

**ANA CAROLINA MORAIS FERNANDES**

**VIABILIDADE E MORTE CELULAR EM  
QUEIMADURAS *IN VITRO*.**

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

**SÃO PAULO**

**2018**

**ANA CAROLINA MORAIS FERNANDES**

**VIABILIDADE E MORTE CELULAR EM  
QUEIMADURAS *IN VITRO*.**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira**

**Coorientadores: Prof. Dr. Jerônimo Pereira de França**

**Profa. Silvana Gaiba**

**SÃO PAULO**

**2018**

Fernandes, Ana Carolina Morais.

**Viabilidade e morte celular em queimaduras *in vitro*.** / Ana Carolina Morais

Fernandes -São Paulo, 2018.

xi, 60f

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

Título em inglês: Viability and cell death in *in vitro* burns.

Palavras-chave: 1. Queimaduras, 2. Linhagem celular, 3. Células NIH 3T3, 4. Fibroblastos, 5. Morte celular.

# **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL**

Coordenação: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto

ORIENTADOR: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

COORIENTADORES: Prof. Dr. Jerônimo Pereira de França  
Profa. Silvana Gaiba

2018

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, ANA PAULA MORAIS FERNANDES e MAURÍCIO MOREIRA FERNANDES e irmãs, CAMILA E TALITA MORAIS FERNANDES pelo amor incondicional, pelos exemplos de vida, por mesmo distantes serem tão presentes, pelo estímulo e enfrentamento junto a mim para chegarmos a esta conquista.*

*À minha avó, ELIANI DE SOUZA MORAIS, e bisavó, MARIA ALICE DE SOUZA JABUR, que são exemplos de luta e perseverança.*

*Ao SANDRO NASCIMENTO pelo suporte, estímulo, companheirismo e por ser tão acalentador em momentos tão difíceis neste trajeto.*

*À PROFESSORA DOUTORA ANDREA FERNANDES DE OLIVEIRA, a quem denomino “Prof”, pelo extremo carinho e educação maternas durante meu engatinhar pelas queimaduras.*

*Ao PROFESSOR DOUTOR ANTONIO ROBERTO BOZOLA, REGENTE DO SERVIÇO DE CIRURGIA PLÁSTICA DO HOSPITAL DE BASE DA FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, que me ensinou os fundamentos da Cirurgia Plástica e me encorajou a seguir este rumo nobre de nossa especialidade.*

*Aos meus amigos que tanto contribuíram direta ou indiretamente durante este período.*

## AGRADECIMENTOS

À PROFESSORA DOUTORA LYDIA MASAKO FERREIRA, PROFESSORA TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/ ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA (UNIFESP/EPM), *pela maestria na luta infindável pelo conhecimento e pelo exemplo de visão, por ter cravado uma estaca fundamental na história do tratamento de queimaduras. Sinto-me privilegiada e abençoada por sua orientação.*

Ao PROFESSOR DOUTOR JERÔNIMO PEREIRA DE FRANÇA, PROFESSOR TITULAR DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ (UESC) e à PROFESSORA DOUTORA SILVANA GAIBA, PESQUISADORA DO LABORATÓRIO DE CULTURA DE CÉLULAS DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, COORIENTADORES *deste estudo, que, de forma incansável, me ensinaram e guiaram através deste processo incrível de aprendizado, com seu apoio paternal.*

Ao PROFESSOR DOUTOR MIGUEL SABINO NETO, PROFESSOR ADJUNTO LIVRE-DOCENTE DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP/EPM, *pelas sugestões, apoio e pela extrema dedicação ao Programa.*

À SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE e SILVANA APARECIDA DE ASSIS, SECRETÁRIAS DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP/EPM, *pela disponibilidade e pelo imenso carinho dispendido a mim.*

Aos COLEGAS PÓS-GRADUANDOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, *pelas sugestões e críticas que muito auxiliaram na construção deste estudo.*

Ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP *que pelo seu nível de excelência, sinto extrema honra de poder fazer parte deste Programa.*

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	IX
RESUMO	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
3. LITERATURA	7
4. MÉTODOS	16
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS	44
NORMAS ADOTADAS	48
<i>ABSTRACT</i>	50
FONTES CONSULTADAS	52
APÊNDICE	54
ANEXOS	56
ANEXO 1	57
ANEXO 2	58
ANEXO 3	59
ANEXO 4	60



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Placa de 96 poços após incubação com MTT .....	25
Figura 2.	Células NIH-3T3 após incubação em MTT .....	25
Figura 3.	Efeitos da lesão térmica na viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT.....	31
Figura 4.	Viabilidade celular por citometria de fluxo .....	32
Figura 5.	Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo.....	33
Figura 6.	Microscopia de fluorescência do controle das células NIH-3T3 e após os efeitos da lesão térmica.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-phenyindole
DHL	Desidrogenase láctica
DiOC6	3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-HG	Meio de cultura Eagle mod. por Dulbecco com alta glicose
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
et al	E outros
G	Constante gravitacional de Newton
h	Horas
PI	Iodeto de Propídeo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
J/s	Joules por segundo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
N	Newton

NaCl	Cloreto de sódio
NIH 3T3	Linhagem celular de embriões de camundongo NIH Swiss
nm	Nanômetro
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
s	Segundo
SFB	Soro fetal bovino
W	Watts
μg	Micrograma
μM	Micromol

## RESUMO

**Introdução:** Queimaduras são responsáveis por alterações fisiopatológicas, celulares e moleculares e representam formas graves de trauma. Poucos são os estudos *in vitro* que possibilitem a análise da viabilidade e morte celular em queimaduras térmicas.

**Métodos:** 1) Foram utilizadas células de linhagem de fibroblastos NIH-3T3, que foram submetidas a queimadura térmica por 30s a temperaturas especificadas; 2) Os efeitos da lesão térmica sobre a viabilidade celular foram determinados por ensaio MTT, citometria de fluxo e imunohistoquímica; 3) a análise estatística foi realizada pelo teste de variância ANOVA, para  $p < 0.05$ , considerando a média e erro padrão de quadriplicatas,  $n=4$ . **Resultados:** o ensaio MTT determinou duas curvas gráficas (duas fases) com um ponto de inflexão para a temperatura delta de 15°C. A análise por Citometria de Fluxo indicou que com o aumento do delta de temperatura houve progressivamente aumento de apoptose seguido pelo aumento progressivo de necrose. A Imunohistoquímica evidenciou que com o aumento da temperatura houve diminuição de número de células e do número de mitoses, mudanças na estrutura da membrana e citoesqueleto (formação de vesículas), com núcleos picnóticos e irregulares. **Conclusão:** Com o aumento da temperatura de lesão térmica houveram mudanças significativas na atividade celular e viabilidade (mudanças drásticas na morfologia, com lise celular e aumento progressivo de apoptose e necrose das células NIH 3T3).

## **Introdução**

## 1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e recobre sua superfície. Desempenha funções de importância vital, por exemplo, representa uma barreira a infecções, tem um papel importante na regulação da temperatura do corpo e gerenciamento de volume. Além disso, ela constitui uma barreira mecânica, térmica e química a infecções (RADTKE, 2014).

Os fibroblastos são um componente essencial da pele; eles não só produzem e organizam a matriz extracelular da derme, mas também se comunicam com outros tipos de celulares e entre si, desempenhando papel crucial na regulação da fisiologia da pele (ANSEL et al., 1996; WERNER & SMOLA, 2001).

Extensas lesões na pele expõem o organismo a uma série de agentes agressores presentes no meio ambiente, comprometendo a sua recuperação. É o caso de queimaduras graves, extensas e profundas, que destroem a epiderme, a derme e tecidos subcutâneos, dificultando a reparação espontânea da pele e muitas vezes, levando o paciente a óbito (BRINGEL, 2011). A redução da mortalidade está, também, relacionada à eficácia da proteção precoce da região queimada, de modo a diminuir a perda de fluídos, evitar a hipotermia, possibilitar o controle de infecções (HERNDON, 1997) e permitir a reparação adequada da pele (BOROJEVIC & SERRICELLA, 1999).

Queimaduras são responsáveis por muitas mudanças fisiopatológicas (ASHBURN, 1995; ROSENKRANS & SHERIDAN, 2002; SUMMER et al., 2007), representando uma forma grave de trauma (HAWKINS et al.,

---

2005). Embora existam muitos conhecimentos e avanços na terapia de queimaduras, o tratamento está aquém do ideal, pois faltam estudos baseados em evidências (IURK et al., 2010).

No intuito de acrescentar conhecimento sobre fisiopatologia e possíveis agentes terapêuticos em queimaduras diversos modelos experimentais podem ser aplicados: cultura de células e tecidos para estudos de mecanismo de ação de agentes terapêuticos e estudos de substitutos de tecido queimado; modelos animais para avaliar eficácia de agentes terapêuticos e para estudo de fenômenos biológicos *in vivo* – e após tais estágios permitir ensaios clínicos após verificação de aspectos de segurança (FERREIRA, 2005).

Na cultura de células da pele é possível o estudo de vários fatores físicos ou químicos pela padronização de fatores que podem ter influência nas células cutâneas. Assim, são importantes os estudos em cultura de células e tecidos para o entendimento dos mecanismos de ação de agentes e condutas terapêuticas (BRINGHAM et al., 1996; GRAGNANI FILHO et al., 2004; FERREIRA et al., 2005).

Há uma grande dificuldade para caracterizar as mudanças moleculares das células no modelo experimental de queimaduras térmicas *in vivo*. Essas envolvem muitas variáveis devido ao sistema de resposta às injúrias térmicas, como o processo inflamatório e a cascata de coagulação, que dificultam o entendimento do efeito direto do processo de queimadura térmica nas células (SOBRAL et al., 2007). Devido às limitações dos estudos *in vivo*, existe uma demanda de alternativas *in vitro* bem controladas. Os modelos *in vitro* geralmente são rápidos, menos onerosos, podem ser facilmente padronizados e manipulados, e envolvem menos considerações em comparação aos modelos *in vivo* (Gottrup et al. 2000).

