



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

RENATO DE CASTRO SPADA RIBEIRO

**Modelo experimental para estudo da cicatrização de queimaduras
de espessura total em ratos e o efeito do Regederm® comparado a
sulfadiazina de prata no reparo tecidual**

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Renato de Castro Soada Ribeiro

Título do trabalho: Modelo experimental para o estudo da cicatrização de queimaduras de espessura total em ratos e o efeito de Regederm® comparado a sulfáciaz na cicatrização local

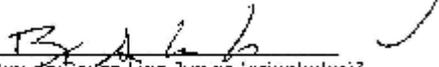
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Renato de Castro Soada Ribeiro (autor)*

Ciente e de acordo:


Ruy de Souza Lima Junior (orientador)*

Data: 16 / 01 / 2018

* Neste caso o documento será embargado por até 30 dias a partir da data do defesa. A extensão deste prazo somente justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro em patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação de dissertação-tese em livro

*A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em maio de 2017.

RENATO DE CASTRO SPADA RIBEIRO

Modelo experimental para estudo da cicatrização de queimaduras de espessura total em ratos e o efeito do Regederm® comparado a sulfadiazina de prata no reparo tecidual

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

Co-orientador: Profa. Dra. Fatima Mrue

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro, Renato de Castro Spada

Modelo experimental para o estudo da cicatrização de queimaduras de espessura total em ratos e o efeito do Regederm® comparado a sulfadiazina de prata no reparo tecidual [manuscrito] / Renato de Castro Spada Ribeiro. - 2017. xvi, 99 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior; co-orientadora Dra. Fatima Mrue.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Queimaduras. 2. cicatrização. 3. Regederm®. 4. sulfadiazina. 5. experimental. I. Lino Junior, Ruy de Souza, orient. II. Título.

CDU 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO - CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmtsp@ufg.br

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE RENATO DE CASTRO SPADA RIBEIRO - Aos onze dias do mês de dezembro do ano de 2017 (11/12/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. RUY DE SOUZA LINO JÚNIOR, MANOEL FRANCISCO BIANCARDI, MARIA MÁRCIA BACHION, CLÉVER GOMES CARDOSO e HÉLIO GALDINO JÚNIOR, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DE ESPESSURA TOTAL EM RATOS E A INFLUÊNCIA DO REGEDERM® NO REPARO TECIDUAL”** em nível de DOUTORADO, área de concentração em PATOLOGIA, de autoria de RENATO DE CASTRO SPADA RIBEIRO discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador Prof. Dr. RUY DE SOUZA LINO JÚNIOR, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1034/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

Dr. Manoel Francisco Biancardi

Dra. Maria Márcia Bachion

Dr. Cléver Gomes Cardoso

Dr. Hélio Galdino Júnior

Aprovado / Reprovado

Aprovado

Supranada

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato HABILITADO (Habilitado ou não Habilitado), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em PATOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 18h04min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DE ESPESSURA TOTAL EM RATOS E O EFEITO DO REGEDERM® COMPARADO A SULFADIAZINA DE PRATA NO REPARO TECIDUAL.

Dr. Ruy de Souza Lino Júnior (IPISP/UFG)

Dr. Manoel Francisco Biancardi (FEN/UFG)

Dra. Dra. Maria Márcia Bachion (FEN/UFG)

Dr. Cléver Gomes Cardoso (ICB/UFG)

Dr. Hélio Galdino Júnior (FEN/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

José Clementino de Oliveira Neto
Manoel Francisco Biancardi
Maria Márcia Bachion
Cléver Gomes Cardoso
Hélio Galdino Júnior
José Clementino de Oliveira Neto

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: Renato de Castro Spada Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

Membros:

1. Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

2. Prof. Dr. Cléver Gomes Cardoso

3. Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi

4. Prof. Dr. Hélio Galdino Júnior

5. Profa. Dra. Maria Márcia Bachion

Data: 11/12/2017

DEDICATÓRIA

À minha família, Sara, Mateus e Samuel!

AGRADECIMENTOS

“[...] the being and appearing grateful. For this one virtue is not only the greatest, but is also the parent of all the other virtues [...]”

Marcus Tullius Cicero

A todos que contribuíram para essa realização

À minha família, por seu apoio sempre presente, por sua paciência e compreensão e por seu amor incondicional.

