

TAÍS AMADIO MENEGAT

**MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA EM
PELE DE RATO**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

SÃO PAULO

2017

TAÍS AMADIO MENEGAT

**MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA EM
PELE DE RATO**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências**

SÃO PAULO

2017

Amadio Menegat, Taís

Modelo experimental de queimadura em pele de ratos / Taís Amadio Menegat. – São Paulo, 2017.

XIV, 50f.

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

Título em inglês: Skin Burn Experimental Model in Rats

1. Queimadura. 2. Experimentação Animal. 3. Ratos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

ORIENTADORA: Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA

COORIENTADORAS: Profa. ANDREA FERNANDES DE

OLIVEIRA

Profa. LEILA BLANES

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à nossa essência, Deus e Jesus Cristo, pois sem eles eu não teria forças para essa jornada; Nossa Senhora Aparecida, por ser essencial em minha vida, sempre guiando meus caminhos e me socorrendo nas horas de angústia.

À minha família, por sua capacidade de acreditar em mim e investir em meus sonhos. À minha mãe, Terezinha Ap. Gorgueira Amadio, ao seu cuidado e à sua dedicação, nos colocando em primeiro lugar sempre. À memória do meu pai, Mauricio Amadio, pois sua presença significou muito em nossas vidas, nos ensinando adjetivos como humildade, força, persistência e união familiar, sempre representando a nossa segurança. Sou eternamente grata por terem permitido que eu fosse filha de vocês neste plano. A meu irmão, Daniel Amadio, por sempre me apoiar em minhas decisões, por estar sempre ao meu lado. Amo demais vocês!

Ao meu eterno amor, João Paulo Rehder Menegat, por estar sempre ao meu lado em todas as situações, apoiando-me e me dando suporte para esta conquista, amo e amarei você para sempre.

Às minhas amigas, Gisleine de Jesus Fernandes e Claudete Fernandes, que tanto me incentivaram, apoiaram e ajudaram nesta jornada.

À minha querida tia postiça, Ana Maria Cury Rehder, pelo apoio e por ter parado tantas vezes com seus afazeres para as correções deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **PROFA. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, Coordenadora Medicina III da Capes, Pesquisadora CNPq 1 A, e orientadora deste trabalho, por ter me orientado durante todo o processo, sempre me guiando para o melhor do trabalho, agradeço pelas palavras de incentivo e pelas críticas construtivas, com elas aprendi demais; também por ser um exemplo de pesquisadora que luta em prol da ciência sempre baseada em evidência.

Ao **PROF. BERNARDO HOCHMAN** (*in memoriam*), Professor Orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, meu primeiro contato dentro da instituição, sempre me incentivando a saber mais, pesquisar e melhorar sempre. Deixou-nos de uma forma inesperada e ainda sentimos, e sentiremos por muito tempo, sua falta. Agradeço por ter tido a oportunidade de conviver e aprender com senhor. Fique na luz divina.

À **PROFA. ANDREA FERNANDES DE OLIVEIRA**, Professora e coorientadora deste estudo, coordenadora da UTQ da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/Hospital São Paulo, agradeço pela paciência e pela busca incessante de transformar este trabalho no que ele se tornou, por despertar em mim a vontade de aprender mais sobre o assunto de

queimados, a querer mergulhar nesse mar que tanto ainda podemos explorar.

À **PROFA. LEILA BLANES**, Professora e coorientadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional, por toda sua ajuda com correções que fizeram este trabalho chegar ao fim.

Ao **PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), pelo estímulo constante em todos os estudos realizados neste programa.

À querida amiga **MICHELE AKEMI NISHIOKA**, fisioterapeuta, mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pois sem sua ajuda jamais teria o manejo dos animais, agradeço por ter mostrado e me ensinado sua paixão pela pesquisa científica; iniciamos como colegas e finalizamos com uma grande amizade sempre nos encontrando em salas de aulas pelo Brasil.

À querida amiga **PAOLA MONTEIRO**, fisioterapeuta, mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, seu apoio foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À amiga **ERICA CALCAGNO RAYMUNDO DA SILVA**, fisioterapeuta, mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, agradeço por ter me apresentado o programa de Pós-Graduação e me auxiliado em todos os momentos necessários.

À amiga **MARIANA MERIDA CARRILLO NEGRÃO**, fisioterapeuta, mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com você, as pausas de produção entre um parágrafo e outro tornaram este trabalho mais leve.

Às secretarias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE e SILVANA APARECIDA DA COSTA ASSIS**, pela colaboração e organização.

Os meus **Sinceros Agradecimentos** a todos que, direta ou indiretamente, tornaram esse trabalho possível.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	Vi
LISTA DE FIGURA.....	X
LISTA DE TABELAS.....	Xi
LISTA DE GRÁFICOS.....	Xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	Xiii
RESUMO	Xiiv
ABSTRACT	Xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
3. LITERATURA	7
4. MÉTODO	14
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS	42
FONTES CONSULTADAS	48
APÊNDICE.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da distribuição dos grupos e subgrupos simulados e experimentais	16
Figura 2 - Demarcação da tricotomia – Linha A - limite cranial 7,0cm a partir do plano nasal do animal. Linha B - perpendicular ao plano sagital craniocaudal.....	17
Figura 3 - A -Marcação da lesão dentro da área da tricotomizada. B – Molde de PVC com raio de 3cm, o centro do molde corresponde ao ponto 1.....	18
Figura 4 - Parte superior do dispositivo de escaldadura	19
Figura 5 - Parte inferior do dispositivo de escaldadura	20
Figura 6 - Parte interna da caixa metálica com marcação dos pontos de alinhamento do animal	20
Figura 7 - A- Animal preso no molde de escaldadura; B- Parte interna da caixa metálica com alinhamento dos pontos	21
Figura 8 - Modelo experimental de escaldadura em temperatura 100°C	21
Figura 9 – Grau de queimadura – A- G1 – Primeiro grau; B- G2 – segundo grau; C- G3 – terceiro grau	22

Figura 10 – Localização da biópsia de pele dentro da lesão.....	23
Figura 11 - Presença de vasos na lâmina do G3.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Queimaduras relacionadas por grupo, em frequências absoluta e relativa	30
Tabela 2 – Medidas-resumo do número de vasos e mastócitos por grupo	31
Tabela 3 - Medidas-resumo da distância entre a epiderme e músculo estriado (mm) por grupo	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Intervalo de confiança de 95% para médias de números de vasos e mastócitos.....	30
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%	Porcentagem
ABA	<i>American Burn Association</i>
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
DA	Dano de ablação
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
Mg	Miligramma
mg/kg	Miligramma por quilogramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
°C	Grau Celsius
PVC	Policloreto de vinila
s	S

RESUMO

Introdução: Na literatura, observa-se a carência de modelo experimental em queimaduras reprodutível para auxiliar no avanço das pesquisas sobre cicatrização. **Objetivo:** Desenvolver modelo experimental de queimadura em pele de rato. **Método:** Neste estudo foram utilizados 35 ratos Wistar-EPM (*Rattus norvegicus*) adultos, machos, com peso entre 280 e 380 g, distribuídos em três grupos, contendo dez ratos cada: Grupo 1 (G1) caracterizado por ficar imerso na água à 100°C por três s, Grupo 2 (G2) por cinco s e Grupo 3 (G3) por dez s. Cinco animais foram utilizados num Grupo controle (GC). Após 24 horas, foi realizada a morte assistida indolor e realizada análise histológica para verificar densidade vascular, mastócitos, classificação da profundidade da lesão. A presença de ulceração na área queimada foi avaliada por grupos. **Resultados:** Foram analisados 28 animais. Sete animais foram excluídos por não terem sofrido lesão por queimadura decorrente da escaldadura apesar do tempo de exposição similar (quatro animais do G1 e três do G2) no GC foram coletadas biópsias de pele íntegra. No G3 houve maior ocorrência de ulceração (80,0%) quando comparado ao G1 (0,0%) e ao G2 (28,26%). A média do número de vasos do G1 e GC foram similares e ambas inferiores aos dos G2 e G3. Quanto aos mastócitos observou-se que os G2 e G3 apresentaram médias similares e superiores aos do GC, o que comprovou o grau da queimadura em cada grupo. **Conclusão:** O modelo experimental de queimadura em pele de rato foi desenvolvido, descrevendo as profundidades superficial, parcial e profunda.

ABSTRACT

EXPERIMENTAL MODEL OF SKIN BURN IN RATS

Introduction: In literature, there is a lack of experimental models in reproducible burns to help further research on wound healing. **Objective:** To develop an experimental model of skin burn on rat skin. **Method:** This study used 35 male adult Wistar-EPM rats (*Rattus norvegicus*), whose weight varied from 280g to 380g. All animals were distributed in 3 groups of 10 rats each: the G1 (Group 1) remained immersed in water at 100°C for 3 seconds; the G2 (Group 2) for 5 seconds; and the G3 (Group 3) for 10 seconds. Five animals composed the control group. 24 hours after the scalding, we performed assisted painless death and a histological analysis to assess vascular density and mast cells, to classify injury depth and to conduct a statistical analysis. The presence of ulceration in the burnt area was assessed per group. **Results:** We analyzed 23 animals after excluding 7 animals for not having presented burn injury due to scalding, despite similar exposure time (4 animals from G1 and 3 from G2). G3 presented greater occurrence of ulceration (80.0%) when compared to G1 (0.0%) and G2 (28.26%). In relation to average number of vessels, G1 and the Control Group presented similar averages, both inferior to G2 and G3. As to mast cells, G2 and G3 presented similar averages, both superior Control Group, proving the degree of burn in each group. **Conclusion:** The experimental model of scalding burn on rat skin was developed and described the superficial, partial and deep depths of the burns.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As queimaduras continuam sendo a pior causa de trauma que pode acontecer subitamente a uma pessoa sadia, ou mesmo a alguém com outras doenças, marcando-a para toda a vida (LACERDA *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2012). Elas são responsáveis por significativa morbidade e elevada mortalidade no mundo todo, apesar dos avanços disponíveis no tratamento (COSTA MELO *et al.*, 2017).