A linhagem celular de fibroblastos NIH 3T3 foi iniciada por TODARO e GREEN (1963) a partir de células embrionárias de ratos Swiss. O significado de 3T3 refere-se ao protocolo de transferência e inoculação celular para a linhagem, sendo inóculo de  $3 \times 10^5$  células e transferência a cada 3 dias. Seu tempo de duplicação é de 20-26 horas. A morfologia das células é aderente, fusiforme e seu cultivo é relativamente fácil. As células originais são extremamente inibidas por contato, embora a linha celular não seja mais inibida. É uma das linhagens celulares mais utilizada, incorporada em uma variedade de ensaios mecânicos e baseados em células, incluindo análises funcionais de proteínas.

O cultivo celular apresenta a vantagem de manipulação de apenas um tipo celular, com propriedades específicas, que facilita o controle das variáveis experimentais. Além disso, as condições experimentais podem ser facilmente controladas em um cultivo celular.

São poucos os estudos que avaliam morte celular em queimaduras. Na literatura a maioria dos trabalhos encontrados avaliam os processos de regeneração e reepitelização quando há lesão térmica. Os trabalhos com cultura celular e queimadura são ainda mais escassos, sendo que estes foram realizados através de culturas primárias (queratinócitos e/ou fibroblastos) provindos de pele de doadores, o que pode induzir a variáveis experimentais não controláveis.



**Objetivo**

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o processo de morte celular associado à queimadura térmica *in vitro*.

**Literatura**

---

## 3.LITERATURA

### 3.1 Queimaduras e fibroblastos

SORRELL, 2004 afirmou que fibroblastos são um tipo celular diverso e dinâmico cujas funções na pele em muitos aspectos permanecem ainda desconhecidas. Diferenças específicas na fisiologia dos fibroblastos são evidentes nos fibroblastos da derme papilar, mais superficial e fibroblastos da camada reticular, que consiste na camada mais profunda da derme. Os fibroblastos envolvem interações fibroblasto-epidérmicas durante o desenvolvimento do cabelo e nas regiões interfoliculares da pele. Eles também desempenham importante papel no reparo das feridas cutâneas e um papel cada vez maior na bioengenharia da pele. Segundo o autor ainda a bioengenharia da pele desempenha papel crucial de conhecimento básico da biologia da pele, estudos para um veículo de teste para produtos aplicados topicamente e um recurso para substituição da pele em casos de perdas cutâneas extensas como por exemplo as queimaduras.

GRAGNANI (2009) relatou que as queimaduras são trauma complexo, de difícil tratamento, multidisciplinar, com altas morbidade e mortalidade no mundo todo, que afeta mais de um milhão de pacientes ao ano. Afirmou que sendo um panorama desafiador, é fundamental a evolução do conhecimento em queimaduras, com medidas de prevenção, melhora do tratamento e aumento do número de pesquisas. Existe segundo

---

o estudo, pequeno número de profissionais focados no tratamento deste trauma, e muito menor o número de profissionais que priorizam desenvolvimento de pesquisa para melhora do tratamento e a criação de tecnologia a fim de resolver problemas ainda existentes na assistência das queimaduras.

EVERS et al (2010) fizeram uma revisão em que relatam a lesão da queimadura como um evento traumático complexo de efeitos locais e sistêmicos, que afeta vários órgãos e sistemas além da pele. A fisiopatologia do paciente com queimadura mostra um espectro complexo de reações das respostas inflamatórias. Na fase aguda, o mecanismo de inflamação pode ter efeitos negativos devido ao vazamento capilar, à propagação da lesão por inalação e ao desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos. Notaram que as tentativas de mediar esses processos continuam sendo o mais importante assunto da pesquisa em queimaduras. Afirmam que em estudos histológicos a queimadura é um processo dinâmico que atinge o pico em cerca de 3 dias. O processo de apoptose foi identificado presente na zona de estase e pareceu contribuir para a progressão da ferida neste período. Os possíveis objetivos terapêuticos que os autores dizem que precisam ser melhor estudados são o significado clínico deste fenômeno sistêmico e o desenvolvimento de fármacos antiapoptóticos que impeçam ou modulem a "resposta de apoptose sistêmica" e seus efeitos fisiopatológicos.

---

### 3.2 Morte celular- apoptose e necrose

GRAVATE et al (2006) investigaram lesões causadas por queimaduras quanto à presença de células apoptóticas, comparando queimaduras de espessuras parcial, parcial profunda e total. Queimaduras de espessura parcial profunda exibiram comportamento ambíguo: curaram-se espontaneamente ou evoluíram para queimaduras de espessura total. Neste estudo foi feita a colocação de fragmentos de DNA (por exemplo, rotulagem terminal de desoxinucleotidil transferase Biotin-dUTP) e anticorpos FAS-CD95 para calcular a taxa de apoptose de queimaduras superficiais, de espessura parcial profunda e espessura total em 45 pacientes após a lesão térmica. As biópsias foram coletadas durante a fase aguda (primeira semana de hospitalização). As queimaduras de espessura parcial profunda apresentaram células apoptóticas, tanto na derme como em anexos cutâneos, e apresentaram maior taxa de apoptose do que as queimaduras superficiais e de espessura total (44,5% na espessura parcial profunda, intervalo entre 6,3-90,5%, 5,6% na queimadura de espessura parcial superficial, intervalo: 0-13%; 0% para queimadura de espessura total;  $P=000243$ ). Uma taxa de apoptose significativamente maior estava presente em células de queimaduras profundas de espessura parcial quando comparadas com espessura superficial e total. O estudo sugeriu que as queimaduras profundas sustentam um dano isquêmico que obriga as células a sofrer apoptose e pode representar a base biológica para sua evolução clínica em queimaduras de espessura total.

BUTT et al. (2017) realizaram estudo em viabilidade celular com fibroblastos e vitamina E após lesão térmica. Em seu estudo as camadas

---

epidérmica e dérmica da pele foram separadas manualmente. A derme foi triturada incubada em 2,5mg/ml de solução de colagenase tipo 1 (Gibco, EUA). Os fibroblastos isolados foram cultivados em glicose média-alta (DMEM-HG) de meio modificado por Dulbecco com 20% de soro fetal bovino (SFB). O meio foi trocado a cada 3 dias e as células na terceira passagem (P3) foram utilizados para os experimentos. Os fibroblastos cultivados foram expostos às temperaturas de 45°C, 47°C, 49°C, 51°C, 53°C e 55°C durante 10 min. O nível de citotoxicidade foi analisado por ensaio de exclusão de azul de tripan, ensaio de MTT e ensaio de lactato desidrogenase (DHL). Observou-se, através desses ensaios que a lesão por calor a 51°C durante 10 minutos reduziu a viabilidade dos fibroblastos para  $49,3 \pm 1,3\%$ . Assim, selecionou-se esta temperatura para os ensaios subsequentes. As células foram então plaqueadas e divididas em quatro grupos de tratamento: (A) células não tratadas mantidas em meio isento de SFB durante 24 h e depois novamente em meio livre de SFB durante 10 min; (B) células tratadas com 100  $\mu$ M de vitamina E por 24 horas e depois mantidas em meio isento de SFB por 10 min; (C) células mantidas com meio isento de SFB durante 24 h e depois exposta a lesão por calor a 51 ° C durante 10 min; e (D) células tratadas com 100 uM de vitamina E durante 24 horas e depois expostas a lesão por calor a 51 ° C durante 10 min. O efeito da vitamina E nos fibroblastos foi avaliado pela coloração de anexina-V, ensaio de senescência, ensaio de DHL, MTT, ensaio imunoenzimático (ELISA), PCR semi-quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e análise de Western Blot. Seus resultados levam à conclusão de que a adição prévia de vitamina E aos fibroblastos, *in vitro*, neutraliza os efeitos prejudiciais das lesões por calor e aperfeiçoa o conteúdo antioxidante das células afetando positivamente a via PI3-K/Akt, o que pode ter levado à ativação de genes associados a proliferação e regulação negativa dos genes

---

responsáveis pela apoptose. Ademais, a vitamina E também incrementou as atividades parácrinas dos fibroblastos em resposta ao estresse térmico.

### 3.3 Modelos experimentais

JANSSON et al. (1996) descreveram um modelo experimental em que foram utilizados espécimes de pele humana obtidas de mamoplastias redutoras. No lado epidérmico dos espécimes, uma ferida de espessura parcial foi feita com um *punch* de 3mm (Stiefel Laboratories Ltd., Alemanha), sendo a epiderme e a derme superficial cortadas. Depois disso, a ferida e a borda da pele circundante foram excisadas por biópsia concêntrica de perfuração com 6 mm. As feridas isoladas foram transferidas para placas de 24 poços (Costar, Calnbridge, MA) e incubadas no meio DMEM (GIBCO, Life Technologies Ltd, Paisley, Escócia) suplementadas com 10% de SFB. As feridas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com CO<sub>2</sub> a 8%, sendo o meio trocado a cada dois dias. A reepitelização de feridas de espessura parcial feitas nos espécimes de pele humana foi determinada após 3, 5 ou 7 dias de incubação, submersas ou elevadas à interface ar-líquido numa membrana Transwell™ de policarbonato (Costar). As feridas foram crioseccionadas com espessura de 12µm processadas para coloração com hematoxilina-eosina, autorradiografia e imunofluorescência indireta. Neste estudo observou-se que as biópsias foram reepitelizadas dentro de 5 a 7 dias, com cicatrização epidérmica mais completa em feridas expostas ao ar, com uma



---

neopiderme mais semelhante à epiderme humana adulta normal do que as feridas submersas. A quantificação exata da síntese dos componentes estudados é difícil de ser avaliada apenas por métodos imunohistoquímicos, mas observou-se que as feridas incubadas na interface ar-líquido têm uma neopiderme com deposição mais pronunciada da laminina, colágenos tipos IV e VII e uma expressão mais precoce de marcadores de maturação: involucrina e filagrina.