Ao Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior, pela disposição, tranquilidade e pelos ensinamentos científicos e humanos ao longo do nosso período de trabalho.

À Prof. Dra. Fátima Mrue, pelo auxílio e pela disposição.

Aos Profs. Drs. Cléver Gomes Cardoso, Dra. Lilian Varanda Pereira e Dra. Leonice Manrique Faustino Tresvenzol pelas contribuições na qualificação.

Aos Profs. Dr. Manoel Francisco Biancardi, Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos e Dra. Marina Clare Vinaud pelas contribuições no estudo.

Aos colegas do Laboratório – Marcelo, Diego, Sara, Vânia, Hidelberto, Anália e Neto – pelas contribuições na realização deste trabalho.

Às minhas alunas e aos alunos de iniciação científica do Prof. Ruy, pelo apoio durante a pesquisa: Adrienne, Alessa, Carolina, Caroline, Helen, Ingredy, Ingrid, Katarine, Letícia, Mariana, Renata, Luiz, Rodrigo e Yanley.

Aos Professores do PPGMTSP pelos ensinamentos.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	viii
QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	ix
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	17
Queimaduras	17
1.1.1. Conceito e epidemiologia	17
1.1.2. Patologia das queimaduras.....	19
1.1.3. Tratamento das queimaduras	22
Cicatrização	26
1.1.4. Fase inflamatória.....	26
1.1.5. Fase de proliferação	27
1.1.6. Fase de remodelamento	28
Modelo experimental de queimaduras e cicatrização	29
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	35
4. MÉTODOS	36
5. RESULTADOS	41
Artigo 1.....	42
Artigo 2.....	58
6. DISCUSSÃO	80
7. CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	88
Anexo 1 – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	98
Anexo 2 – Comprovante de submissão do artigo	99

QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

MÉTODOS

Figura 1: Representação do anel de EVA e queimadura	39
---	----

ARTIGO 1

Figure 1: Groups distribution and treatment with 1% silver sulfadiazine and Regederm®. DAI: days after injury induction.	45
Figure 2: Macroscopic evaluation of full thickness burning wounds experimentally induced in Wistar rats treated with 1% silver sulfadiazine (G1) and Regederm® (G2) at 3, 7, 14, 21 e 30 days after injury induction (DAI). Arrows indicate the crust over the wounds.	49
Figure 3: Microscopic evaluation of full thickness burning wounds experimentally induced in Wistar rats treated with 1% silver sulfadiazine (G1) and Regederm® (G2) at 3, 7, 14, 21 e 30 days after the injury induction (DAI).....	52
Table 1: Wound contraction (C%) in full thickness burning wound experimentally induced in rats treated with 1% silver sulfadiazine or Regederm® in a period of 30 days.	47
Table 2: Qualitative macroscopic evaluation of the crust formed in full thickness burning wounds experimentally induced in rats treated with 1% silver sulfadiazine or Regederm®.	48
Table 3: Qualitative microscopic analysis of the general pathologic processes in full thickness burning wound experimentally induced in Wistar rats treated with 1% silver sulfadiazine (G1) and Regederm® (G2).....	51
Table 4: Collagen quantification (%) in full thickness burning wound experimentally induced Wistar rats treated with 1% silver sulfadiazine (G1) and Regederm® (G2). ...	53

ARTIGO 2

Figura. 1: Representação da distribuição dos ratos Wistar em grupos e subgrupos	62
Figura. 2: Representação do anel de EVA e queimadura	64
Figura. 3: Aspecto macroscópico de queimaduras de espessura total em ratos após tratamento aos 7, 14, 21 e 30 DAI.	68
Figura. 4: Fotomicrografia de queimaduras de espessura total em ratos após tratamento aos 3, 7, 14, 21 e 30 DAI.	71

Tabela. 1: Redução percentual da área das queimaduras ($\Delta A\%$) de espessura total em ratos Wistar	66
Tabela. 2: Análise macroscópica qualitativa da crosta em queimaduras de espessura total em ratos Wistar	67
Tabela. 3: Análise microscópica qualitativa dos processos patológicos gerais em queimaduras de espessura total em ratos Wistar.	70
Tabela. 4: Proporção de alfa-actina (%) em queimaduras de espessura total em ratos ..	72