Segundo dados do Ministério da Saúde, a estimativa é que ocorram aproximadamente um milhão de acidentes com queimaduras por ano, sendo que destas, cem mil procuram atendimento hospitalar e cerca de dois mil e quinhentos irão falecer direta ou indiretamente por causa de suas lesões. A cozinha doméstica é o principal local desses acidentes, e o líquido superaquecido é apontado como maior causador das queimaduras (BALAN *et al.*, 2009; VENDRUSCULO *et al.*, 2010 e CRUZ *et al.*, 2012). De forma geral, os acidentes domésticos são os mais frequentes nos indivíduos de ambos os sexos, tornando evidente que atitudes educativas de prevenção devem ser adotadas para esses casos (RICCI *et al.*, 2015).

As queimaduras são classificadas de acordo com a espessura ou a profundidade da lesão na pele. A queimadura de 1º grau atinge apenas a camada da epiderme; provoca eritema, edema e dor local suportável, sem formação de bolhas. As lesões de 2º grau são mais graves e atingem a derme; apresentam bolhas, dor intensa e edema, além do extravasamento de líquidos pela derme exposta. As queimaduras de 3º grau acometem todas as camadas da pele e podem atingir tecidos profundos e estruturas nobres, isto é, vasos e nervos, assim como músculo e osso; essas lesões de espessura

total apresentam pouca ou nenhuma dor e a pele apresenta aspecto de couro, seca e com coloração branca, marrom, cinza ou carbonizada (JAEGER *et al.*, 2015).

A experimentação animal é importante na compreensão dos fenômenos naturais. Nesse sentido, o modelo animal deve ser funcionalmente o mais semelhante possível ao que se objetiva pesquisar e torna-se fundamental o desenvolvimento constante de modelos para cada doença ou disfunção (FERREIRA, HOCHMAN e BARBOSA, 2005).

Devido à natureza heterogênea das queimaduras, vários modelos animais foram desenvolvidos como ferramentas valiosas para estudar a fisiopatologia desse trauma (ABDULLAHI, AMINI e JESEHKE, 2014). A utilização de modelos experimentais é muito importante para o aperfeiçoamento e comprovação de técnicas e procedimentos já existentes, e também para o desenvolvimento de outros. A experimentação animal tem permitido a compreensão dos diversos processos fisiológicos e patológicos que nos acometem (FERREIRA, HOCHMAN e BARBOSA, 2005).

Uma das principais abordagens nos estudos realizados com escaldadura refere-se à cicatriz, especialmente quando a queimadura não afeta uma grande superfície corporal. Em modelos experimentais, as áreas de queimaduras devem ser pequenas o suficiente para não causarem repercussão sistêmica, mas suficientemente grandes para permitir observação, reprodutibilidade e amostragem adequadas (VENTER, MONTE-ALTO-COSTA e MARQUES, 2015).

Os modelos mais frequentes estudados sobre queimadura são os provocados por contato e por escaldadura. O modelo experimental por contato é realizado com o uso de uma barra de metal aquecida com temperatura acima de 100°C e aplicada à pele durante um período de tempo previamente determinado. Em contraste, o modelo com líquido aquecido emprega normalmente um molde com uma abertura através da qual parte do corpo do animal é imerso em água, geralmente com temperatura constante a 100°C, durante períodos de tempo específicos, de acordo com método desenvolvido (VENTER *et al.*, 2016). A profundidade da queimadura é definida por três elementos diferentes: temperatura do agente, tempo de exposição e pressão quando realizada por contato (VENTER *et al.*, 2015).

Diversos experimentos têm sido realizados com diferentes protocolos estabelecidos na pesquisa sobre ferida por queimadura. Os mais usados são em estudos de isquemia tecidual (MOGFORD, *et al.*, 2004; GOULD, *et al.*, 2005; STEINBERG *et al.*, 2012), uso de fármacos (VASCONCELLOS *et al.*, 2001; TENIUS *et al.*, 2007), infecção de feridas (D`ACAMPORA *et al.*, 2006; D`ACAMPORA *et al.*, 2007) e em animais diabéticos (KRISTEN *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2012). Entretanto, a maioria dos trabalhos não descreve, detalhadamente, o protocolo para indução da lesão.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Desenvolver um modelo experimental de queimadura em pele de rato.

LITERATURA

3. LITERATURA

WALKER & MASON (1968) desenvolveram um modelo, com o objetivo de padronizar uma forma de queimadura utilizando líquido aquecido. Foi usado como base um cilindro de metal amianto fino cortado ao meio no sentido longitudinal. Esse cilindro apresentava duas polegadas e meia de diâmetro e onze polegadas e meia de comprimento. As extremidades abertas foram soldadas para fixar duas tiras cruzadas de plástico pesado com finalidade de manter o animal imobilizado na base, abrindo um orifício cujas margens foram cobertas com borracha; o conjunto do modelo foi protegido com três camadas de fita cirúrgica adesiva e pulverizado com um impermeabilizante para evitar o escoamento do líquido fora das margens delimitadas previamente. Tachas de metal foram colocadas nas quatro extremidades da base metálica para prender as patas do rato. No momento da escaldadura, foram utilizadas pinças para segurar o dispositivo pela extremidade e assim manter a área exposta imersa em água fervente durante dez s. O resultado foi uma queimadura total; e com três s uma área de queimadura parcial.

SANTOS *et al.* (1996) descreveram dois modelos experimentais para a reprodução das condições fisiopatológicas de uma queimadura. Os autores utilizaram o rato como modelo. Depois de anestesiado, foi realizada a tricotomia para expor uma superfície cutânea no dorso, que correspondia a 30% da área do animal; em seguida o primeiro modelo foi colocado em posição dorsal em uma tela quadriculada de metal moldável. Esse dispositivo foi desenvolvido a partir de uma modificação do modelo

descrito por Walker e Mason (1968). O animal estava firmemente imobilizado no compartimento de metal, a superfície dorsal depilada foi submergida durante 12 minutos em água a 70° C. O modelo causou uma queimadura de espessura parcial. O segundo modelo usado foi para produzir uma lesão por meio de contato direto, utilizando a descrição por Feifel *et al.* (1992), em que o dorso do animal já tricotomizado recebeu a queimadura de um disco de cobre que media 4 cm de diâmetro aquecido a 250° C. A principal desvantagem desse método foi a dificuldade de assegurar a pressão constante do disco na pele. Na análise histológica, observou-se necrose da epiderme, infiltrado perivascular difuso e importante nível de degeneração do colágeno na derme papilar. Concluíram que o estudo experimental de queimaduras é possível graças ao desenvolvimento e uso de modelos experimentais simples, o modelo experimental permite expandir os estudos sobre queimadura.

CRIBBS *et al.* (1998) apresentaram um modelo de escaldadura de espessura parcial com uma taxa de regeneração comparável à dos modelos de feridas em suínos. Utilizaram 38 ratos machos adultos que foram fixados em decúbito dorsal em um molde, tendo uma área de 2x3cm exposta na água com 60°C por 45 s, seguida por nova escaldadura de 4°C por mais 45 s. Os resultados mostraram que todos os animais tiveram a lesão de espessura dérmica parcial e uma regeneração entre 10 a 14 dias. Concluíram que esse modelo de lesão parcial com escaldadura em ratos possibilita uma lesão térmica padronizada.

CAMPELO *et al.* (2011) descreveram um modelo animal experimental aperfeiçoado para estudo de queimaduras superficiais e profundas da pele em ratos. Foram utilizados 24 ratos Wistar, machos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com aplicação de diferentes temperaturas, sendo G1-Controle, G2-T100°C, G3-T150°C e G4-T200°C. Dois quadrados medindo 10x10 mm foram delineados com um marcador cirúrgico estéril em cada lado e ao longo da coluna vertebral do animal, mas não citam quantos centímetros. Os ratos dos grupos G2, G3 e G4 foram submetidos a queimaduras térmicas de 100°C, 150°C e 200°C, respectivamente. O grupo G1 foi utilizado como controle. As queimaduras foram causadas pela aplicação de uma placa de cobre, ligada a um dispositivo de controle eletrônico de temperatura na pele dorsal dos ratos anestesiados. Quatro queimaduras foram produzidas em cada animal (área total de 4cm²/animal), deixando cerca de 1 cm de pele intacta entre as áreas queimadas. Analgesia foi obtida durante 24 horas após a queimadura. As aplicações 100°C e 150°C resultaram a produção de queimaduras profundas comprometendo parte da espessura da pele, com regeneração central da área queimada somente a 100°C. No grupo G4 houve lesão de toda a espessura da pele sem cicatrização central. Entretanto, observou-se regeneração marginal, após sete dias, em todos os grupos estudados. Concluíram que o modelo estudado é de baixo custo e facilmente reprodutível, propiciando a obtenção controlada de queimaduras parcial ou total da pele em animais experimentais.