KRATZ (1997) descreveu um modelo *in vitro* dos processos de queimadura e cicatrização de feridas de pele humana. Em condições estéreis, foram cortadas peças (provindas de mamoplastias redutoras) de 60mm x 10mm de tamanho e foi realizada a queimadura no nível da derme profunda utilizando uma corda de 0,5mm de diâmetro aquecida a 150°C por 1 segundo. Posteriormente, as amostras de pele queimada foram transferidas para placas de 12 poços e cobertas com 2 ml de meio DMEM com 2 ou 10 por cento de SFB. Os explantes queimados foram cultivados a 37°C em atmosfera úmida por 1 a 14 dias e foram fixados, dia a dia em 4% de formaldeído, desidratados através de uma série etanol-xileno e incorporada em parafina. Foram realizadas secções transversais (espessura de 10µm) que foram coradas com a técnica de hematoxilina-eosina e a re-epitelização foi determinada com microscopia óptica. Para determinar a viabilidade das células epidérmicas e dérmicas os explantes, após 14 dias, foram incubados em SFB a 2% e 10% durante 3h a 37°C em 500 pg/mL de termolisina (Sigma Chemicals, St Louis, MO, EUA) a fim de separar a derme da epiderme, que foram cultivadas separadamente. O cultivo dos queratinócitos foi realizado como descrito por Green et al, adicionando EGF (10µg/ml, Sigma) ao meio de cultura. Os fibroblastos foram cultivados em meio DMEM contendo SFB a 10%. Todas as incubações

---

foram realizadas em uma atmosfera úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e os dois tipos celulares foram cultivados por três passagens. Para estudar a atividade proliferativa, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços e o conteúdo total de DNA em cada poço foi medido após os 1º, 4º e 8º dias para os queratinócitos e 1º, 2º e 3º dias para os fibroblastos através da lise das células utilizando Triton X -100 em TNE (Tris-Cl 10 mM pH 7.0, 100mM NaCl, 10 mM EDTA) com adição de corante Hoechst 33258. A fluorescência foi determinada usando um comprimento de onda de excitação de 365nm e um comprimento de onda de emissão de 458nm em um fluorômetro TKO 100 (Hofer, San Francisco, CA, EUA). Após 2 semanas de incubação em pelo menos 2% de SFB, ambos os queratinócitos e fibroblastos do explante mostraram-se viáveis e as feridas incubadas em 10% de SFB foram completamente reepitelizadas após 7 dias, enquanto as feridas incubadas em 2% de SFB não mostraram nenhum sinal de cura, mesmo que as células dérmicas e epidérmicas fossem viáveis. O modelo mostrou-se altamente reproduzível e fácil de executar e a exclusão de fatores sistêmicos como circulação, nutrição e resposta inflamatória facilitou o controle e a medição da cicatrização das feridas.

FERREIRA (2005) afirmou a importância do desenvolvimento de modelos experimentais que está no fato desses auxiliarem na compreensão dos fenômenos naturais. Permitem melhor compreensão da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, do efeito de medicamentos ou dos resultados das intervenções cirúrgicas. Sua maior importância está relacionada ao respeito ético da não intervenção primária experimental em humanos. Assim, o modelo experimental deve ser o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar. São diversos os modelos descritos: culturas de células e tecidos (pesquisa *in vitro*), os animais de laboratório (pesquisa *in vivo*) e os

---

modelos anatômicos, geralmente em cadáveres humanos. Os modelos *in vitro* são utilizados quando se deseja avaliar o comportamento molecular, bioquímico, celular e histoquímico dos tecidos. Os avanços em Biologia Celular têm permitido um aumento no uso desse tipo de modelo experimental.

SINGH et al. (2016) desenvolveram um modelo experimental em que foi utilizado um dispositivo personalizado de alumínio com diâmetro 3cm, acoplado a um termostato. A lesão térmica foi infligida pelo pré-aquecimento do dispositivo de alumínio a 100°C e pressionando a pele do dorso de porcos Yorkshire (Parson's Farm, Hadley, Mass) para diferentes tempos, variando de 5 a 30s usando força padronizada de 10 Newton (N) no dispositivo. A capacidade de calor do alumínio e a queda de temperatura eram conhecidas, então a quantidade de calor transferida foi calculada. Observou-se que queda de temperatura na ferida foi de 0°C, 1°C, 2°C, 3°C e 5°C para tempos de contato do dispositivo de 5, 10, 15, 20 e 30s, respectivamente. As profundidades das lesões após 72h de queimadura foram de 0,46mm, 0,82mm, 1,21mm, 1,61mm e 1,91mm nos tempos de 5, 10, 15, 20 e 30s, respectivamente, sendo que a profundidade das feridas se correlacionou significativamente com o calor transferido por cm<sup>2</sup> (coeficiente de correlação = 0,96, p-valor = 0,03). Mostrou-se que este modelo é relativamente simples, reprodutível, e a correlação entre a transferência de calor e a profundidade da lesão pode facilitar a padronização das profundidades de queimadura em estudos futuros.

**Métodos**

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Desenho de pesquisa

O presente estudo é primário, experimental, *in vitro*, intervencional, realizado em centro único. Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o número 8162230215. (Apêndice).

---

## 4.2 Modelo experimental

### 4.2.1 Cultura de fibroblastos

As células de linhagem de fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) foram adquiridas na ATCC (American Type Culture Collection CRL-1658, Manassas, VA, USA). As células foram mantidas em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup> (Corning, MA, USA) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, NY, EUA), Gentamicina a 50 µg / mL (Gibco, Grand Island, NY, USA), Anfotericina B em 50 µg / mL (Biolab, São Paulo, SP, Brasil), denominado a partir desse momento como DMEM completo, e mantidas a 37°C numa incubadora (Revco- Elite II, Rio de Janeiro, Brasil) em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. A subcultura foi realizada quando a confluência celular atingiu aproximadamente 80% na garrafa de cultura. A seguir o meio de cultura foi aspirado e a garrafa contendo fibroblastos foi lavada rapidamente com Versene (PBS com 0,05 M EDTA - Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid, Ácido Etileno Diamino Tetra Acético, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). O Versene foi cuidadosamente aspirado e posteriormente foi adicionado à garrafa de cultura 5 ml de tripsina 0,25% com EDTA 0,02% até o desprendimento das células. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com a adição de 5 ml de meio DMEM completo.

---

A suspensão celular foi centrifugada (200 G) por 4 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o botão de células precipitado (*pellet*) ressuspenso em 10 ml de meio DMEM completo. Após a ressusensão as células foram contadas utilizando o contador de células (Invitrogen - Countess, Seul, Korea). Após a contagem  $1 \times 10^6$  células foram distribuídas em cada garrafa de cultura de  $75\text{cm}^2$  até atingir 80% da sua confluência.

#### **4.2.2 Modelo de queimadura *in vitro***

As células NIH-3T3 foram tripsinizadas e  $1 \times 10^6$  células foram semeadas em placas de Petri de vidro ( $100\text{mm}^2$ ) mantidas a  $37^\circ\text{C}$  numa incubadora em atmosfera umidificada de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$  até atingir 80% de confluência, quando foi realizado o modelo experimental de queimaduras.

Sob condições estéreis, dentro de um fluxo laminar (Fluxo Laminar Vertical, Pachane, Piracicaba, Brasil), a lesão térmica foi induzida *in vitro*, utilizando como fonte de calor uma base de vidro de borossilicato do aparelho de microondas (Electrolux MTD30), com capacidade térmica de  $100.17\text{cal/g}\cdot^\circ\text{C}$  (Anexo 1).

O meio das placas de Petri foi aspirado e imediatamente a temperatura inicial da placa foi determinada utilizando termômetro infravermelho (modelo GM300 – BENETECH), de acordo com as normas especificadas em seu manual. Em seguida, a placa de cultura é colocada em contato com a base de vidro aquecida a uma temperatura específica durante

---

30 segundos. Após a indução de queimadura a temperatura final das placas foi medida, e 4mL de meio DMEM completo a 4°C é colocado na Placa de Petri para diminuir a temperatura desta a fim de parar o processo de queimadura. Após este processo as placas de cultura foram submetidas a tripsinização realizada com a colocação de 4mL de tripsina e descolamento das células por suave agitação da placa. Então a reação foi neutralizada por 5mL de meio DMEM sem SFB e as soluções contendo as células foram colocadas em tubos cônicos de 15mL e centrifugadas a 200 G por 4 minutos. Após a centrifugação o meio foi aspirado e o *pellet* foi ressuspenso em 200μL de meio DMEM sem SFB e deu-se seguimento aos ensaios.

#### **4.2.3 Aquecimento da base de vidro**

O aquecimento da base de vidro de borossilicato com capacidade térmica ( $CV = 100.17 \text{ cal/g } ^\circ \text{ C}$ ) foi determinado utilizando o forno de microondas com potência de 400W ou 400J/s, com temperaturas variando de 35° a 100°C conforme mostrado no Anexo 2. O Anexo 3 mostra as mudanças da temperatura na base de vidro que tiveram contato com as placas de Petri (capacidade térmica = 8.5917 cal/g°C) após um tempo de contato de 30 segundos.