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

$\Delta A\%$ – grau de redução percentual da área da queimadura

Af – área final

Ai – área inicial

C% – contração da ferida

DAI – dias após a indução da queimadura

DAPI – (4',6-diamidino-2-fenil-indol)

EGF – fator de crescimento epidérmico

EVA – etileno-acetato de vinila

bFF – fator de fibroblasto básico

FGF – fator de crescimento de fibroblasto

G1 – grupo controle: ratos tratados com creme com sulfadiazina de prata 1%

G2 – grupo 2: ratos tratados com Regederm®

G3 – grupo 3: ratos tratados com creme com sulfadiazina de prata 1% e fixação de anel

HE – hematoxilina e eosina

IL-1 – interleucina 1

Max – máximo

Min – mínimo

MN – infiltrado inflamatório de mononucleares

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

PMN – infiltrado inflamatório de polimorfonucleares

SD – desvio padrão

SSD – sulfadiazina de prata 1%

TGF- α – fator transformador de crescimento alfa

TGF- β – fator transformador de crescimento beta

TNF – fator de necrose tumoral

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

Modelo experimental para estudo da cicatrização de queimaduras de espessura total em ratos e o efeito do Regederm® comparado a sulfadiazina de prata no reparo tecidual

Introdução: os modelos experimentais para o estudo da cicatrização em queimaduras são importantes para a compreensão dos mecanismos patológicos desta lesão e desenvolvimento de propostas terapêuticas. **Objetivo:** desenvolver um modelo experimental para o estudo da cicatrização de queimaduras em ratos e analisar o processo cicatricial após o tratamento com creme com sulfadiazina de prata 1% ou creme-gel Regederm®. **Métodos:** setenta ratos foram submetidos a queimaduras de espessura total, desbridamento por excisão tangencial no dia 2 após a lesão, tratamento com curativos oclusivos e distribuídos nos grupos: (G1) – tratados com creme com sulfadiazina de prata 1%; (G2) – tratados com Regederm®; (G3) – tratados com creme com sulfadiazina de prata 1% e fixação de anel estabilizador para impedir a contração da queimadura. As feridas foram avaliadas morfométrica, macroscópica e microscopicamente nos dias 3, 7, 14, 21 e 30. **Resultados:** as queimaduras produzidas foram de espessura total, pois provocaram lesão que atingiu a hipoderme e o desbridamento por excisão tangencial proporcionou a remoção da necrose (crosta) da ferida. Na comparação entre o G1 e o G3, houve maior presença de crosta e redução da área total da queimadura no G1 aos 7 DAI ($p=0,032$) e maior redução da área total da queimadura no G3 aos 14 DAI ($p=0,009$). O G1 apresentou maior presença de hiperemia ($p=0,002$) e hemorragia ($p=0,030$) na fase proliferativa e maior presença de infiltrado mononuclear ($p=0,015$) na fase de remodelamento. Por outro lado, o G3 apresentou maior presença de fibroblastos ($p=0,009$) aos 30 DAI. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na quantificação de miofibroblastos pela presença de α -actina. Quando se comparou o G1 e o G2, não houve diferenças entre esses grupos na angiogênese e fibroplasia ao longo do processo de reparo da queimadura nem no tempo de fechamento da lesão. Observou-se maior contração da ferida aos 7 DAI ($p=0,007$) no G1. No G2 encontrou-se maior presença de crosta nas feridas aos 3 DAI ($p=0,02$) e 7 DAI ($p=0,015$), maior hiperemia ($p=0,036$) e infiltrado inflamatório ($p=0,029$) na fase inflamatória, maior hemorragia ($p=0,015$), presença de células mononucleares ($p=0,030$) e colágeno ($p=0,001$) na fase proliferativa

e maior hiperemia ($p=0,017$) na fase de remodelamento. **Conclusão:** o modelo proposto foi eficiente na produção de queimadura de espessura total e remoção da necrose. A utilização do anel não influenciou no tempo de fechamento da lesão, mas modificou o formato das feridas. As queimaduras dos animais tratados com Regederm® não apresentaram angiogênese e fibroplasia significativamente diferentes das queimaduras dos animais tratados com sulfadiazina de prata 1%.

Palavras-chave: Queimaduras. Cicatrização. Regederm®. Sulfadiazina. Experimental. Ratos.