MITSUNAGA *et al.* (2012) tiveram como objetivo revisar e sistematizar o conhecimento científico do modelo experimental de

queimaduras cutâneas em ratos. A revisão bibliográfica foi feita a partir de 2008 até janeiro de 2011 nas principais redes de busca, utilizando as palavras-chave: modelos animais, queimaduras e ratos. Foram selecionados 116 artigos, destes 62,7% apresentavam estudos com queimaduras de terceiro grau, sendo 75,3% no dorso do rato. A escaldadura foi o método mais utilizado, estando presente em 57,6% dos estudos e os instrumentos incandescentes 35,9%. O anestésico xilazina foi utilizado em 31% dos trabalhos. A localização mais utilizada foi o dorso do animal, uma vez que fica mais difícil para o animal alcançar a lesão. Os autores concluíram que os estudos são incompletos e com métodos muito diferentes e difíceis de replicar.

ABULLAHI *et al.* (2014) destacaram que ratos e humanos compartilham características semelhantes, a pele do rato também é composta das principais camadas epiderme e derme. O rato é um dos modelos animais mais utilizados em estudos envolvendo queimaduras e feridas. Quanto ao tamanho da área da ferida, maior que 60% da área corporal queimada irá resultar em uma sobrevivência reduzida do modelo animal e assim não é sustentável para experimentação. Com o dorso do animal já tricotomizado, foram expostos em um molde resistente à água em 100°C por 8 s. Os autores testaram outros tempos de exposição, entre 8 e 12 s, e dentro dessa janela de tempo obtiveram uma lesão dérmica total.

CAI *et al.* (2014) descreveram um método para definir o grau de profundidade da queimadura em ratos. Utilizaram dez ratos Sprague-

Dawley do sexo masculino, anestesiados e com o dorso epilado em uma janela de 12x8cm; para isso usaram como limite a décima segunda costela e desenharam uma linha horizontal demarcando o limite superior; o osso pélvico marca o limite inferior. Para desenhar uma linha vertical, seguiram a projeção dos processos espinhosos vertebrais, traçada na linha média. A queimadura foi realizada com uma haste de aço inoxidável com formato cilíndrico tendo 1cm de diâmetro estando aquecido a 100°C, em água a ferver. Para a localização das áreas queimadas foi delimitada uma linha mediana no processo espinhoso e linhas horizontais dividindo o dorso do animal em quatro áreas iguais, as queimaduras foram infligidas em cada quadrante. A pele foi tracionada para cima, longe das vísceras subjacentes, criando uma superfície plana; assim a haste repousava sobre o seu próprio peso em 5, 10 e 20 s delimitados dentro de cada quadrante diferente. As feridas foram analisadas quanto ao tamanho, à morfologia e à profundidade. No resultado observaram que as feridas criadas com duração de 5 s estavam pálidas, com margens indistintas, as de 10 e 20 s foram bem definidas de maneira uniforme. Em 5 s resultaram danos de espessura parcial; com 10 e 20 s danos de espessura total, envolvendo o músculo esquelético subjacente.

VENTER *et al.* (2015) descreveram um aparelho de queimadura e um método de fixação para produzir queimaduras de diferentes profundidades com 23mm de diâmetro, 60°C, 70°C e 80°C durante 10 s em contato com o metal aquecido. Metade dos animais de cada grupo foi sacrificada no terceiro dia e as lesões resultantes analisadas usando técnicas histológicas para verificar a profundidade da lesão, na outra metade dos

ratos a ferida foi medida até completa regeneração. Como resultado, os animais do grupo submetidos a 60°C obtiveram uma queimadura de segundo grau acometendo 28% da derme, o grupo submetido 70°C apresentou segundo grau profundo acometendo 72% da derme, e o com 80°C apresentou terceiro grau com comprometimento de 100% da derme.

MÉTODO

4. MÉTODO

4.1. Delineamento do estudo

O presente estudo é primário, controlado, experimental, longitudinal, analítico, prospectivo, randomizado, unicego e em centro único. Foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o número 036/12 (Apêndice 1).

4.2. Amostra

Para a realização do estudo foram utilizados 35 ratos Wistar-EPM (*Rattus norvegicus*) adultos, machos, com peso entre 280 e 380 g, oriundos do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), e os procedimentos cirúrgicos feitos no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UNIFESP.

Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais de polipropileno, durante sete dias antes do início do experimento, recebendo água e ração própria comum *ad libitum* durante todo o período do estudo, permanecendo sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, segundo a normas do COBEA-Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (CHORILLI, MICHELIN, SALGADO, 2007).

4.3. Delineamento Experimental

Todos os animais foram pesados, distribuídos em três grupos, com aleatorização pelo site (www.randomization.com) contendo dez ratos cada, e submetidos à queimadura por escaldadura com água a 100°C, com tempo de imersão correspondente a cada grupo experimental. Cinco animais foram utilizados em grupo controle (Figura 1).

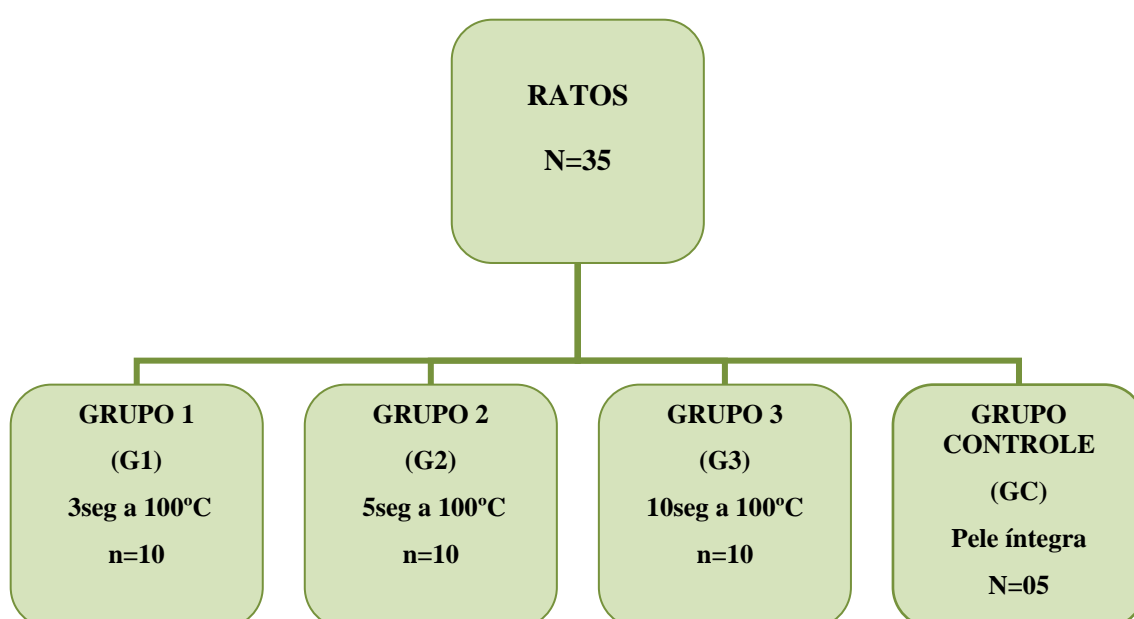


Figura 1 - Esquema da distribuição dos grupos e subgrupos simulados e experimentais

De acordo com estudo piloto realizado, Grupo 1 (G1) os animais foram submetidos à imersão na água por três s, no Grupo 2 (G2) por cinco s e o Grupo 3 (G 3) por dez s.

4.4. Procedimento

Para realização da queimadura, os animais foram submetidos à anestesia por via intramuscular no músculo gastrocnêmio direito, com cloridrato de ketamina (100mg/kg) associado a cloridrato de xilazina (50mg/kg). Para aplicação dessas anestésias, foram utilizadas seringas de 1mL e agulha hipodérmica de 4,5x13mm.

4.5. Modelo Queimadura

Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral, imobilizados em prancha cirúrgica para realização da depilação da região dorsal, com depilador elétrico Philips®. Foi marcada uma linha de 5cm de comprimento craniocaudal, adotando o plano sagital e tendo como limite cranial 7,0cm a partir do plano nasal do animal (linha A). Neste ponto passa-se uma linha perpendicular ao plano sagital craniocaudal (linha B) (Figura 2).

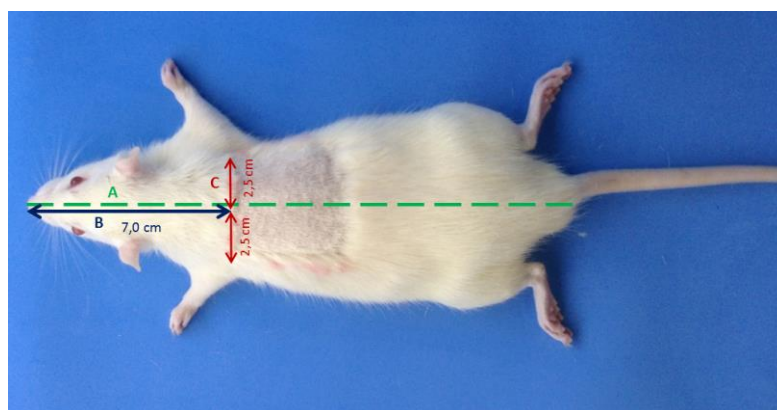


Figura 2 – Demarcação da tricotomia – Linha A - limite cranial 7,0cm a partir do plano nasal do animal. Linha B - perpendicular ao plano sagital craniocaudal.

4.5.3. Área da queimadura

A área tricotomizada foi dividida em quatro quadrantes iguais a partir da linha B no plano sagital craniocaudal de $5,0\text{cm}^2$. Para a realização da queimadura, utilizou-se de um molde circular em plástico de policloreto de vinil (PVC) com raio de 3cm (Figura 3 B). A margem superior do molde foi posicionada a 1cm caudal a partir da linha B. O centro do molde circular foi colocado sobre o plano sagital crânio caudal (Figura 3 A).