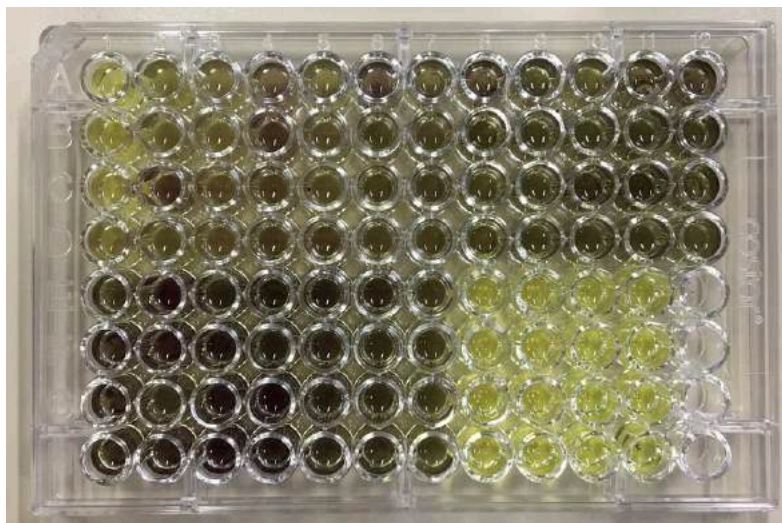
---

#### 4.2.4 Ensaio de viabilidade celular - MTT

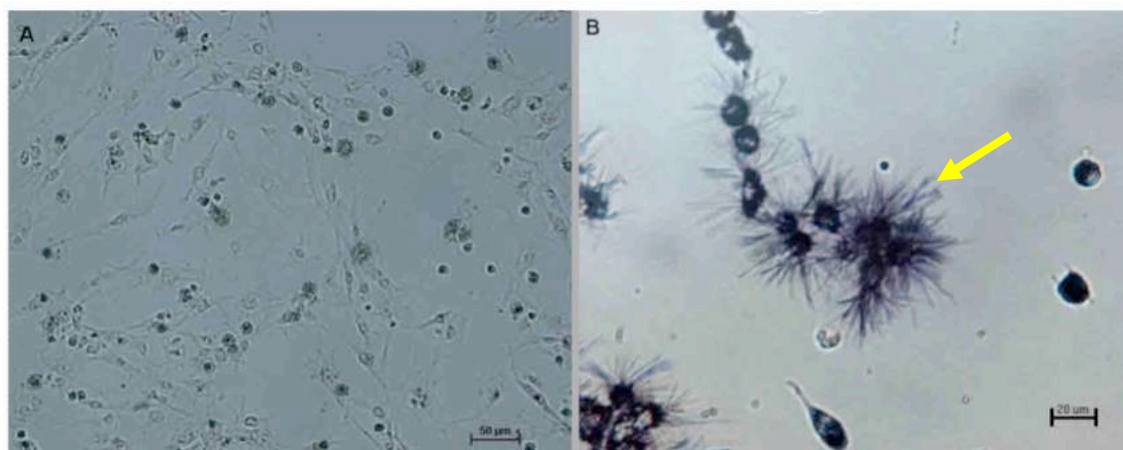
Os efeitos da lesão térmica sobre a viabilidade das células foram determinados por ensaio MTT. O ensaio MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]} é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan {E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Sendo assim, a produção de formazano reflete o estado funcional da mitocôndria.

Cinquenta microlitros (50µL) da solução de células na condição controle e após a queimadura térmica foram colocados em placas de 96 poços a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço. Em seguida, 50 µl de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço para atingir um volume total de reação de 100 µl e as placas foram incubadas a 37°C por 2h.

Os cristais de formazano resultantes foram dissolvidos em 100 µL de álcool isopropílico. A absorbância foi medida a 570 nm, utilizando leitor de microplacas VERSAMAX sintonizável, Molecular Devices, CA, USA), método modificado de ZENG, 2009. Na figura 01 pode-se observar a imagem da placa de 96 poços após 2h de incubação do MTT. A figura 2-A representa as células NIH-3T3 contendo os cristais de formazano após 2h de incubação em MTT e a figura 2-B representa uma imagem ampliada desses cristais presentes na placa.



**Figura 1** - Placa de 96 poços após incubação com MTT e variação da coloração com o aumento da atividade mitocondrial e/ou viabilidade celular.



**Figura 2** - Células NIH-3T3 após incubação em MTT. A- NIH-3T3 2 h após incubação em MTT. B- Imagem ampliada dos cristais de formazano (indicados pela seta amarela).

---

#### 4.2.5 Análise por Citometria de Fluxo

A técnica de Citometria de Fluxo com duas cores foi utilizada para detectar apoptose e necrose os fibroblastos, usando iodeto de propídeo (PI) e anexina-V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) como descrito por VAN OOSTVELDT et al., 1999. O método consiste em fazer a marcação do DNA celular pelo iodeto de propídeo e da fosfatidilserina com FITC – Anexina V, simultaneamente, utilizando 500µL de solução tampão, acrescentando 10µL de solução de PI (50µg/mL) e 10µL de anexina-V-FITC. As células NIH-3T3 do grupo controle e experimental que foram fixadas em etanol 70% foram lavadas duas vezes com 1 ml de PBS e centrifugas a 200 G por 4 min. A seguir foram ressuspensas em 100µL de solução tampão contendo: PI e anexina–V-FITC e incubados por 30 min, protegidos da luz, em temperatura ambiente. A seguir foram acrescentados 200 µL de PBS e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo Guava easyCyte HT (Millipore, Belford, Massachusetts, EUA) e analisadas no programa InCyte Software.

#### 4.2.6 Análise por Microscopia de Fluorescência e Microscopia Confocal

Para os ensaios de microscopia de fluorescência e microscopia confocal os fibroblastos (NIH-3T3) foram subcultivados sobre uma lamínula circular de vidro (12 mm de diâmetro) em uma concentração de

---

$10^3$  células/lamínula (triplicata), e mantidas por 24h imersa em 5mL de meio DMEM completo dentro de uma placa de Petri.

O meio DMEM completo das Placas de Petri contendo as lamínulas foi aspirado e imediatamente a temperatura inicial das lamínulas foi determinada utilizando termômetro infravermelho (modelo GM300 – BENETECH). Em seguida, a placa de Petri contendo a lamínula com as células de fibroblastos foi colocada em contato com a base de vidro do micro-ondas aquecida a uma temperatura específica por 30 segundos. Após a indução de queimadura a temperatura final das placas foi medida, e 4mL de meio DMEM completo a 4°C foi colocado dentro da placa de Petri para diminuir a temperatura da placa de Petri contendo as lamínulas, a fim de parar o processo de queimadura.

Para o estudo morfológico a marcação das células com marcadores fluorescentes foi feita de acordo com o método modificado descrito por BKAILY et al., 1995 e DECHO e KAWAGUCHI, 1999. As células 3T3 foram fixadas com 500  $\mu$ L formalina (0,4%) durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e adicionado a solução de PBS contendo BSA 0,1 % e glicina 1M por 20 minutos. As lamínulas foram lavadas com PBS permeabilizadas com uma solução de PBS contendo BSA 0,1% e saponina 0,1 % por 15 minutos. Após este período, os fibroblastos foram incubados com faloidina conjugado com Alexa Fluor 488 (1:500), Molecular Probes. Após 40 minutos de incubação, as células foram lavadas com solução de PBS contendo BSA 0,1% e em seguida, foi adicionado o corante DAPI (marcador de DNA - Molecular Probes), onde as células cultivadas foram incubadas durante 5 minutos protegidas da luz. Após o período de incubação, as células foram lavadas com solução de PBS contendo BSA

---

0,1%. Posteriormente, as células foram marcadas com CellMask™ Deep Red (1:1000), Molecular Probes, durante 5 minutos e então, lavadas com solução de PBS com BSA 0,1 %. Estas células foram coletadas com o auxílio da lupa binocular e transferidas para as lâminas, onde foi adicionado o Fluormount G. Preparadas as lâminas, as células marcadas foram examinadas no Microscópio Confocal CARL ZEISS modelo LSM 700 (UESC), usando filtros apropriados aos fluoróforos utilizados.

### **4.3 Análise Estatística**

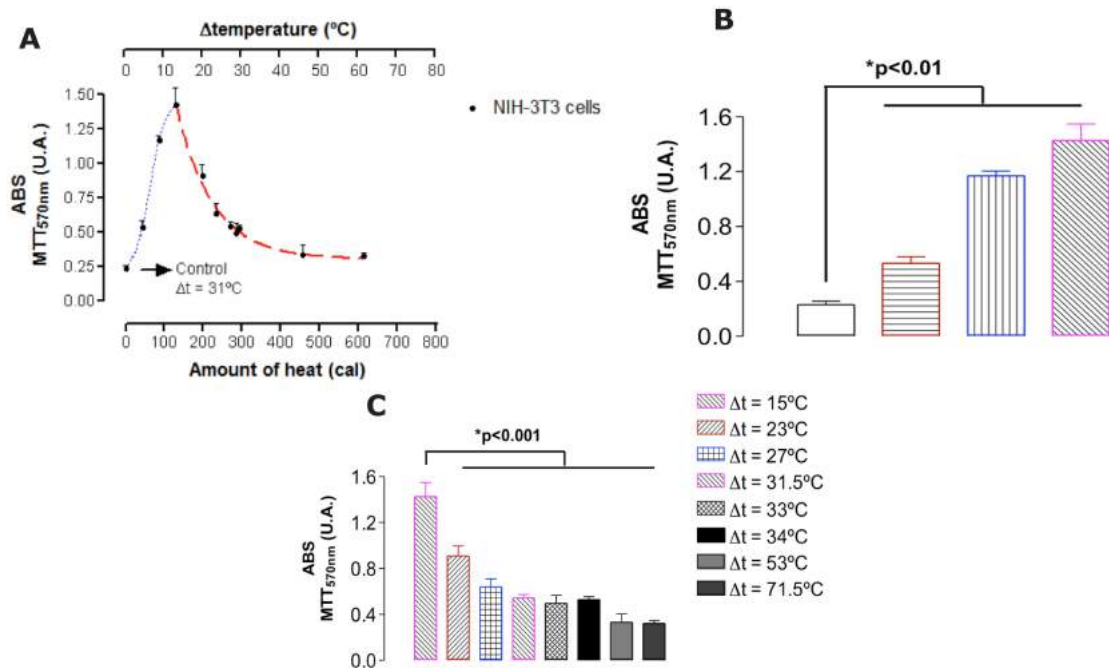
A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism v.3.0, por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de intervalo múltiplo Newman-Keuls. Foi considerado  $p < 0,05$  como estatisticamente significativa.

## **Resultados**

## 5.RESULTADOS

### 5.1 Ensaio de viabilidade celular – MTT

O ensaio de viabilidade por MTT determinou duas curvas gráficas (duas fases), conforme apresentado na figura (A). Na primeira fase há aumento na atividade celular como uma função linear da temperatura até o ponto de inflexão ( $\Delta T = 15^\circ \text{C}$ ) apresentado na figura (B). Em seguida há uma segunda fase de decaimento exponencial até a saturação ( $\Delta T=46^\circ \text{C}$ ) - diminuição significativa da viabilidade celular por transferência de calor apresentado na figura 03.