ABSTRACT

Experimental model for the study of full-thickness burn healing in rats and the effect of Regederm® compared to silver sulfadiazine on tissue repair

Introduction: experimental models for the study of healing in burns are important for understanding the pathological mechanisms of this injury and the development of therapeutic approaches. **Purpose:** To develop an experimental model for the study of healing of burns in rats and to analyze the healing process following treatment with 1 % silver sulfadiazine cream or Regederm® gel. **Methods:** Seventy rats were submitted to full thickness burns, debridement by tangential excision at day 2 after the injury, treatment with occlusive dressings and distributed in two groups: (G1) - treated with 1% silver sulfadiazine cream; (G2) treated with Regederm®; (G3) - treated with 1% silver sulfadiazine cream and splint to prevent burn contraction. The wounds were evaluated morfometrically, macroscopically and microscopically on days 3, 7, 14, 21 and 30. **Results:** full thickness burns were produced as the injury reached the hypodermis and debridement performed by tangential excision removed all necrosis (crust) of the wound. In the comparison between G1 and G3, there was a greater presence of crust and reduction of total burn area at G1 at 7 DAI ($p = 0.032$) and greater reduction of total burn area at G3 at 14 DAI ($p = 0.009$). G1 presented a higher presence of hyperemia ($p = 0.002$) and hemorrhage ($p = 0.030$) in the proliferative phase and a greater presence of mononuclear infiltrate ($p = 0.015$) in the remodeling phase. On the other hand, G3 had a greater presence of fibroblasts ($p = 0.009$) at 30 DAI. No significant differences were found between the groups in the quantification of myofibroblasts by the presence of α -actin. When comparing G1 and G2, there were no differences between these groups in angiogenesis and fibroplasia throughout the burn repair process nor at the time of injury closure. A greater contraction of the wound was observed at 7 DAI ($p = 0.007$) in G1. G2 presented a higher presence of crust in the wounds at 3 DAI ($p = 0.02$) and 7 DAI ($p = 0.015$), greater hyperemia ($p = 0.036$) and inflammatory infiltrate ($p = 0.029$) in the inflammatory phase, greater bleeding ($p = 0.015$), presence of mononuclear cells ($p = 0.030$) and collagen ($p = 0.001$) in the proliferative phase and greater hyperemia ($p = 0.017$) in the remodeling phase. **Conclusion:** The model was efficient in producing burning and removing the full thickness necrosis. The use of the splint did not affect the

healing time of the injury, but changed the format of the wounds. Burns of Regederm®-treated animals did not show significantly different angiogenesis and fibroplasia from burns in animals treated with 1% silver sulfadiazine.

Keywords: Burns. Healing. Regederm®. Sulfadiazine. Experimental. Rats.

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

Queimaduras

1.1.1. Conceito e epidemiologia

Queimadura é definida como uma lesão da pele ou outro tecido orgânico, geralmente causadas pelo contato com líquidos quentes (escaldamento), sólidos quentes (queimaduras por contato) ou fogo. Também podem ser produzidas pelo frio, eletricidade, agentes químicos, radiação ou fricção (PECK, 2011).

A gravidade da queimadura depende da extensão e da profundidade da lesão (YOSHINO et al., 2016), que se caracteriza pela destruição parcial ou total da pele, podendo atingir tecidos ou estruturas mais profundas, como a hipoderme, músculo, tendão e o osso (ELLISON, 2013). Queimaduras podem ser uma das mais difíceis condições enfrentadas pela medicina (HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004a), resultando em significativa morbidade, prejuízo do bem-estar emocional e da qualidade de vida (SMOLLE et al., 2016). Entretanto, a mortalidade relacionada as queimaduras têm decrescido durante as últimas 4 décadas devido ao desenvolvimento dos cuidados de saúde e do conhecimento da patologia da queimadura, que resultam em melhores tratamentos e taxas de sobrevivência. Estudos com amplos bancos de dados originários de centros para tratamento de pacientes com queimaduras nos Estados Unidos, Inglaterra e País de Gales apresentaram taxa de sobrevivência entre 96,1% e 98,5% (BESSEY et al., 2014; STYLIANOU; BUCHAN; DUNN, 2015).

Os fatores de risco para as queimaduras são multivariados e estão inter-relacionados (PECK, 2011). A incidência das queimaduras tem sido associada ao gênero, idade, baixa escolaridade, padrão socioeconômico e etnia (BRUSSELAERS et al., 2010; COSTA; SILVA; SANTOS, 2015; GAWRYSZEWSKI et al., 2012).