A fim de obter-se a porcentagem da área queimada, seguiu-se o que foi descrito por PFURTSCHELLER *et al.*, (2013) que calcularam a área queimada em aproximadamente 20% da área de superfície corporal do rato.



Figura 3 – A -Marcação da lesão dentro da área da tricotomizada. B – Molde de PVC com raio de 3cm, o centro do molde corresponde ao ponto 1.

4.6. Dispositivo de Escaldadura

Foi criado e utilizado um dispositivo único feito de borracha isolante medindo 22cm de largura por 15cm de altura; nessa borracha foi realizada abertura de raio de 3cm localizada a 6cm das margens superior, inferior e lateral. Nas margens laterais do dispositivo colocaram-se as alças de

manejo. Entre a borracha e a caixa metálica foram adaptados dois elásticos, utilizando cola Blanco® Acetate Silicone Sealant, com fivelas próximas à abertura central, que serviram para fixar o animal (Figura 4).

A borracha isolante está acoplada em uma base metálica retangular medindo 18cm de comprimento por 11cm de altura e 4,5cm de profundidade. Nessa base metálica foram realizados três furos ao nível das laterais de maior comprimento, com 3mm de diâmetro, cada um, a 2cm de sua base e a 4cm de cada margem lateral. A distância entre cada furo foi de 4cm (Figura 5).

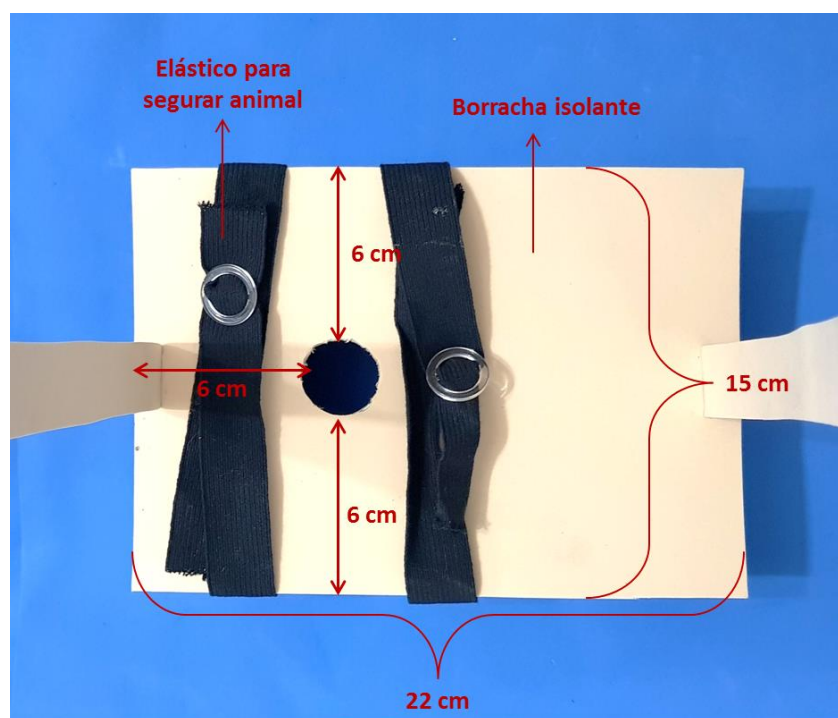


Figura 4 – Parte superior do dispositivo de escaldadura.

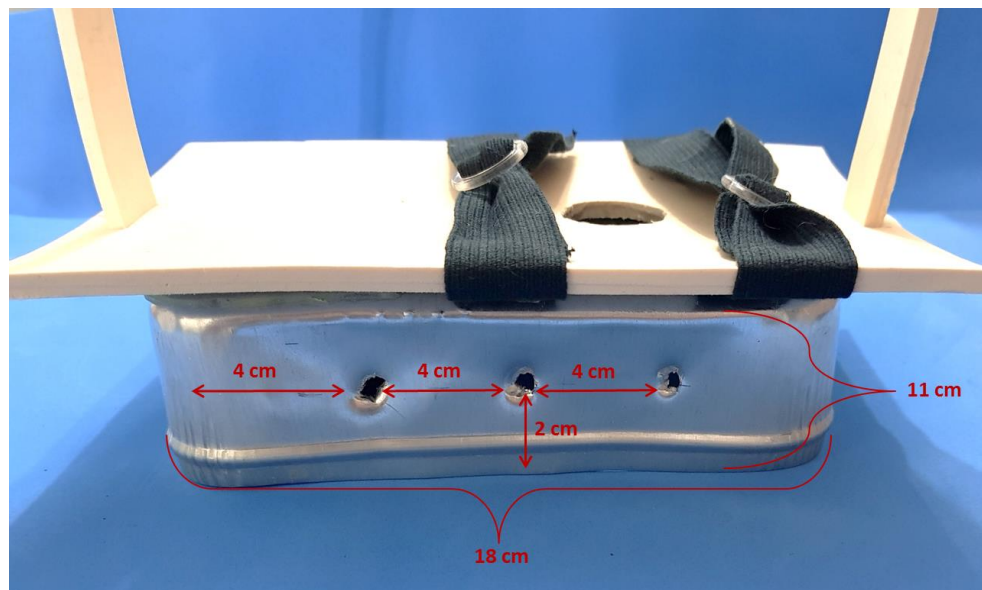


Figura 5 – Parte inferior do dispositivo de escaldadura.

Na parte interna da caixa metálica foram realizadas duas demarcações com caneta cirúrgica, localizadas a 0,5cm de cada lado da abertura do raio de 3cm (Figura 6).



Figura 6 – Parte interna da caixa metálica com marcação dos pontos de alinhamento do animal.

4.7. Escaldadura

O animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre o molde (Figura 7A), preso com os elásticos e fivelas mantendo os três pontos alinhados, ponto 1 localizado no animal e os dois pontos marcados na parte interna da caixa metálica (Figura 7B).

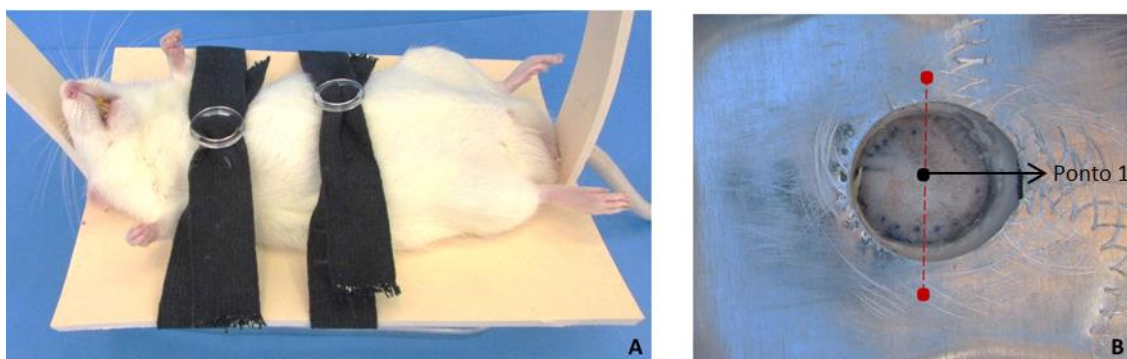


Figura 7 - A- Animal preso no molde de escaldadura; B- Parte interna da caixa metálica com alinhamento dos pontos.

O dispositivo e o animal foram imersos em água a 100°C (medidos com termômetro digital Thermometer®), sendo que os animais do grupo G1 foram mantidos por um período três s, os do G2 por cinco s e os do grupo G3 por dez s (Figura 8).



Figura 8 - Modelo experimental realizando escaldadura em temperatura 100°C.

Imediatamente depois da escaldadura, os animais foram alojados em gaiolas metálicas individuais de aço, sem uso de curativos, e com colar cervical. Possuíam água e ração à vontade e foram mantidos em ambiente adequadamente iluminado, fresco e ventilado em biotério. A analgesia foi administrada com 150mg/kg Dipirona® na água do animal.

Os animais permaneceram nas gaiolas entre a intervenção e a morte assistida por 24 horas, nenhum evoluiu para óbito. A morte assistida indolor foi realizada 24 horas após a queimadura com cinco doses de anestésico aplicadas por via intramuscular, utilizando 4mg/kg de xilazina com 8 mg/kg de ketamina.

4.8. Análise macroscópica da lesão

Ao atingirem o plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito ventral, e, na sequência, tiradas fotografias de todas as lesões. As fotos foram enviadas ao patologista, que classificou cada uma delas de forma cega, em graus de lesão sendo: primeiro grau, segundo grau e terceiro grau (Figura 9).

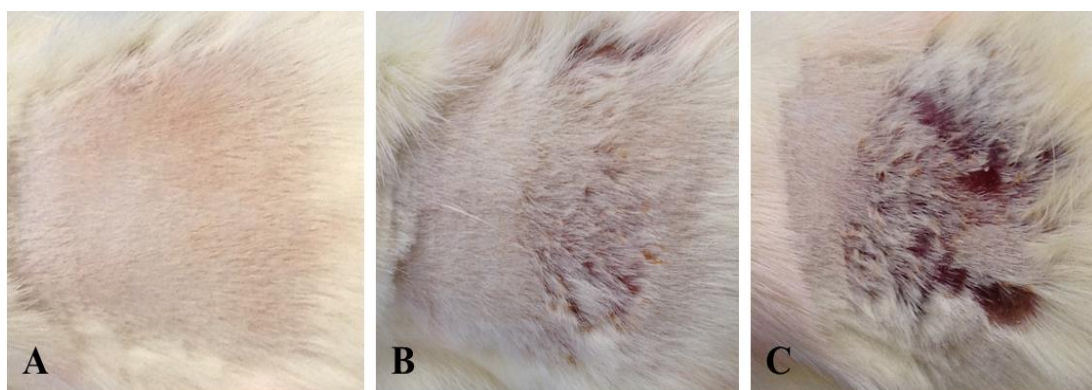


Figura 9 – Macroscopia da queimadura - A – G1 – Primeiro grau; B – G2 – segundo grau G3; C – G3 – terceiro grau.