**Figura 03** - Efeitos da lesão térmica na viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT. A- Representa o ensaio MTT que determinou duas curvas gráficas (duas fases) com um ponto de inflexão para a temperatura delta de 15 °C. B – Representa a primeira fase (linha azul) e a diferença estatística dos grupos experimentais em comparação com o grupo de controle. C - Representa a segunda fase (linha vermelha) e a diferença estatística de grupos experimentais em comparação com o ponto de inflexão.



## 5.2 Análise por Citometria de Fluxo

A viabilidade celular por citometria de fluxo foi realizada utilizando o PI (Red Fluorescence) e anexina-V (Green Fluorescence) marcada com FITC. A avaliação de apoptose e necrose foi realizada no citômetro de fluxo Guava (easyCyte HT) e analisada no programa InCyte Software; o resultado obtido está apresentado na figura 04.

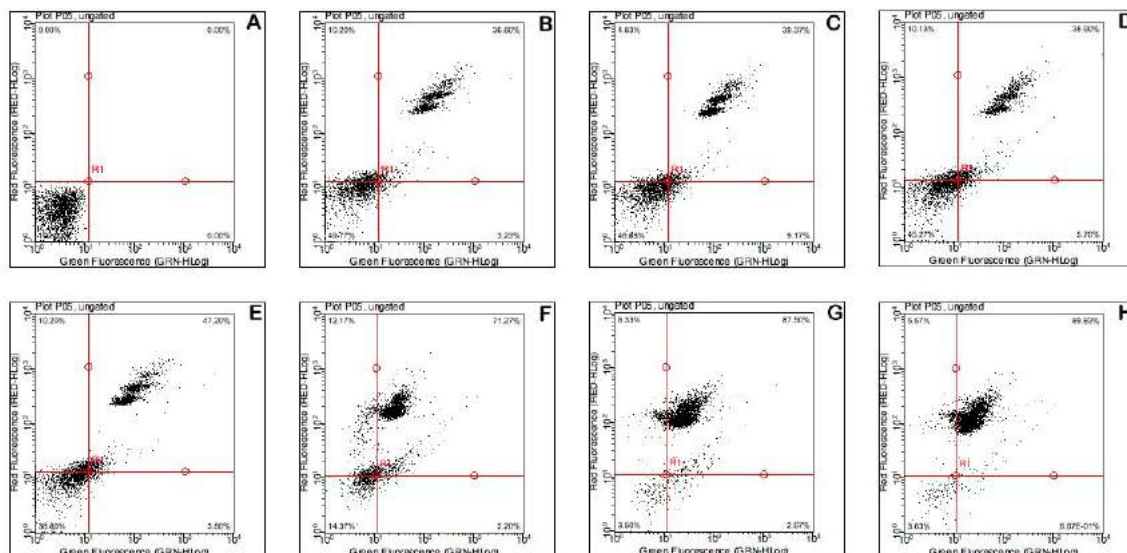
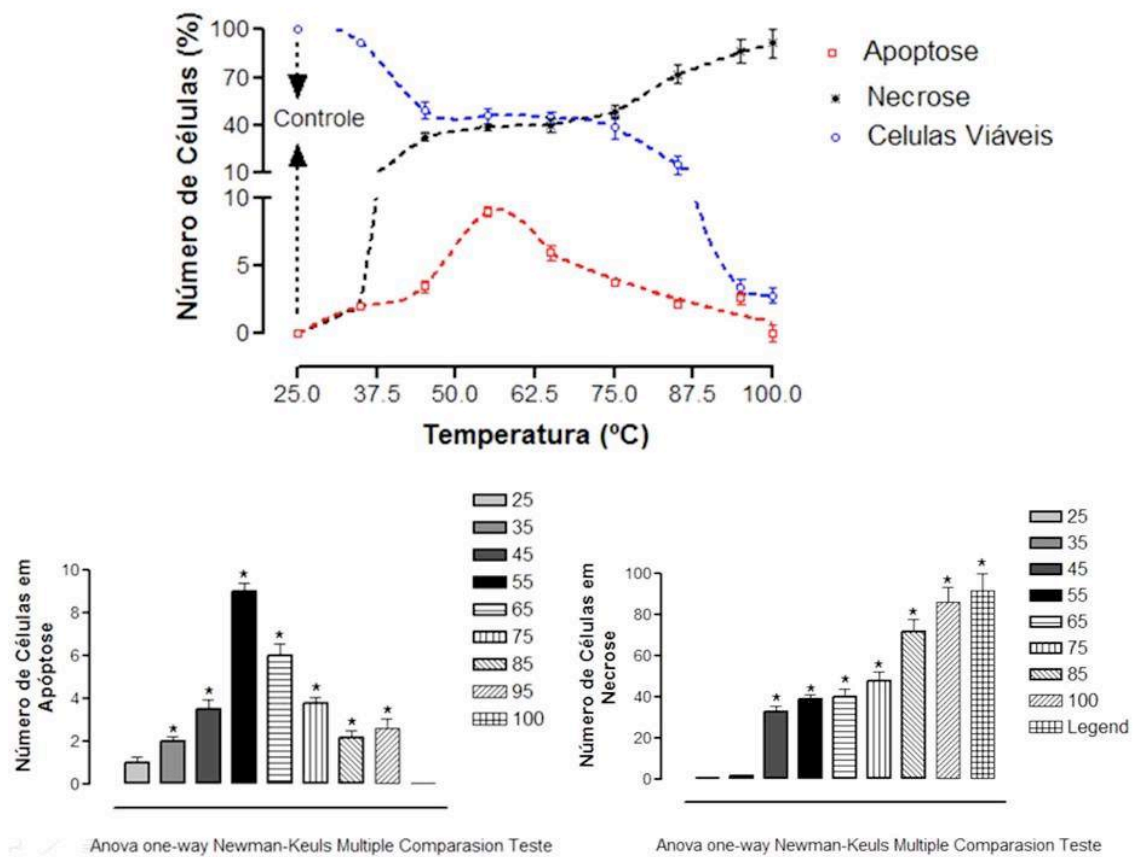


Figura 04 - Viabilidade celular por citometria de fluxo.

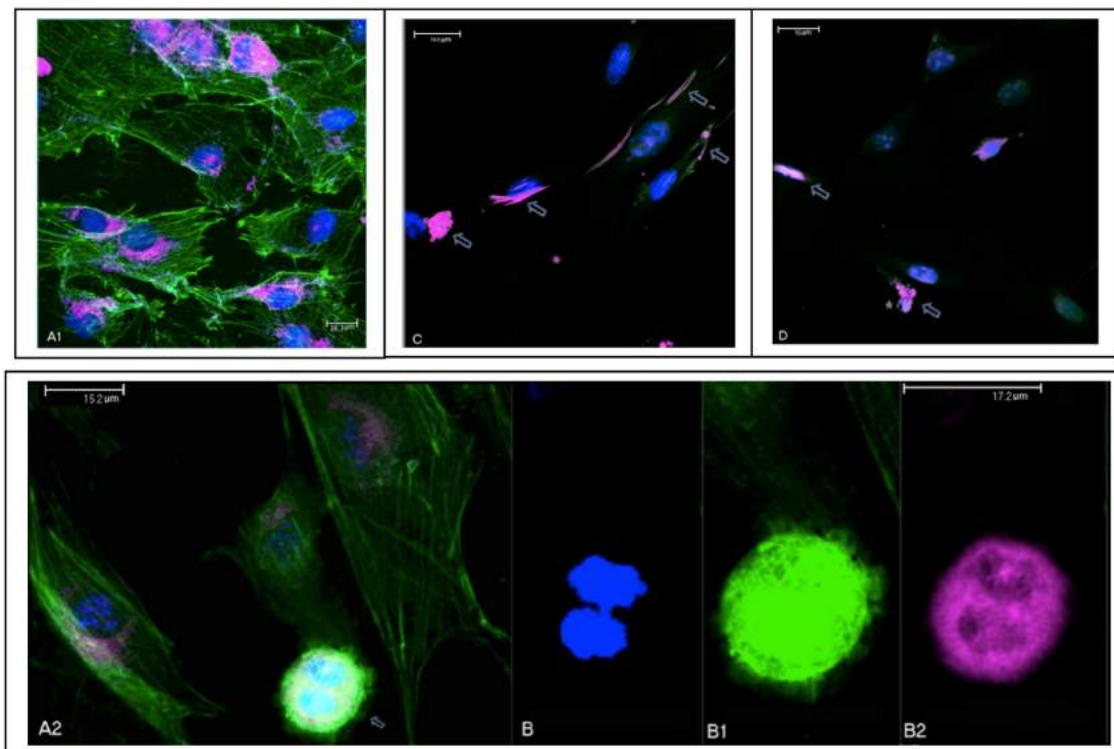
A análise por citometria de fluxo indicou que o aumento da temperatura promoveu o aumento da indução de apoptose e consequentemente do aumento progressivo de necrose das células NIH 3T3, como observado na figura 05. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos dados de quatro experimentos. Dados foram analisados utilizando-se *one-way* Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (nível de significância:  $p < 0,05$ ) \*:  $p < 0,05$



**Figura 05** - Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo.

### 5.3 Análise por Microscopia de Fluorescência e Microscopia Confocal

A Imunocitoquímica para Análise por Microscopia de Fluorescência e Microscopia Confocal foi realizada utilizando marcação das células com CellMask™ Deep Red que é um corante de membrana plasmática. Os núcleos celulares foram corados utilizando o DAPI (azul) e os filamentos de actina foram marcados com com Alexa-Fluor 488 (verde). A análise mostrou que, com a lesão térmica, há diminuição do número de células em mitose, células com fragmentação do DNA e vesículas de membrana (*blebbing*), além de núcleos picnóticos conforme demonstrado na figura 06.



**Figura 06** - Microscopia de fluorescência das células NIH-3T3. A1, A2) Fibroblastos sem lesão térmica (seta em A2 representa mitose). B, B1 e B2) Profundidade de campo extensa da célula marcada pela seta em A2. C, D) Fibroblastos com lesão térmica (setas indicam fragmentação do DNA e vesículas na membrana – *blebbing*. A estrela em D representa núcleo picnótico).