A incidência de queimaduras é maior em adultos homens (BESSEY et al., 2014; BRUSSELAERS et al., 2010; COSTA; SILVA; SANTOS, 2015; GAWRYSZEWSKI et al., 2012; STYLIANOU; BUCHAN; DUNN, 2015;) e a principal causa é o contato com fogo e a segunda o escaldamento (BESSEY et al., 2014; BRUSSELAERS et al.,

2010; SCHIEFER et al., 2016). Em mulheres e crianças o escaldamento é a principal causa de queimaduras (BRUSSELAERS et al., 2010; COSTA; SILVA; SANTOS, 2015). Na Inglaterra e País de Gales o escaldamento é a principal causa de queimaduras em ambos os sexos, a segunda causa é o contato e a terceira o fogo (STYLIANOU; BUCHAN; DUNN, 2015). A maioria das queimaduras são acidentais e acontecem em ambiente domiciliar (BESSEY et al., 2014; BRUSSELAERS et al., 2010; COSTA; SILVA; SANTOS, 2015). São as principais causas de acidentes envolvendo crianças em países como Brasil, Canadá, Reino Unido, China e Austrália (COSTA; SILVA; SANTOS, 2015).

Há uma tendência mundial decrescente de incidência de queimaduras, gravidade da lesão, duração da internação e taxa de mortalidade, especialmente em países altamente desenvolvidos. Os dados de pesquisas de países desenvolvidos e mediantemente desenvolvidos são heterogêneos. Não há estudos em epidemiologia das queimaduras em países de baixa e média renda (SMOLLE et al., 2016). As queimaduras têm maior prevalência entre populações de baixa condição socioeconômica, em regiões menos desenvolvidas e em desenvolvimento (PECK, 2011; SMOLLE et al., 2016).

Apesar da redução na incidência, o número de ocorrências de queimaduras no mundo ainda é alto e as estratégias de prevenção nem sempre apresentam os resultados desejados. Os registros de dados epidemiológicos sobre as queimaduras são escassos e pouco se sabe, por exemplo, sobre a etiologia das queimaduras na Alemanha e suas mudanças ao longo dos últimos 25 anos, havendo uma lacuna de publicações considerando o assunto (SCHIEFER et al., 2016). Também na Inglaterra existem poucos artigos descrevendo a epidemiologia das lesões por queimadura na população do Reino Unido. A maioria dos artigos tratam de dados de serviços individualizados ou de subpopulações (STYLIANOU; BUCHAN; DUNN, 2015). Não há na Europa, por exemplo, registro de larga escala da incidência de queimaduras (BRUSSELAERS et al., 2010). Assim, apesar da alta prevalência, existe reduzida quantidade de estudos epidemiológicos sobre queimaduras (MACEDO et al., 2012). Estudos sobre a epidemiologia das queimaduras deveriam ser executados, especialmente em países menos desenvolvidos (SMOLLE et al., 2016).

No Brasil, as queimaduras são um problema de saúde pública, com grande ônus financeiro para o Estado e que podem levar à incapacidade permanente do indivíduo. Atingem aproximadamente 2 milhões de pessoas e geram um gasto para o Sistema Único de Saúde de cerca de 55 milhões por ano (MACEDO et al., 2012). O tratamento

de queimaduras representa o maior valor gasto pelo Sistema Único de Saúde com internações por causas externas (FERREIRA; PAULA, 2013). No Brasil há uma lacuna de dados oficiais sobre a epidemiologia das queimaduras (IURK et al., 2010).

1.1.2. Patologia das queimaduras

A queimadura produz alterações locais e sistêmicas no organismo exposto à agressão. A exposição prolongada a temperaturas superiores a 40°C produz desnaturação de proteínas e compromete a integridade da membrana plasmática. Esse processo é rápido e pode durar menos de 1 segundo em temperaturas acima de 60°C (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010). O calor produz interrupção das ligações cruzadas do colágeno, danos diretos as células epiteliais e a integridade endotelial dos capilares e oclusão dos vasos sanguíneos (TOUSSAINT; SINGER, 2014). O prejuízo as membranas celulares e sua despolarização e as ligações do colágeno comprometem os gradientes de pressão osmótica e hidrostática e resultam em trocas de fluidos e edema local (KECK et al., 2009). As alterações locais resultam no quadro clínico de necrose isquêmica ou por coagulação e ocorre no centro da lesão. As alterações tornam-se menores na periferia da lesão (JACKSON, 1953).