4.9. Análises Histológicas

Após a checagem da identificação, os animais foram colocados em decúbito ventral sobre a mesa de procedimento, excisão cutânea de formato retangular de 3,5cm no eixo craniocaudal por 2,0cm no eixo látero-lateral (Figura 10).

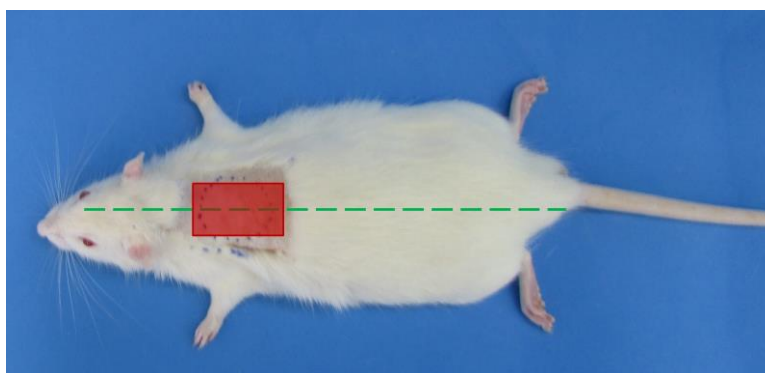


Figura 10 – Localização da biópsia de pele dentro da lesão.

As peças cutâneas foram colocadas em solução formalina 10% tampona por 48 horas até a fixação do tecido. Após fixação, os tecidos foram processados em 4 soluções de álcool e 3 de xilol e posterior embebedamento em parafina a 56°C.

Os tecidos emblocados em parafina foram seccionados a uma espessura de 4mm. Para os fins de análise da lesão, foram utilizados os seguintes corantes: Hematoxilina e Eosina (H&E) com propósito de se avaliar as estruturas dérmicas de maneira geral; Ácido Periódico de Schiff (PAS) com propósito de se analisar as estruturas vasculares e a solução Azul de Toluidina (AT) com a finalidade de evidências nos mastócitos e fibroblastos. A avaliação histológica foi realizada por um único patologista cego na identificação das amostras.

4.9. Densidade Vascular e Mastócitos

Após as amostras serem retiradas, foram processadas em banhos crescentes de álcool, seguidas pela clarificação em banhos de xilol, infiltradas em parafina a 60°C e, posteriormente, processadas em parafina.

As amostras de pele, inclusas nos blocos de parafina, foram cortadas longitudinalmente em cortes semicerrados com 3µm por meio de micrótomo rotativo. Os cortes ficaram montados em lâminas histológicas com lamínulas sobre o tecido, sendo duas lâminas para cada amostra de pele. Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em banhos decrescentes de álcool até a água deionizada.

Uma lâmina de cada amostra foi realizada para coloração, de rotina, por Hematoxilina e Eosina para avaliação de densidade vascular, e outra lâmina para coloração, de rotina, com Azul de Toluidina para avaliação dos mastócitos.

Após serem coradas, as lâminas foram montadas com bálsamo e lamínula para a realização da morfometria. Para morfometria de densidade vascular e mastócitos utilizou-se do método de contagem morfométrica, expresso em porcentagem estereológica, seguindo o princípio de Delesse, sugerido por ARIAS & SOARES (2000). Para essa mensuração, foram realizadas quatro fotomicrografias de cada lâmina, com câmera digital Sony® acoplada ao microscópio óptico Zeiss®, com aumento de 400 vezes (objetiva de 40 vezes e ocular de 10 vezes - área de 0,622 mm²/campo).

A primeira fotomicrografia foi tirada após a identificação da área com maior número de vasos e mastócitos da lâmina, seguindo de mais três fotomicrografias tiradas em campos sequenciais a partir da primeira área escolhida. Realizou-se a contagem de vasos e mastócitos individualizados em campos de 400 vezes.

Os vasos foram definidos como agrupamentos de células endoteliais que determinam espaços luminais, independentemente da presença de hemácias. Os resultados foram expressos como a média do número de vasos em campos de maior densidade vascular por campo de 400 vezes.

Ao final da contagem dos vasos e mastócitos, realizou-se a média aritmética do porcentual de densidade vascular e exocitose de mastócitos de cada animal, e os valores foram inseridos no *software* Microsoft Office Excel[®] 2010 para organização dos dados, formatação das tabelas e análise estatística.

4.11. Análise Estatística

Inicialmente os perfis dos pacientes foram analisados descritivamente. Para as variáveis categóricas foram apresentadas as frequências absolutas e relativas e para as variáveis numéricas, medidas-resumo (média, quartis, mínimo, máximo e desvio padrão).

A existência de associação entre grupo e presença de ulceração foi verificada utilizando-se do teste exato de Fisher devido ao tamanho da amostra¹. Em se verificando associação, foi utilizado o resíduo ajustado padronizado para identificar as diferenças locais – caselas com valores absolutos acima de 1,96 indicam evidências de associações (locais) entre as categorias relativas a essas caselas.

As comparações de médias de vasos e mastócitos entre grupos foram realizadas utilizando-se da Análise de Variâncias (ANOVA). A ANOVA tem como pressupostos a normalidade na distribuição dos dados e a homocedasticidade², os quais foi verificados utilizando-se dos testes de

¹ Mais de 20% das caselas de uma tabela de contingência com valores esperados inferiores a 5 casos.

² Igualdade de variâncias entre os grupos

Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente. Devido à violação da suposição de homocedasticidade, os graus de liberdade da estatística F foram corrigidos utilizando-se da correção de Brown-Forsythe³. Uma vez detectada diferenças de médias na ANOVA, a localização das diferenças foi realizada via comparações múltiplas de C de Dunnett⁴ mantendo-se o nível de significância global.

As análises foram realizadas utilizando-se do pacote estatístico SPSS 20.0.

Para todos os testes estatísticos foram adotados um nível de significância de 5%.

³ Brown MB, Forsythe AB: Robust tests for equality of variances. *Journal of American Statistician Association*. 1974, 69:364-367.

⁴ Comparações múltiplas para grupos heterocedásticos (não homocedásticos).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Da amostra de 35 animais, 28 foram analisados. Quatro animais do G1 e três do G2 foram excluídos, pois não apresentavam lesão microscópica para avaliação, isto é, não foi obtida a queimadura nesses animais.

As lâminas foram avaliadas por um patologista veterinário que descreveu as lesões observadas que de maneira geral eram ulcerações dérmicas. As ulcerações foram classificadas mimetizando o que ocorre no ser humano: primeiro grau, somente lesão na epiderme; segundo grau, a epiderme e a derme apendicular estavam afetadas; e terceiro grau, a derme fibrilar e hipoderme estavam acometidos além das duas camadas superficiais anteriores. Em alguns casos a lesão atingiu a camada muscular cutânea, estrutura presente nos animais, porém ausente em humanos, sendo o equivalente em profundidade à hipoderme humana.

As distribuições do grau da lesão por grupos em relação a ulceração foi significativa ($p=0,004$), seguindo teste de Fisher. O N no G3 apresentou maior porcentagem de ocorrência de ulceração (80,0%) caracterizando assim como terceiro grau de queimadura, comparativamente ao G1 (0,0%) primeiro grau e G2 (28,26%) como segundo grau. Não foram detectadas diferenças estatísticas da porcentagem de ocorrências de ulcerações do G2 com os demais grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Queimaduras relacionadas por grupo, em frequências absoluta e relativa.

	Grupo						Total		p
	G1		G2		G3		n	%	
	n	%	n	%	n	%			
Sim	0	0	2	28,26	8	80	10	43,5	0,004
Não	6	100	5	71,4	2	20	13	56,5	
Total analisado	6	100	7	100	10	100	23	100	

De acordo com a tabela 2 e gráfico 1 houve diferença nas médias do número de vasos ($p=0,001$) e de mastócitos ($p=0,003$). Dessa forma, avaliando os vasos, verificou-se que o G1 e GC apresentaram médias similares e ambas inferiores aos vasos do G2 e G3, similares entre si. Com relação aos mastócitos, observou-se que os grupos G2 e G3 apresentaram médias similares e superiores às do GC, sem diferenças de médias significante entre o G1 e demais grupos, o que comprova o grau de queimadura em cada grupo (Figura 11).

Gráfico 1 – Intervalo de confiança de 95% para médias de números de vasos e mastócitos.