**Discussão**

## 6. DISCUSSÃO

A quantidade de referências e estudos sobre aspectos celulares e moleculares da queimadura térmica da pele é extremamente escassa na literatura. Há uma grande dificuldade para caracterizar as mudanças moleculares das células no modelo experimental de queimaduras térmicas *in vivo*. Essas envolvem muitas variáveis devido ao sistema de resposta às injúrias térmicas, como o processo inflamatório e a cascata de coagulação, que dificultam o entendimento do efeito direto do processo de queimadura térmica nas células (SOBRAL et al., 2007).

GRAGNANI (2009) relatou que as queimaduras são trauma complexo, de difícil tratamento, multidisciplinar, com altas morbidade e mortalidade no mundo todo, que afeta mais de um milhão de pacientes ao ano. Afirmou que sendo um panorama desafiador, é fundamental a evolução do conhecimento em queimaduras, com medidas de prevenção, melhora do tratamento e aumento do número de pesquisas. Existe segundo o estudo, pequeno número de profissionais focados no tratamento deste trauma, e muito menor o número de profissionais que priorizam desenvolvimento de pesquisa para melhora do tratamento e a criação de tecnologia a fim de resolver problemas ainda existentes na assistência das queimaduras.

Em modelo experimental *in vivo* de queimadura, por existir muitas variáveis, é difícil caracterizar as alterações celulares e moleculares. Esse trabalho procurou desenvolver um modelo experimental de queimadura térmica *in vitro* usando a linhagem celular NIH-3T3 de fibroblastos

---

indiferenciados com sucesso, esse modelo foi reprodutivo e eficiente. A capacidade de avaliar a atividade de células diferenciadas e imortalizadas da pele como as células da linhagem de fibroblastos NIH-3T3, são fundamentais para análise da resposta ao estresse térmico sem que houvesse a variação da resposta pela diferença da condição das células, no momento da indução do estresse. Os fibroblastos são um componente essencial da pele, eles não só produzem e organizam a matriz extracelular da derme, mas também se comunicam com outros tipos de celulares e entre si, desempenhando papel crucial na regulação da fisiologia da pele (ANSEL et al., 1996; WERNER & SMOLA, 2001).

SORRELL, 2004 afirmou que fibroblastos são um tipo celular diverso e dinâmico cujas funções na pele em muitos aspectos permanecem ainda desconhecidas. Diferenças específicas na fisiologia dos fibroblastos são evidentes nos fibroblastos da derme papilar, mais superficial e fibroblastos da camada reticular, que consiste na camada mais profunda da derme. Os fibroblastos envolvem interações fibroblasto-epidérmicas durante o desenvolvimento do cabelo e nas regiões interfoliculares da pele. Eles também desempenham importante papel no reparo das feridas cutâneas e um papel cada vez maior na bioengenharia da pele. Segundo o autor ainda a bioengenharia da pele desempenha papel crucial de conhecimento básico da biologia da pele, estudos para um veículo de teste para produtos aplicados topicamente e um recurso para substituição da pele em casos de perdas cutâneas extensas como as queimaduras.

Nas condições de estresse térmico para valores específicos de temperatura, nossos resultados mostram de maneira mensurável e inédita, que o delta de temperatura está diretamente associado a quantidade de calor transferida para células e a forma de morte por apoptose ou necrose

---

associada a quantidade de calor transferida durante o processo de queimadura térmica. Essa característica de resposta foi vista em lesões térmica por GRAVATE et al (2006), quando investigaram lesões causadas por queimaduras quanto à presença de células apoptóticas, comparando queimaduras de espessuras parcial, parcial profunda e total.

Queimaduras de espessura parcial profunda exibiram comportamento ambíguo: curaram-se espontaneamente ou evoluíram para queimaduras de espessura total. Neste estudo foi feita a colocação de fragmentos de DNA (por exemplo, rotulagem terminal de desoxinucleotidil transferase Biotin-dUTP) e anticorpos FAS-CD95 para calcular a taxa de apoptose de queimaduras superficiais, de espessura parcial profunda e espessura total em 45 pacientes após a lesão térmica. As biópsias foram coletadas durante a fase aguda (primeira semana de hospitalização). As queimaduras de espessura parcial profunda apresentaram células apoptóticas, tanto na derme como em anexos cutâneos, e apresentaram maior taxa de apoptose do que as queimaduras superficiais e de espessura total (44,5% na espessura parcial profunda, intervalo entre 6,3-90,5%, 5,6% na queimadura de espessura parcial superficial, intervalo: 0-13%; 0% para queimadura de espessura total; P .000243). Uma taxa de apoptose significativamente maior estava presente em células de queimaduras profundas de espessura parcial quando comparadas com espessura superficial e total. O estudo sugeriu que as queimaduras profundas sustentam um dano isquêmico que obriga as células a sofrer apoptose e pode representar a base biológica para sua evolução clínica em queimaduras de espessura total GRAVATE et al (2006).

EVERS et al (2010) fizeram uma revisão em que relatam a lesão da queimadura como um evento traumático complexo de efeitos locais e



---

sistêmicos, que afeta vários órgãos e sistemas além da pele. A fisiopatologia do paciente com queimadura mostra um espectro complexo de reações das respostas inflamatórias. Na fase aguda, o mecanismo de inflamação pode ter efeitos negativos devido ao vazamento capilar, à propagação da lesão por inalação e ao desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos. Notaram que as tentativas de mediar esses processos continuam sendo o mais importante assunto da pesquisa em queimaduras.

O modelo experimental de queimadura térmica *in vitro* apresentado nesse trabalho, usando a linhagem celular NIH-3T3 de fibroblastos indiferenciados é um modelo reprodutivo e eficiente, e permitiu avaliar a atividade de células diferenciadas e imortalizadas da pele como as células da linhagem de fibroblastos NIH-3T3 em resposta ao estresse térmico no momento da indução do estresse, avaliando as alterações morfológicas celulares associado ao processo de morte celular por necrose e/ou apoptose, impossível de ser avaliado com precisão para células da pele *in vivo*.

EVERS et al (2010) ainda afirmaram que em estudos histológicos a queimadura é um processo dinâmico que atinge o pico em cerca de três dias. O processo de apoptose foi identificado presente na zona de estase e pareceu contribuir para a progressão da ferida neste período. Os possíveis objetivos terapêuticos que os autores disseram que precisam ser melhor estudados são o significado clínico deste fenômeno sistêmico e o desenvolvimento de fármacos antiapoptóticos que impeçam ou modulem a "resposta de apoptose sistêmica" e seus efeitos fisiopatológicos.

Semelhante aos resultados deste estudo, no qual observou-se a diminuição da viabilidade celular em resposta a variação de temperatura, ou transferência de calor, BUTT, et al. (2017) realizaram estudo em viabilidade celular com fibroblastos e vitamina E após lesão térmica. Em

---

seu estudo a camadas epidérmica e dérmica da pele foram separadas manualmente. Os fibroblastos cultivados foram expostos às temperaturas de 45°C, 47°C, 49°C, 51°C, 53°C e 55°C durante 10 min. O nível de citotoxicidade foi analisado por ensaio de exclusão de azul de tripan, ensaio de MTT e ensaio de lactato desidrogenase (DHL). Observou-se, através desses ensaios que a lesão por calor a 51°C durante 10 minutos reduziu a viabilidade dos fibroblastos para  $49,3 \pm 1,3\%$ . Assim, selecionou-se esta temperatura para os ensaios subsequentes. Esses resultados corroboram com o que foi observado no trabalho anterior em 2014 (Fernandes, A.C.M. et al, 2014), considerando nesse modelo que para um delta de temperatura de 15° (temperatura final 45°C) por 30 segundos promoveu uma diminuição da viabilidade celular exponencialmente com o aumento da temperatura.

BUTT, et al. (2017) ainda consideraram que seus resultados levam à conclusão de que a adição prévia de vitamina E aos fibroblastos, *in vitro*, neutraliza os efeitos prejudiciais das lesões por calor e aperfeiçoa o conteúdo antioxidante das células afetando positivamente a via PI3-K/Akt, o que pode ter levado à ativação de genes associados a proliferação e regulação negativa dos genes responsáveis pela apoptose. Ademais, a vitamina E também incrementou as atividades parácrinas dos fibroblastos em resposta ao estresse térmico. Considerando ainda, o apresentado por BUTT, et al. (2017), em concordância com os resultados encontrados neste presente estudo.

Os resultados de BUTT, et al. (2017) reafirmaram os resultados deste estudo, visto que em modelo experimental *in vitro* de queimadura usando a linhagem celular NIH-3T3 de fibroblastos, este modelo experimental *in vitro* de queimadura mostrou indução de morte celular em resposta ao estresse térmico. Neste grau de correlação com a Literatura Científica aqui

---

descrita, os resultados mostraram que a transferência de calor é diretamente proporcional as lesões térmicas e aos danos celulares característicos do processo de queimadura. Além disso, permitiu em um ambiente estéril com temperatura controlada avaliar que a relação da transferência de calor da placa de borossilicato é diretamente proporcional a absorção de calor pela placa de cultura. Neste processo foi ainda definido que o tipo de morte celular depende diretamente dessa quantidade de calor transferida para as células de fibroblastos. Condição adequada que indicou que baixas temperaturas até um valor definido (delta de temperatura de 15°C) ocorre linearmente o aumento de células inviáveis ou em apoptose com baixo número de células em necrose; a partir deste valor o número de células em necrose aumenta, a diminuição da viabilidade é exponencial ao aumento de temperatura, ou aos danos celulares induzidos pela estresse térmico, principalmente para a membrana celular o que caracterizou efetiva e preferencialmente a morte por necrose.

FERREIRA (2005) afirmou a importância do desenvolvimento de modelos experimentais que está no fato desses auxiliarem na compreensão dos fenômenos naturais. Permitem melhor compreensão da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, do efeito de medicamentos ou dos resultados das intervenções cirúrgicas. Sua maior importância está relacionada ao respeito ético da não intervenção primária experimental em humanos. Assim, o modelo experimental deve ser o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar. São diversos os modelos descritos: culturas de células e tecidos (pesquisa *in vitro*), os animais de laboratório (pesquisa *in vivo*) e os modelos anatômicos, geralmente em cadáveres humanos. Os modelos *in vitro* são utilizados quando se deseja avaliar o comportamento molecular, bioquímico, celular e histoquímico dos tecidos. Os avanços em Biologia

---

Celular têm permitido um aumento no uso desse tipo de modelo experimental.