As alterações morfológicas e funcionais produzidas pela queimadura promovem a liberação de diversos mediadores no local e no sangue que promoverão a resposta inflamatória. Os macrófagos e neutrófilos são ativados e infiltram a lesão, liberando prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e interleucinas (KECK et al., 2009). Outros mediadores locais liberados são histamina, serotonina, bradicinina, óxido nítrico, radicais livres de oxigênio e fator de necrose tumoral (TNF). A histamina provavelmente é o maior responsável pelo aumento da permeabilidade vascular observado imediatamente após a ocorrência da queimadura (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010). Esses mediadores desempenham importante e complexo papel na patogênese do edema e das anormalidades cardiovasculares após a queimadura (KECK et al., 2009).

A patologia das lesões por queimaduras tem sido descrita pelo modelo de feridas por queimaduras de Jackson (1953). Seu modelo estabeleceu a teoria das zonas concêntricas do tecido queimado, que é classificado em três regiões: (1) a região central,

chamada região de coagulação por conter necrose, cercada pela (2) região de estase, caracterizada pelo fluxo sanguíneo estagnado e hipoperfusão tecidual e a (3) região hiperêmica mais externa, caracterizada pela vasodilatação e mudanças inflamatórias sem danos estruturais.

O tecido na zona de coagulação é diretamente destruído pela lesão térmica, resultando em necrose. É a zona mais próxima da fonte de calor. A zona de hiperemia é a mais externa e se caracteriza por ter aumento de perfusão e geralmente tem recuperação completa sem nenhuma seqüela (HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004b; TOUSSAINT; SINGER, 2014).

Pela perspectiva clínica, a zona de estase representa um dos maiores desafios, pois esse tecido tem potencial para a cura ou pode progredir para uma lesão de espessura total. A zona de estase apresenta intensa reação inflamatória, edema, trombose de capilares, vasoconstrição, coagulação sanguínea e isquemia. Essa zona será recuperada apenas se a vascularização for reestabelecida em poucos dias com proteção e tratamento e não haja complicadores. Caso contrário, a hipóxia, falta de nutrientes e acúmulo de resíduos metabólicos tóxicos produzirão morte tecidual. Essa necrose da zona de estase é responsável pela progressão secundária da queimadura (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010; HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004b; SCHMAUSS et al., 2015).

As queimaduras ampliam o efeito sistêmico quando atingem 30% da superfície corporal. Essas queimaduras produzem grandes mudanças na permeabilidade vascular e graves mudanças na função cardiovascular, caracterizando o choque hipovolêmico (KECK et al., 2009).

Grandes queimaduras conduzem ao estado hipermetabólico, condição caracterizada pelo aumento da temperatura corporal, do consumo de oxigênio e da glicose, aumento do nível de insulina e degradação dos tecidos. As alterações metabólicas associadas ao estado metabólico são extremamente complexas. Outras condições sistêmicas incluem hiperlipidemia, mudanças endócrinas, imunossupressão e insuficiência de múltiplos órgãos (JEW; FADEYIBI, 2015).

Uma queimadura aguda é uma lesão complexa e em evolução. A profundidade da lesão pode mudar, aumentando com o passar do tempo após a lesão inicial (HETTIARATCHY; PAPINI, 2004). Queimaduras de espessura superficial ou parcial podem evoluir para espessura total se a ferida secar ou infeccionar (WASIAK et al., 2013). Estudos evidenciam que a queimadura atinge o pico de evolução

aproximadamente 3 dias após a lesão (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010; TOUSSAINT; SINGER, 2014).

As queimaduras são classificadas de acordo com a profundidade da agressão as camadas da pele, o que indica a sua gravidade e assim determina o tratamento e o prognóstico (VUJANOVIC; VUJANOVIC, 2013). A profundidade da queimadura é considerada o mais importante determinante do desfecho (TOUSSAINT; SINGER, 2014) e é influenciada pela temperatura do agente que produziu a queimadura, a duração da exposição e a área do corpo exposta ao agente (ELLISON, 2013).