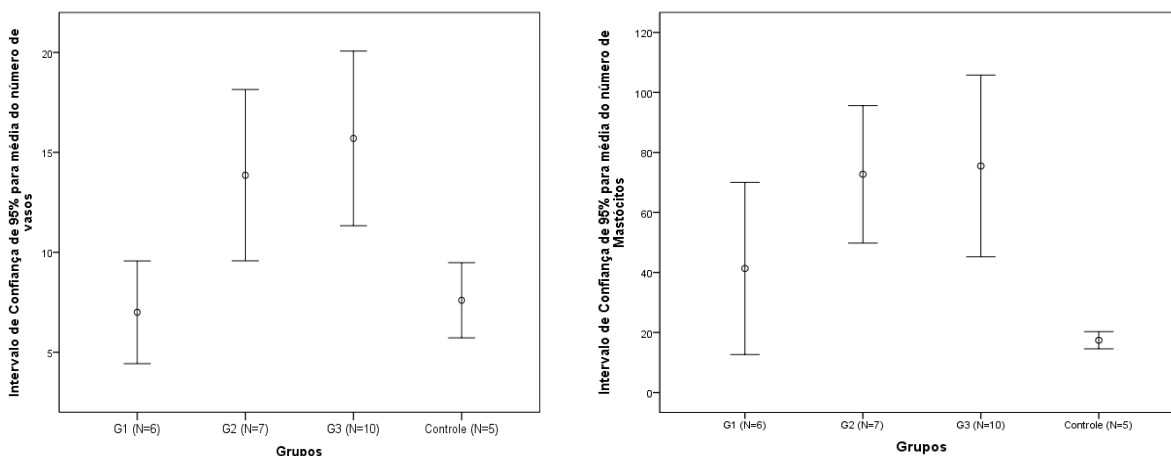


Tabela 2. Medidas-resumo do número de vasos e mastócitos por grupo.

Presença de VASOS									
Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	n	p
G1	7,0 ^B	2,4	5	11	5	6	9,5	6	0,001
G2	13,9 ^A	4,6	9	22	10	12	18	7	
G3	15,7 ^A	6,1	8	25	9,8	14,5	22,3	10	
Controle	7,6 ^B	1,5	6	10	6,5	7,0	9,0	5	

Presença de MASTÓCITOS									
Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	n	p
G1	41,3	27,4	22	95	24,3	31,5	56	6	0,003
G2	72,7	24,8	45	116	53	64	90	7	
G3	75,5	42,3	24	160	42,5	63,5	114	10	
Controle	17,4 ^B	2,3	14	20	15,5	17	19,5	5	

p - Nível descritivo da Análise de Variâncias com correção de Brown-Forsythe.

A e B apresentam médias distintas segundo comparações múltiplas de C de Dunnett.

Teste de Kolmogorv-Smirnov para normalidade na distribuição de vasos (p=0,661) e mastócitos (p=0,164).

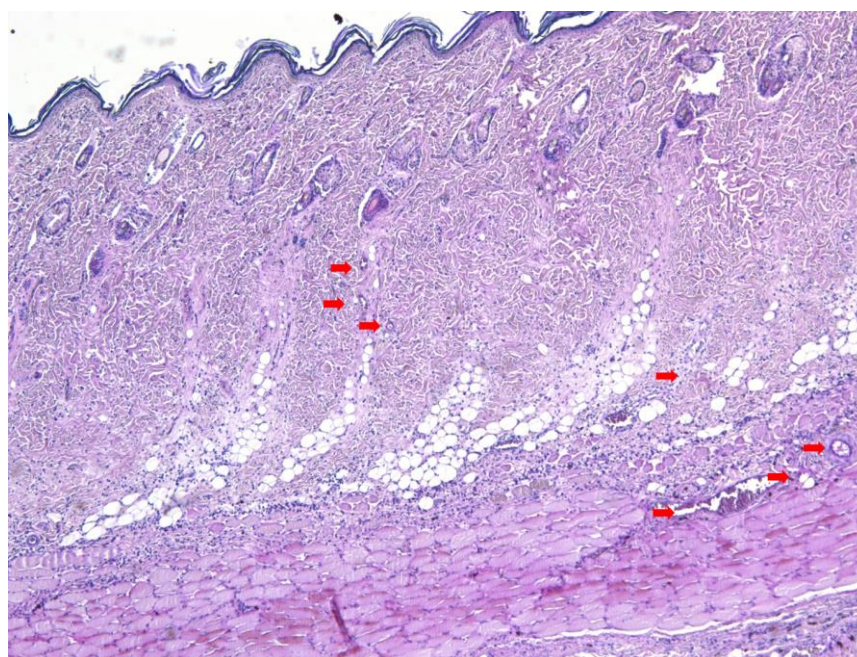


Figura 11 - Fotomicrográfica de exame histopatológico de fragmento submetido a processamento histológico habitual do G3. Observa-se presença de vasos (PAS 5X).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os modelos experimentais em pesquisa são fundamentais para o aperfeiçoamento e comprovação de técnicas e procedimentos já existentes, assim como para o desenvolvimento de outros métodos; neste sentido, o modelo experimental deve ser funcionalmente o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar (FERREIRA & FERREIRA, 2003; FERREIRA, HOCHMAN e BARBOSA, 2003; HOCHMAN *et al.*, 2004; CAMPELO *et al.*, 2011).

Dessa maneira, ABDULLAHI, AMINI e JESEHKE (2014) mostraram que nas pesquisas com queimadura modelos *in vitro* são limitados na sua capacidade de capturar todos os aspectos da fisiopatologia e as características clínicas complexas da lesão por queimadura humana.

Ratos e humanos compartilham características fisiológicas em muitos sistemas de órgãos, inclusive na pele apesar da pele do rato não ser exatamente a pele humana, a pele de rato também é composta por duas camadas principais, epiderme e derme, porém, com mais elasticidade e menos aderência às estruturas profundas, devido presença da camada músculo cutânea. Tais propriedades da pele de rato desempenham um papel significativo no estudo da cicatrização de feridas (ABDULLAHI, AMINI e JESEHKE, 2014).

Numa revisão de literatura, MITSUNAGA *et al.* (2012) encontraram estudos experimentais com algumas inconsistências e irreprodutibilidades, e defendem a importância em rever e analisar os métodos dos modelos experimentais. Estudar a reparação de feridas em animais pode melhorar a nossa compreensão em seres humanos (CAMPELO *et al.*, 2011). Um modelo animal simula as três fases sobrepostas do processo de cicatrização

e permite aos pesquisadores estudar cada fase com mais precisão; mais importante ainda, um modelo animal reprodutível e de fácil manuseio também facilitaria a triagem de tratamentos e intervenções potenciais (CIOL, 2016).

Os ratos são menos propensos à sepse sistêmica e à imunossupressão quando comparados a animais maiores. O tempo reduzido de cicatrização em modelos de queimadura em ratos permite aos pesquisadores estudar mais rapidamente a mecânica da cicatrização de feridas, o que justifica a escolha desse animal para o presente estudo (MITSUNAGA *et al.*, 2012; ABDULLAHI, AMINI e JESEHKE, 2014).

O primeiro modelo experimental que utilizou escaldadura foi de WALKER & MASON (1968). Após a publicação desse modelo, alguns autores realizaram modificações no método. SANTOS HEREDERO *et al.* (1996) realizaram uma adaptação no método como uma gaiola de arame de metal moldável que escaldava o dorso do animal em uma vasilha com água em ebulição e obtiveram sinais clássicos de necrose da epiderme. CRIBBS *et al.* (1998) apresentaram um modelo de queimadura parcial por escaldadura em molde de plástico adaptado em uma seringa de 60mL e obtiveram uma necrose incompleta da derme.

BARBOSA, VASCONCELOS e GUIMARÃES *et al.* (2003) apenas descrevem que utilizaram o animal em decúbito dorsal sobre um molde único de borracha isolante medindo 25x15x5cm, com abertura central, baseando-se no modelo descrito por WALKER & MASON (1968). LYRA *et al.* (2012) induziram lesão com água quente a 70°C através de imersão durante 10 s, e obtiveram como resultado uma queimadura de segundo grau. O último modelo experimental foi descrito por ABULLAHI *et al.* (2014), no qual os autores utilizaram o primeiro modelo

descrito em 1968 com água a 100°C e duração de 8s, também obtendo uma necrose dérmica; além disso descreveram uma revisão dos modelos experimentais de queimadura por escaldadura utilizando outros líquidos além da água.

Uma revisão sistemática, elaborada por MITSUNAGA *et al.* (2012), evidenciou que 57,6% dos estudos experimentais encontrados pelos autores na revisão utilizaram líquido aquecido como principal método para induzir queimadura. SANTOS *et al.* (1996) e MITSUNAGA *et al.* (2012), afirmam que a escaldadura é o mecanismo mais completo em provocar uma queimadura experimental dérmica. A possibilidade de variar o tipo e a temperatura do líquido, o tempo de exposição e a área queimada tornam esse método ideal para reprodução de espessuras diferente de agressão térmica.

Diferentemente do estudo em questão, os autores MEYER *et al.* (1999), CAMPELO *et al.* (2011), TAVARES *et al.* (2012), TOBALEM *et al.* (2013), CAI *et al.* (2014), VENTER *et al.* (2015) utilizaram a queimadura por contato, para isso aqueceram uma barra de metal em água em ebulição e em seguida a barra foi mantida em contato com o dorso do animal por alguns s. Aparentemente o método de fácil execução, porém restringe o estudo apenas a lesão profunda.

MELLO, SAMPEDRO e PICCINNI (2007) utilizaram quatro gotas de óleo vegetal fervente a uma temperatura média de 300°C para criar a lesão de terceiro grau no dorso do animal. Em contrapartida, o presente estudo padronizou uma queimadura por escaldadura com água a 100°C, por ser o método de maior incidência de queimadura em humanos, estando em concordância com o estudo de CRUZ *et al.*, (2012) além da facilidade e reprodutibilidade no processo da queimadura.