Neste contexto, um modelo experimental de queimadura pode promover avanços no conhecimento da fisiopatologia e novos agentes terapêuticos aplicados a esse modelo. Na cultura de células da pele é possível o estudo de vários fatores físicos ou químicos pela padronização de fatores que podem ter influência nas células cutâneas. Assim, são importantes os estudos em cultura de células e tecidos para o entendimento dos mecanismos de ação de agentes e condutas terapêuticas. (BRINGHAM et al., 1996; GRAGNANI FILHO et al., 2004; FERREIRA et al., 2005).

Como perspectivas futuras tem-se: a finalização do Projeto experimental *in vitro* de lesão térmica de fibroblastos NIH 3T3. Após estabelecimento do modelo experimental já definido neste presente trabalho, serão realizadas as seguintes etapas: determinação de potencial mitocondrial pela marcação com DiOC6, das fases do ciclo celular, das vias de morte celular do processos de apoptose induzido por queimaduras térmicas; finalização do projeto experimental *in vitro*: lesão térmica de fibroblastos NIH 3T3 na presença de extratos e biocompostos da planta Aroeira Vermelha (*Schinus terebenthifolius Raddi*, já em fase de finalização, com a colaboração da Universidade Estadual de Santa Cruz. Já tendo sido realizado as seguintes análises para todos os grupos: a) viabilidade Celular apor ensaios de MTT; b) determinação de atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil), faltando apenas para finalizar do Projeto e publicação do artigo a análise morfológica das células por microscopia confocal, utilizando os marcadores fluorescentes, como descrito por Fernandes, A.C.M. et al., 2014 além de estudos citoquímicos para análise morfológica, marcação de

---

mitocôndria, núcleo e filamento de actina utilizando o Microscópio de Fluorescência da Zeiss - LSM 700 (UESC); Realização de doutorado sanduíche.

**Conclusão**

## **7. CONCLUSÃO**

Com o aumento da temperatura de lesão térmica houveram mudanças significativas na atividade celular e viabilidade; mudanças drásticas na morfologia, com lise celular e aumento progressivo de apoptose e necrose das células NIH 3T3.

## **Referências**



---

## 8. REFERÊNCIAS

Ashburn MA. Burn pain: the management of procedure-related pain. *J Burn Care Rehabil.* 1995;16(3 Pt2):365-71.

Brigham PA, McLoughlin E. Burn incidence and medical care use in the United States: estimates, trends, and data sources. *J Burn Care Rehabil.* 1996;17(2):95-107.

Bringel FA (2011). Morphofunctional evaluation of human skin preserved in glycerol and exposed to gamma radiation: a study in athymic mice. Available from INIS:  
[http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:45014783](http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:45014783).

Borojevic R, Serricella P. Próteses vivas de pele humana. *Biotecnologia* 1999; 7:16-8.

Butt H et al. Protective role of vitamin E preconditioning of human dermal fibroblasts against thermal stress *in vitro*. *Life Sciences* 2017; 184:1-9.

Brigham PA; McLoughlin E. Burn Incidence and Medical Care Use in the United States: Estimates, Trends, and Data Sources, *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 1996; 17(2): 95-107.

Diegelman RF, McCoy BJ, Cohen IK. Growth kinetics and collagen synthesis by keloid broblasts *in vitro*. *J Cell Physiol* 1979; 98:341-6.

Evers LH, et al. The biology of burn injury. *Experimental Dermatology* 2010; 19:777-83.

Emanuelsson P, Kratz G. Characterization of a new *in vitro* burn wound model. *Burns.* 1997;23(1):32-6.

Fernandes, ACM et al. Development of experimental *in vitro* burn model. *Acta Cir. Bras.*, 2014; 29:15-20.

Ferreira LM; Hochman B; Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir. Bras.* 2005, 20:28-34.

- 
- Gianpiero G, et al. Apoptotic Cells Are Present in Ischemic Zones of Deep Partial-Thickness Burns, *Journal of Burn Care & Research*, 2006; 27(5):688-93.
- Gottrup F, Agren MS, Karlsmark T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen* 2000; 8: 83–96.
- Gragnani A; Ferreira LM. Pesquisa em queimaduras. *Rev Bras Queimaduras*. 2009;8(3):91-6.
- Hawkins A, Maclennan PA, McGwin Jr G, Cross JM, Rue LW, 3rd. The impact of combined trauma and burns on patient mortality. *J Trauma*. 2005;58(2):284-8.
- Iurk LK, Oliveira AF, Gragnani A, Ferreira LM. Evidências no tratamento de queimaduras. *Rev Bras Queimaduras*. 2010;9(3):95-9.
- Jansson K; Kratz G; Haegerstrand A. Characterization of a New *In Vitro* Model For Studies of Reepithelization on Human Partial Thickness Wounds. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal*, 1996;32:534-?.
- Keira, Sidney Mamoru et al. Experimental model for establishment of hypoxia in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks. *Acta Cir. Bras.*, 2004; 19: 23-7.
- McCoy BJ, Cohen IK. Effect of cellular aging and density on cell growth and collagen synthesis in keloid and normal fibroblasts. *In vitro*, 1982; 18:79-86.
- Pessoa, WS et al. Efeitos do extrato de angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) em feridas cutâneas de ratos. *Acta Cir. Bras.*, 2012; 27(10):655-70.
- Rosenkranz KM, Sheridan R. Management of the burned trauma patient: balancing competing priorities. *Burns*. 2002;28(7):665-9.
- Radtke J, et al. Wound healing studies with Traditional Chinese Herb 22 in an ex vivo porcine skin model. *Experimental Dermatology*, 2014; 23(3):E38-E38.
- Sorrell JM; Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of Cell Science* 2004; 117:667-75.

- 
- Singh M, et al. Development of a precise experimental burn model. *Burns*, 2016; 42(7):1507-12.
- Summer GJ, et al. Burn injury pain: the continuing challenge. *J Pain*. 2007;8(7):533-48.
- Sobral CS, et al. Human keratinocytes cultured on collagen matrix used as an experimental burn model. *J Burns Wounds*. 2007;7:e6.
- Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology*, 1963; 17(2):299-313
- Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):998-1008.
- Werner S; Smola H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends in Cell Biology*, 2001; 11(4):143-6.
- Wolf SE, Rose JK, Desai MH, Mileski JP, Barrow RE, Herndon DN. Mortality determinants in massive pediatric burns. An analysis of 103 children with > or = 80% TBSA burns (> or = 70% full-thickness). *Annals of Surgery*. 1997; 225(5):554-69.
- Zeng JZ, et al. Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides*. 2009; 30(6):1144-52.

**Normas Adotadas**

## 9. NORMAS ADOTADAS

ISO – International Standardization Organization

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASTM F 2150-02. American Society Test Materials Forms C7/123

BIREME – Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde

DeCS: Descritores em Ciências da Saúde

Houaiss A. Dicionário Eletrônico Houaiss. Versão Monusuário 2009. São Paulo: Objetiva; 2009

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication [online]. Philadelphia (PA): ICMJE Secretariat office, American College of Physicians; [updated 2010 Apr, cited 2011 Jan 23]. Available from: URL: <http://www.icmje.org>

Ferreira LK et al. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. 2ª ed. São Paulo: RED Publicações, 2017.

PubMed.gov. U.S. National Library of Medicine – National Institutes of Health. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Sociedade Brasileira de Anatomia. Nômina Anatômica. 5ª ed. Rio de Janeiro (BR): Medsi; 2001.

**Abstract**

## 10. ABSTRACT

**Introduction:** Burns are responsible for pathophysiological, cellular and molecular changes and represent a severe form of trauma. There are few *in vitro* studies that allow the analysis of viability and cell death in thermal burns. **Objective:** To develop an experimental *in vitro* burn model capable of evaluating the activity of skin cells such as NIH-3T3 fibroblast line cells under thermal stress conditions for specific temperature values. Characterizing the cellular morphology and the process of cell death by necrosis and / or apoptosis associated with thermal burn, impossible to be evaluated for skin cells *in vivo*. **Methods:** 1) NIH-3T3 fibroblast line cells were used, which were subjected to thermal burn for 30s at specified temperatures; 2) The effects of thermal injury on cell viability were determined by: MTT assay, flow cytometry and immunohistochemistry; 3) statistical analysis was performed by the ANOVA variance test, for  $p < 0.05$ , considering the mean and standard error of quadruplicates,  $n=4$ . **Results:** the MTT assay determined two graphical curves (two phases) with an inflection point for the delta temperature of  $15^{\circ} \text{C}$ ; flow cytometric analysis indicated that with the increase of the delta temperature there was progressively increase in apoptosis followed by progressive increase in necrosis; the immunohistochemistry evidenced that with the increase in temperature there was a decrease in number of cells and number of mitosis, changes in membrane structure and cytoskeleton (formation of vesicles), with pycnotic and irregular nuclei. **Conclusion:** With the increase of thermal injury temperature there were significant changes in cellular activity and viability; drastic changes in morphology, with cellular lysis and progressive increase of apoptosis and necrosis of NIH 3T3 cells.

## **Fontes Consultadas**



## 11. FONTES CONSULTADAS

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de Pesquisa. Acta Cir Bras [serial online] 2005; 20:02-9. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502005000800002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502005000800002&script=sci_arttext).