Nas queimaduras de espessura superficial a lesão está restrita a epiderme e caracteriza-se pela presença de hiperemia, umidade e ausência de bolhas. A dor é moderada a severa e a cura acontece em 3 a 7 dias. As principais causas são a exposição ao sol e a líquidos quentes de baixa viscosidade por pouco tempo (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010).

As queimaduras de espessura parcial superficial acometem a camada superficial da derme (papilar) e apresentam-se com bolhas, flictenas, eritema, umidade e branqueamento a pressão. Os apêndices epidérmicos são preservados. A dor é severa e a cura acontece em 1 a 3 semanas. Pode haver mudanças na pigmentação. Geralmente são provocadas por líquidos quentes, ácidos ou bases fracas ou iluminação (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010).

As queimaduras de espessura parcial profunda apresentam comprometimento da camada profunda da derme (reticular) e são secas, brancas, não apresentam branqueamento a pressão e há perda de todos os apêndices epidérmicos. Apresentam dor mínima e cura em aproximadamente 3 a 6 semanas, com cicatrizes. Geralmente são produzidas por fogo, químicos, eletricidade e líquidos quentes com alta viscosidade (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010).

As queimaduras profundas atingem toda a espessura da pele e gordura subcutânea ou mais profundo. Apresentam aspecto coriáceo, são secas e brancas ou vermelhas com vasos trombosados. Não apresentam dor e não curam por primeira intenção, exigindo enxertos de pele. São causadas por fogo, produtos químicos, eletricidade, explosões ou autoimolação (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010).

1.1.3. Tratamento das queimaduras

A profundidade da queimadura e o seu potencial de cicatrização são os mais importantes determinantes do gerenciamento terapêutico e da morbidade e cicatrizes residuais. Embora as queimaduras, especialmente as severas, possam estar associadas a significativa morbidade e mortalidade, a maioria das queimaduras são menores e mais superficiais e podem ser tratadas conservadoramente em acompanhamento ambulatorial (SCHMAUSS et al., 2015; MONSTREY et al., 2008; TOUSSAINT; SINGER, 2014; WASIAK et al., 2013).

O tratamento dessas queimaduras menores e superficiais é direcionado a promover a cicatrização, que acontece rapidamente por reepitelização (MONSTREY et al., 2008; WASIAK et al., 2013). Nesta conduta a lesão é protegida com a aplicação de agentes tópicos. Estes são substâncias terapêuticas aplicadas diretamente sobre a lesão (YOSHINO et al., 2016). Os cremes tópicos são indicados para manter a umidade da lesão, assim como promover atividade antimicrobiana e reduzir as infecções das feridas (TOUSSAINT; SINGER, 2014).

O tratamento tópico de queimaduras de espessura superficial e parcial tem sido objeto de pesquisas que analisaram os efeitos de intervenções com substâncias provenientes do mel, *Aloe vera*, aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*), Seringueira (*Hevea brasiliensis*) e outros (AKHOONDINASAB; AKHOONDINASAB; SABERI, 2014; BOLINA-MATOS et al., 2013; FERREIRA; PAULA, 2013; IURK et al., 2010). Os biorrecursos naturais podem ser promissores, pois alguns podem associar o estímulo à proliferação celular as ações anti-infecciosas e anti-inflamatórias (VUJANOVIC; VUJANOVIC, 2013). Materiais de curativos como hidrocolóides, hidrogel, filmes de poliuretano, quitina, alginato e hidrofibra também são recomendados como opção para o tratamento tópico de queimaduras de espessura parcial (YOSHINO et al., 2016). Também é indicado o uso de substitutos da pele (IURK et al., 2013).

As queimaduras abertas formam crosta, epitelizam mais lentamente e podem perder grande quantidade de fluidos pela evaporação e exsudação. O curativo é o recurso utilizado para cobrir a queimadura, estabelecendo uma barreira mecânica para protegê-la de agressões externas e prevenir a infecção por bactérias do meio e vice-versa. Os curativos também podem absorver os fluidos da queimadura, mantendo alta a umidade da lesão, favorecendo a formação do tecido de granulação, a epitelização e a

redução da dor, pois protege as terminações nervosas contra o dessecamento (ISBI, 2016; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; VUJANOVIC; VUJANOVIC, 2013; WASIAK et al., 2013). Não há um tipo de curativo ideal para todas as queimaduras ao longo de todo o período de tratamento. O curativo deve ser mantido sobre a ferida o maior tempo possível para proporcionar melhores chances de cura (ISBI, 2016). As queimaduras superficiais e algumas queimaduras parciais geralmente curam espontaneamente e sem sequelas com o tratamento conservador (SCHMAUSS et al., 2015).