Outra divergência entre os estudos que utilizaram escaldadura foi a variação na temperatura da água, sendo que CRIBBS *et al.* (1998), BARBOSA *et al.* (2003) e SATO *et al.* (2005) utilizaram temperaturas menores que 70°C. SANTOS *et al.* (1996), SHI e LI (2007) e EZZATI *et al.* (2009) apenas descreveram a exposição em água fervente, sem discriminarem a temperatura. O presente estudo utilizou uma temperatura de 100°C baseado em WALKER & MASON (1968), ORGAES *et al.* (2007), BARBER *et al.* (2008), GUO *et al.* (2010), HEMMAT *et al.* (2011), GAO *et al.* (2012), LYRA *et al.* (2012). O ponto de ebulição da água ao nível do mar (pressão atmosférica igual a 1 atm ou 760 mmHg e altitude igual a zero) é igual a 100°C, no entanto segundo dados da CPTEC, em São Paulo, o valor da temperatura de ebulição será um pouco menor, aproximadamente igual a 98,3°C. No presente estudo, a água foi utilizada somente no momento que o termômetro marcava 100°C. Todas as pesquisas mantiveram a temperatura constante medida com termômetro.

Em relação ao tempo de imersão para realização da lesão, SANTOS *et al.* (1996) utilizaram imersão de 12 s, SHI e LI (2007) 6 s e EZZATI *et al.* (2009), 7 s. Diferentemente desses estudos, mas em concordância com WALKER & MASON (1968) e BARBOSA *et al.* (2003), o presente estudo padronizou o tempo de 3, 5 e 10 s, para se obter três profundidades diferentes bem definidas, com a finalidade de mimetizar os três níveis de espessura das queimaduras na pele humana, observados na prática clínica.

A padronização de um método é a parte mais importante num estudo que pretende criar um modelo experimental. Todos os detalhes como, por exemplo, tamanho e localização da lesão, tornam o modelo passível de reprodução por outro pesquisador. Para que o estudo seja reprodutível é necessário que o trabalho tenha uma descrição detalhada do método

desenvolvido, mas SANTOS *et al.* (1996) apenas citam que utilizaram o modelo WALKER & MASON (1968) com modificação. SHI e LI (2007) descreveram apenas uma lesão de 4x4cm de segundo grau, mas não explicitaram qual o método utilizado para a escaldadura. EZZATI *et al.* (2009) mantiveram os animais mantidos em uma caixa metálica, com uma abertura circular central de 3x3cm², exposta separadamente na água fervente, sem informarem detalhes sobre qual era o agente.

Na literatura, os estudos que descreveram o método de aplicação do agente da queimadura com detalhes foram aqueles que utilizaram contato por sólido aquecido com objeto incandescente, como nos estudos MEYER *et al.* (1999), SINGER *et al.* (2008), CAMPELO *et al.* (2011), TAVARES *et al.* (2012), TOBALEM *et al.* (2013), VENTER *et al.* (2015), CAI *et al.* (2014), ZHANG *et al.* (2015) e XIAO *et al.* (2014).

Quanto ao método de avaliação da ferida nos modelos experimentais, não foram encontrados detalhamentos em WALKER & MASON (1968), SANTOS *et al.* (1996), SHI e LI (2007), BARBER *et al.* (2008), EZZATI *et al.* (2009) e LYRA *et al.* (2012). De forma geral, os autores apenas descreveram o resultado final da exposição ao agente causador da queimadura em grau ou necrose. Todavia, o presente estudo analisou a densidade vascular e a quantidade de mastócitos; foram verificadas diferenças no número de vasos e mastócitos; os animais do G1 apresentaram, em média, menor número quando comparados com os dos demais grupos. As análises foram realizadas a fim de obter a confirmação do grau de necrose tecidual.

A análise histológica foi realizada apenas em dois estudos que utilizaram modelo experimental. CRIBBS *et al.* (1998) obtiveram evidência histológica de lesão dérmica de espessura parcial em todas as feridas; MEYERHOLZ *et al.*, (2009) descreveram os escores histológicos

como alterações epidérmicas, formação de vesículas subepidérmicas e lesão das células foliculares que foram encontradas em queimaduras profundas. Na análise histológica deste estudo o G1 e GC apresentaram médias similares e ambas inferiores aos vasos do G2 e G3, similares entre si. Com relação aos mastócitos, observou-se que os grupos G2 e G3 apresentaram médias similares e superiores às do GC, sem diferenças de médias significante entre o G1 e demais grupos, o que comprova o grau de queimadura em cada grupo

Dentro das perspectivas que se abrem com os dados obtidos neste estudo, os autores que seguirem esta proposta conseguirão comparar melhor os resultados dos tratamentos em diferentes planos de queimadura, uma vez que foram obtidas as queimaduras superficial, parcial e profunda. Este estudo abre possibilidade para novos experimentos utilizando o mesmo agente líquido, na mesma temperatura, mas aumentando o tempo de imersão para cinco e oito s, mantendo o tempo maior de dez s, uma vez que no grupo utilizando o maior tempo todos os animais apresentaram a lesão de terceiro grau sem nenhuma alteração sistêmica.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O modelo experimental de queimadura em pele de rato foi desenvolvido, descrevendo as profundidades superficial, parcial e profunda.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Abdullahi A, Amini SN, Leschke MG. Animal models in burn research. *Cell Med Life Sci.* 2014;71(17):3241-55.

Arias V, Soares FA. Vascular density (tumor angiogenesis) in non-Hodgkin's lymphomas and florid follicular hyperplasia: a morphometric study. *Leuk Lymphoma.* 2000;40(2):157-66.

Balan MAJ, Oliveira MLF, Trassi G. Características das vítimas de queimaduras atendidas em unidade de emergência de um hospital escola do noroeste do Paraná. *Cienc Cuid Saude* 2009 Abr/Jun; 8(2):169-75.

Barber RC, Maass DL, White DJ, Horton JW. Increasing percent burn is correlated with increasing inflammation in an adult rodent model. *Shock.* 2008, 30(4):388-93.

Barbosa RCC, Guimarães SB, Vasconcelos PRC, Chaves CR, Vasconcelos PRL. Metabolic effects of glutamine in rats subjected to scald burn. *Acta Cir Bras.* 2003;18(6):527-3.

Cai EZ, Ang CH, Raju A, Tan KB, Hing EC, Loo Y, Wong YC, Lee H, Lim J, Moochhala SM, Hauser CA, Lim TC. Creation of consistent burn wounds: a rat model. *Arch Plast Surg.* 2014 Jul;41(4):317-24.

Campelo AP, Campelo MW, Britto GA, Ayala AP, Guimarães SB, Vasconcelos PR. An optimized animal model for partial and total skin thickness burns studies. *Acta Cir Bras.* 2011;26(1):38-42.

Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007;28(1):11-23.

Ciol MA. Em busca de excelência em pesquisa. *Rev Bras Queimaduras.* 2016;15(1):1-2.

Costa Melo ACS, Santos DL, Silva JLN. Análise das variáveis dor e equilíbrio em pacientes admitidos em uma unidade de tratamento de queimados. *Rev Bras Queimaduras.* 2017;16(1):18-22.

Cribbs RK, Luquette MH, Besner GE. A standardized model of partial thickness scald burns in mice. *J Surg Res.* 1998 Nov;80(1):69-74.

Cruz BF, Cordovil PBL, Batista KNM. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. Rev Bras Queimaduras. 2012;11(4):246-50.

D'Acampora AJ, Vieira DSC, Silva MT, Farias DC, Tramonte R. Morphological analysis of tree wound cleaning processes on potentially contaminated wound in rat. Acta Cir. Bras. 2006, 21(5): 332-40.

Ezzati A, Bayat M, Taheri S, Mohsenifar Z. Low-level laser therapy with pulsed infrared laser accelerates third-degree burn healing process in rats. J Rehabil Res Dev. 2009;46(4):543-54.

Feifel H, Bruchelt G, Schmidt K. Effect of constituents of burned skin and in vivo skin burning on the respiratory activity of rat liver mitochondria. Burns. 1992 Aug;18(4):308-12.

Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model: historic and conceptual revision. Acta Cir Bras. 2003;18:1-3.

Ferreira LM, Gragnani A, Furtado F, Hochman B. Control of the skin scarring response. An Acad Bras Cienc. 2009 Sep;81(3):623-9.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MV. Experimental models in research. Acta Cir Bras. 2005;20(2):28-34.

Gao C, Peng H, Wang S, Zhang X. Effects of Ligustrazine on pancreatic and renal damage after scald injury. Burns. 2012 Feb;38(1):102-7.

Gould LJ, Leong M, Sonstein J, Wilson S. Optimization and validation of a ischemic wound model. Wound Rep Reg. 2005, 13(6):576-82.

Guo G, Bai X, Cai C, Zhang J, Li X, et al. The protective effect of different enteral nutrition combined with growth hormone on intestinal mucosal damage of scalded rats. Burns. 2010 Dec;36(8):1283-8.

Hemmat M, Monshizadeh, S, Mehran M. A Comparative Study of the Burn Wound Healing Properties of Saline-Soaked Dressing and Silver Sulfadiazine in Rats. Indian J Surg 2011;73(1):24-7.

Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M. Hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch as an experimental model to

investigate human skin and keloid heterologous graft. *Acta Cir Bras.* 2004;19(1):79–88.

Jaeger MRO, Ferreira LM, Falcão T, Ely PB, Chem E. Alotransplante de pele como alternativa para o tratamento da queimadura dolorosa da criança. *Rev Bras Queimaduras.* 2015;14(1):54-8.

Kristen VR, Sesterheim P, Saitovitch D. Animal model for type 1 diabetes studies. *Rev. Medicina.* 2010, 43(1):3-10.

Lacerda LA, Carneiro AC, Oliveira AF, Gragnani A, Ferreira LM. Estudo epidemiológico da Unidade de Tratamento de Queimaduras da Universidade Federal de São Paulo. *Rev Bras Queimaduras.* 2010;9(3):82-8.

Lyra MC, Leão Jr H, Neto SP, Orgaes FAFS, Gonella HA. Experimental model burns treatment with carboxytherapy. *Rev Bras Queimaduras.* 2012;11(1):2-5.