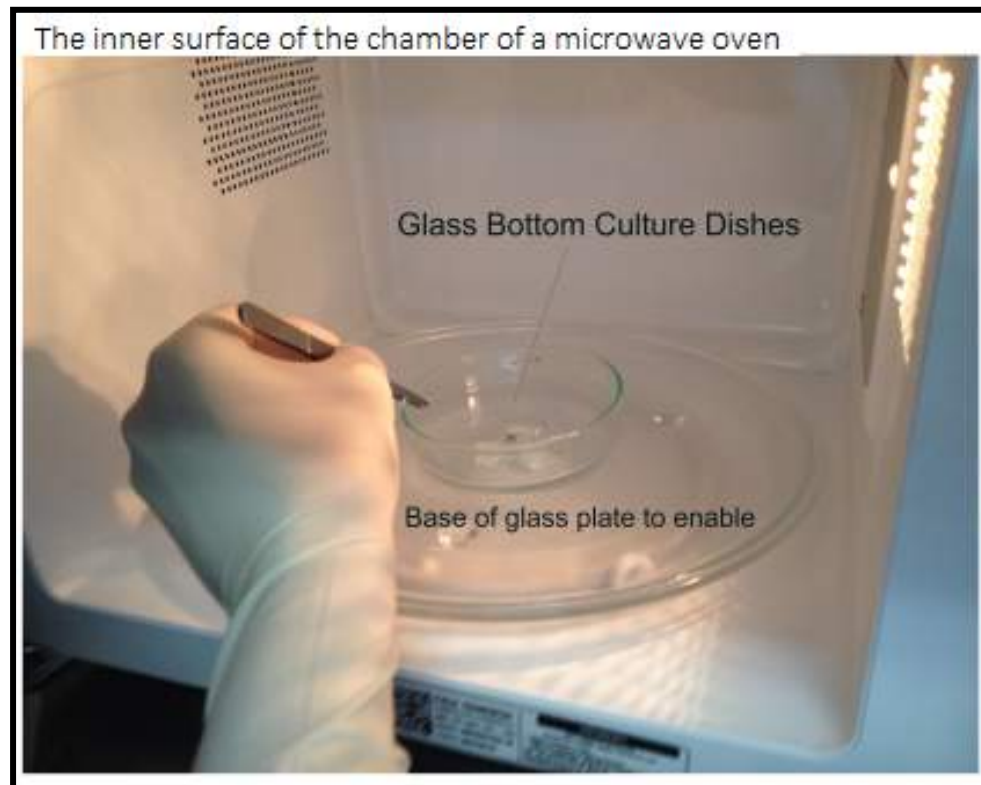
Nahas FX, Ferreira LM. A arte de redigir um trabalho científico [online]. Acta Cir Bras. 2005;20(2):17-7. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttex&pid=S0102-865020050000800005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S0102-865020050000800005).

**Apêndice**

## **12. APÊNDICE**

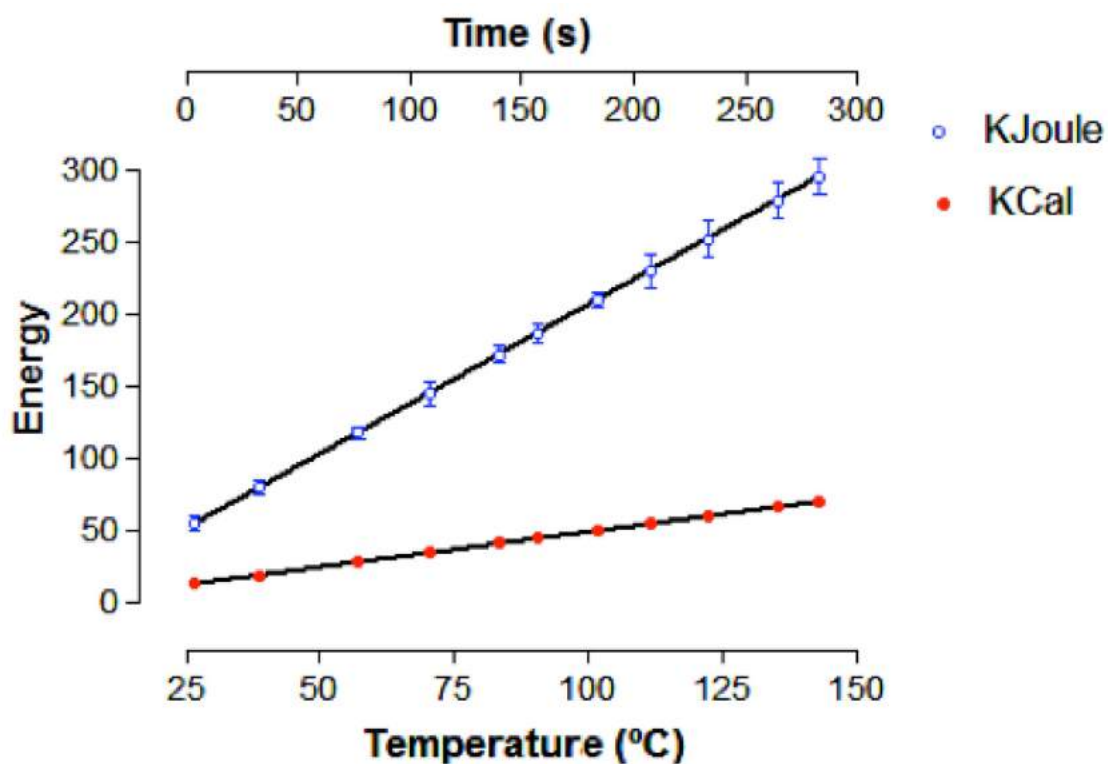


## 13. ANEXO 1



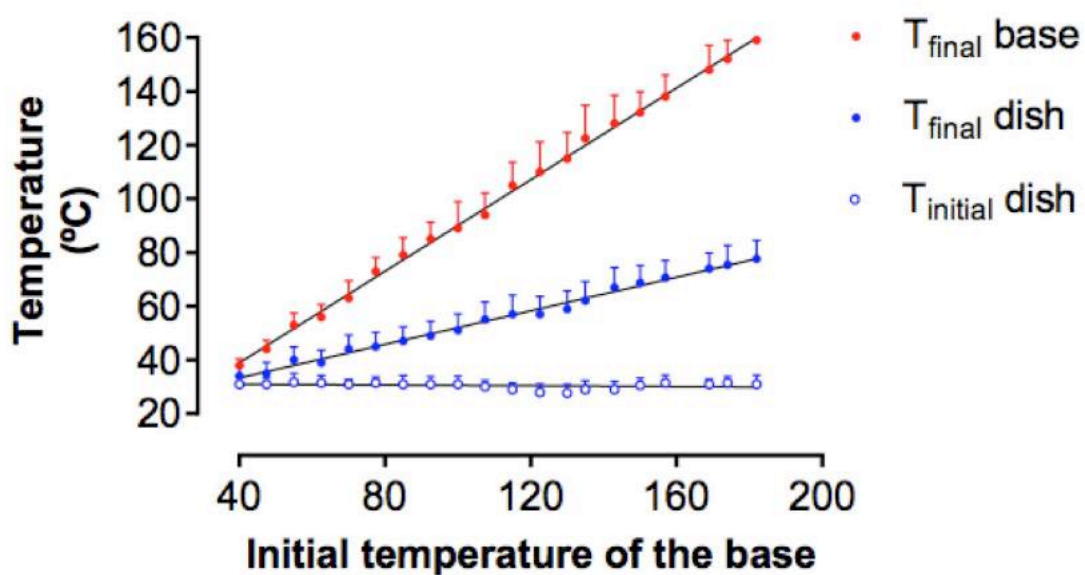
Momento da indução de lesão térmica. A placa de Petri de vidro contendo as células NIH-3T3 é colocada em contato com a base aquecida de borossilicato do aparelho de micro-ondas (Fernandes, ACM et al, 2014).

## 13. ANEXO 2



Aquecimento da base de vidro de borossilicato do forno de micro-ondas para transferência de calor para a placa de Petri (Fernandes, ACM et al, 2014).

### 13. ANEXO 3



Transferência de calor da base de vidro de borossilicato para as placas de Petri de vidro após um tempo de contato de 30 segundos (Fernandes, ACM et al, 2014).

---

## 13. ANEXO 4

### 4 - ORIGINAL ARTICLE MODELS, BIOLOGICAL

#### Development of experimental in vitro burn model<sup>I</sup>

Ana Carolina Morais Fernandes<sup>I</sup>, Jerônimo Pereira de França<sup>II</sup>, Silvana Gaiba<sup>III</sup>, Antonio Carlos Aloise<sup>IV</sup>, Andrea Fernandes de Oliveira<sup>V</sup>, Andrea Aparecida de Fátima Souza Moraes<sup>VI</sup>, Lucimar Pereira de França<sup>II</sup>, Lydia Masako Ferreira<sup>VII</sup>

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502014001400004>

<sup>I</sup>MD, Resident, Burn Care Unit, Plastic Surgery Division, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. Technical procedures.

<sup>II</sup>PhD, Associate Professor, Department of Biological Sciences, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brazil. Scientific and intellectual content of the study, interpretation of data and critical revision.

<sup>III</sup>PhD, Fellow Pos-PhD degree, Department of Biological Sciences, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brazil. Technical procedures, acquisition and interpretation of data, manuscript writing.

<sup>IV</sup>PhD, Fellow Pos-PhD degree, Plastic Surgery Division, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. Interpretation of data and critical revision.

<sup>V</sup>PhD, Fellow PhD degree, Plastic Surgery Division, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. Interpretation of data and critical revision.

<sup>VI</sup>PhD, Department of Biological Sciences, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brazil. Technical procedures.

<sup>VII</sup>Head and Full Professor, Plastic Surgery Division, UNIFESP, Researcher 1A-CNPq, Director Medicine III-CAPES, Sao Paulo-SP, Brazil. Interpretation of data and critical revision.

---

#### ABSTRACT

**PURPOSE:** To propose an experimental burn model in NIH-3T3 cell line.

**METHODS:** Induction of thermal injury in cultures of mouse fibroblast - NIH-3T3- cell line and determination of cell viability by MTT and imunofluorescence.

**RESULTS:** The heating of the Petri dish increased proportionally to the temperature of the base and the time of exposure to microwave. In this in vitro burn model, using the cell line NIH-3T3 was observed drastic cellular injury with significant changes in cell viability and activity. It showed drastically modified cell morphology with altered membrane, cytoskeleton and nucleus, and low cellularity compared to the control group.

**CONCLUSION:** The burn model in vitro using the cell line NIH-3T3 was reproductive and efficient. This burn model was possible to determine significant changes in cell activity and decreased viability, with drastic change in morphology, cell lysis and death.

**Key words:** Burn; fibroblast; cell line NIH-3T3; microwave; MTT; Confocal microscopy.

---