]. New Jersey: Integra LifeSciences Corporation; c2012. Jarit [cited 2013 Apr 8]. Available from: <http://www.integralife.com/Jarit/Jarit-Product-Detail.aspx?Product=121&ProductName=Model%20PI%20Electric%20Dermatome&ProductLineName=PADGETT%C2%AE&ProductLineID=158>

ANEXO 3

Punch cutâneo de 8 mm de diâmetro – Marca Richter®



FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Bastos EM, Sabino Neto M, Ferreira LM, Garcia EB, Liebano RE, Han YA. Modelo experimental de contratura capsular em implantes de silicone. *Acta Cir Bras.* 2003;18 (Edição Especial):22-8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Cabral LM, Ferreira LM, Simões MJ, Mora AO. Modelo experimental de dupla lesão no dorso de ratos, para estudo do processo de cicatrização da pele, utilizando-se a película de celulose. *Acta Cir Bras.* 2003;18 (Edição Especial):65-8.

Chadi G, Silva C, Maximino JR, Fuxe K, da Silva GO. Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. *Brain Res.* 2008 Jan 23;1190:23-38.

Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen: the use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol.* 1968;50:419-24.

Ferreira AB. *Miniaurélio século XXI escolar.* 4a ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2001.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras.* 2005;20(Suppl 2):2-9.