Ma H, Li Y, Chen-Yi LT. Effects of low-intensity laser irradiation on wound healing in diabetic rat. *Internacional J of Photoenergy.* 2012, 12:7.

Mello PB, Sampedro RMF, Piccinini AM. Efeitos do laser HeNe e do modo de aplicação no processo de cicatrização de queimaduras em ratos. *Fisioter Pesqui.* 2007;14(2):6-13.

Meyer TN, Silva AL. Standard burn model using rats. *Acta Cir Bras.* 1999;14(4):38-42.

Meyerholz D, Piester LT, Sokolich JC, Gideon K, Zamba D, Ligh TD. Morphological parameters for assessment of burn severity in an acute burn injury rat model. *Int. J. Exp. Path.* 2009;90:26–33.

Mitsunaga Junior JK, Gragnani A, Ramos ML, Ferreira LM. Rat an experimental model for burns: a systematic review. *Acta Cir Bras.* 2012;27(6):417-23.

Mogford JE, Sisco M, Bonomo SR, Robinson AM, Mustou TA. Impact of aging on gene expression. In a rat modelo f ischemic cutaneous wound healing. *J. Surg. Research.* 2004, 118(2):190-92.

Noronha L, Chin WK, Kimura LY, Graf R. Estudo morfométrico e morfológico da cicatrização após uso do laser erbium:YAG em tecidos cutâneos de ratos. *J Bras Patol Med Lab.* 2004;40(1):41-8.

Orgaes FAFS, Lyra MC, Rodrigues Junior OF, Gonella HA. Estudo histopatológico do uso de heparina tópica em queimaduras por escaldamento em ratos. *Rev Soc Bras Cir Plást.* 2007;22(1):39-44.

Pfurtscheller K, Petnehazy T, Goessler W, Wiederstein-Grasser I, et al. Innovative scald burn model and long-term dressing protector for studies in rats. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013 Mar;74(3):932-5.

Ricci FPFM, Gonçalves AC, Zampar C, Gomes AD, Guirro ECO, Fonseca MCR. Perfil epidemiológico dos pacientes com queimadura em membros superiores atendidos em uma Unidade de Queimados. *Rev Bras Queimaduras.* 2015,14(1):10-3.

Santos Heredero FX, Hamann C, Obispo MJM, Rodriguez C, Coca MS. Experimental burn models. *Ann Burns Fire Dis.* 1996;9(2):96-100.

Sato S, Yamazaki M, Saitoh D, Tsuda H, Okada Y, et al. Photoacoustic diagnosis of burns in rats. *J Trauma.* 2005 Dec;59(6):1450-5.

Shi Z, Li C, Li C. The effect of air pressure on edema and healing of scalded tissue of rats. *J Burn Care Res.* 2007 Mar-Apr;28(2):286-90.

Singer AJ, Clain SA, Taira BR, Guerriero JL, Zong W. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns. *Acad Emerg Med.* 2008 Jun;15(6):549-54.

Steinberg JP, Hong SL, Geringer MR, Galiano RD, Mustoe TA. Equivalent effects of topically-delivered adipose-derived stem cells and dermal fibroblasts in the ischemic rabbit ear model for chronic wounds. *Aesthet Surg J.* 2012, 32(4):504-19.

Tavares DSP, Lima-Ribeiro MHM, Pontes-Filho NT, Carneiro-Leão AMA. Development of Animal Model for Studying Deep Second-Degree Thermal Burns. *J of Biomedicine and Biotechnology.* 2012:1-7.

Tenius FP, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO. Effects of chronic use of dexamethasone on cutaneous wound healing in rats. *Na Bras Dermatol.* 2007, 82(2): 141-49.

Tobalem M, Harder Y, Tschanz E, Speidel V, Pittet-Cuénod B, et al. First-aid with warm water delays burn progression and increases skin survival. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013 Feb;66(2):260-6.

Vasconcellos LS, Alberti LR, Nunes CB, Petroianu A. Effect of hydrocortisone on testis skin cicatrization in mouse. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2001, 28(6): 438-43.

Vendrusculo MT, Balieiro BRC, Guanilo EEM, Junior FAJ, Rossi AL. Burns in the domestic environment: Characteristics and circumstances of accidents. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. 2010;18(3):444-51.

Venter NG, Marques RG, Santos JS, Monte-Alto-Costa A. Use of platelet-rich plasma in deep second- and third-degree burns. *Burns*. 2016 Jun;42(4):807-14.

Venter NG, Monte-Alto-Costa A, Marques RG. A new model for the standardization of experimental burn wounds. *Burns*. 2015 May;41(3):542-7.

Walker HL, Mason Jr AD. A standard animal burn. *J Trauma*. 1968;8(1):1049-51.

Xiao M, Li L, Li C, Zhang P, Hu Q, Ma L, Zhang H.. Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats. *Acad Emerg Med*. 2014;21(4):383-91.

Zhang J, La X, Fan L, Li P, Yu Y, Huang Y, Ding J, Xing Y. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell transplantation in rat burn models. 2015;8(5):5129-36.

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Academia Brasileira de Letras. Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa. 5a. ed. São Paulo: Global 2009. 976p. Disponível no endereço eletrônico:

<http://www.academia.org.br/abl/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=23>

Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2007;28(1):11-23.

Ferreira LM. Projetos, dissertações e teses: orientações normativas. São Paulo: Red Publicações Ed., 2017. 118p.

Vidal BC, Mello M.L.S. Biologia celular. São Paulo: Atheneu, 1987. 347p.

Houaiss A. Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa 1.0 [CD-ROM]. Rio de Janeiro: Objetiva; 2009.

Michaelis A. Dicionário inglês-português. 25a ed. São Paulo: Melhoramentos; 2015.

Ministério da Saúde/SVS – Estatísticas sobre queimaduras. Disponível em <http://www.blog.saude.gov.br/vnl6zh> (Acessado em 30 de agosto de 2017).

APÊNDICE

APÊNDICE

Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 14 de dezembro de 2012

CEP Nº: 0360/12

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): TAIS AMADIO MENEGAT

Disciplina/Departamento Cirurgia Plástica/Cirurgia

Pesquisadores associados: Bernardo Hochman, Lydia Massako Ferreira (orientadora)

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: Injeção de CO2 em cicatriz crônicas de queimadura em pele de ratos :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Investigar os efeitos da injeção de CO2 em cicatriz crônicas de queimadura em pele de

RESUMO: Estudo com 36 ratos Wistar EPM-1, machos, adultos. Anestésico: ketamina e xilazina. Analgésico: tramadol. Eutanásia: hiperdosagem de anestésico. Os animais serão pesados e distribuídos randomicamente em 3 grupos de 12 ratos, como segue: Grupo 1: grupo controle (nenhuma terapêutica); Grupo 2: injeção de CO2 no tecido dérmico; Grupo 3: injeção de ar comprimido no tecido dérmico. Os animais serão anestesiados e será demarcada e tricotomizada uma área no dorso dos animais de 50 x 40mm. Será realizada uma queimadura ao centro da área medindo 40 x 30 mm que será realizada com água quente a 150°C. Imediatamente depois da queimadura, a área ferida será coberta durante 1 minuto com gaze embebida solução salina isotônica a temperatura ambiente. Analgesia será obtida durante 24 horas com livre acesso a ração e água da torneira que terá adição de 30 mg hemihidrato de fosfato de codeína e 500 ml. Após a realização da queimadura, os animais permanecerão no Biotério durante 14 dias para obtermos retração de pele e fibrose. Após 14 dias da lesão será aplicada a quantidade e fluxo de 20ml/min com 5 segundos de aplicação, em quatro pontos em torno da lesão, utilizando agulha 30G com inclinação de 90° em relação a pele do rato. O procedimento será realizado a cada 24 horas durante 5 dias. Após esse procedimento será realizado a morte assistida indolor no 20º dia com hiperdosagem de anestésico seguida das amostras que serão retiradas.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Queimaduras resultam em lesões significativas, com complicações tanto físicas quanto psíquicas, as quais exigem tratamento global, focado na prevenção em longo prazo de problemas como cicatrizes, contraturas e outros, que limitam a função física. A incidência de sequelas de queimaduras é cada vez maior, talvez em decorrência da sobrevida da fase aguda, que vem aumentando nos últimos anos. Alguns trabalhos reportam a contratura (associada ou não à hipertrofia) como a sequela mais comum, chegando a 65% de todas as cicatrizes patológicas pós-queimadura. As contraturas constituem elemento importante ao analisar as sequelas de queimaduras. Estudos demonstram relação direta entre tamanho da ferida e número de contraturas. A CO2 no plano cutâneo segundo os aspectos histológicos no processo de reparação mostraram a proliferação de pequenos vasos sanguíneos neoformados, há também alterações no calibre vascular, que conduzem ao aumento do fluxo sanguíneo, alterações estruturais na microcirculação e emigração dos leucócitos da microcirculação e seu acúmulo nos focos de agressão.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo.

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 9407,00

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 18 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 09/12/2013 e 04/12/2014

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.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. O. Medina Pestana', is written over a horizontal line.

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



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 25 de julho de 2017

CEP N° 0360/12

CONEP N°:

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): TAIS AMADIO MENEGAT

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia

Título do estudo: Injeção de CO2 em cicatriz crônicas de queimadura em pele de ratos

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU E APROVOU o(a) Emenda 1 (Versão de 24/Jul/2017) Solicitação de alteração de título de, "Injeção de CO2 em cicatriz crônicas de queimadura em pele de rato" para "Modelo experimental de queimadura em pele de rato". do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

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