Entretanto, queimaduras parciais que não tem previsão de cura em três semanas e queimaduras profundas devem ser submetidas ao tratamento cirúrgico, que consiste em escaratomia, excisão tangencial da necrose e cobertura cutânea com enxertia (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010; IURK et al., 2010; SCHMAUSS et al., 2015). O tratamento local dessas queimaduras envolve esforços para interromper a progressão da lesão, produzir a limpeza e desbridamento (excisão) e a aplicação de pomadas tópicas e curativos que promovam a cicatrização (TOUSSAINT; SINGER, 2014).

A agressiva abordagem cirúrgica com a precoce excisão tangencial e cobertura da ferida é provavelmente a maior evolução no tratamento de queimaduras, reduzindo a taxa de mortalidade e custos. A excisão da necrose parece reduzir os efeitos locais e sistêmicos dos mediadores liberados pelo tecido queimado, reduzindo assim os progressivos desarranjos fisiopatológicos (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010; KECK et al., 2009) e evita a proliferação de micro-organismos no substrato orgânico desvitalizado (JEWOW; FADEYIBI, 2015). A presença da necrose e dos fragmentos celulares retarda o processo de cicatrização (LEITE et al., 2012).

A excisão da necrose e enxerto imediato de pele são baseados em três princípios: (1) é melhor extirpar a necrose e fechar a ferida que permitir separação espontânea, com o risco de infecção, fibrose e perda de função; (2) quando há destruição da espessura total da pele em uma grande área, o enxerto é sempre necessário tanto para obter a cura quanto para corrigir contraturas resultantes da retração da pele; (3) os melhores resultados cirúrgicos são obtidos no menor espaço de tempo com esse método de tratamento (JACKSON, 1953).

É necessário que a queimadura excisionada seja coberta com agentes antimicrobianos e curativos não aderentes ou curativos oclusivos avançados até a reepitelização da ferida (TOUSSAINT; SINGER, 2014).

Alguns dos agentes tópicos que podem ser utilizados no tratamento das queimaduras são a sulfadiazina de prata 1% e derivados do látex da *Hevea brasiliensis*.

A sulfadiazina de prata 1% foi desenvolvida como um tópico para o tratamento de infecções em queimaduras, especialmente por *Pseudomonas aeruginosa* (FOX, 1968). A sulfadiazina de prata tem sido, desde sua descoberta em 1968, de grande importância no tratamento de queimaduras, atuando na prevenção e controle do crescimento de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella sp* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Candida albicans*) (FERREIRA; PAULA, 2013; YOSHINO et al., 2016).

A sulfadiazina de prata é uma pomada hidrofílica com capacidade bacteriostática devido aos sais de prata. Para sua utilização deve-se lavar a lesão com soro fisiológico 0,9%, limpar e remover a necrose e aplicar o creme em toda a extensão da ferida. Cobrir a ferida em seguida com gaze de contato úmida e aplicar cobertura secundária (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003b). A aplicação tópica da pomada é um método confortável de tratamento. É indolor e os curativos não são aderentes e são facilmente removíveis (FOX, 1968).

Foi o primeiro medicamento incluso na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais para o tratamento de queimaduras, sendo ainda utilizada como a principal terapêutica nos estabelecimentos de saúde. Estima-se que tenha sido incluída antes de 1993 e que, até 2011, tenha sido a única referência dentre os medicamentos tópicos disponíveis pelo Sistema Único de Saúde para o tratamento de queimaduras, sendo classificado como um eficiente antimicrobiano não cicatrizante (FERREIRA; PAULA, 2013).

Diferentemente da tradicional sulfadiazina de prata 1% utilizada a décadas no tratamento de queimaduras, o látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) é uma substância nova, mas com promissor potencial no reparo de feridas. O látex é a seiva retirada do caule da seringueira e utilizada de forma empírica pelos indígenas da Amazônia para o tratamento de feridas de pele (MRUE, 1996). O látex é processado até constituir uma membrana estéril denominada biomembrana de látex natural (ANDRADE et al., 2011). A biomembrana foi desenvolvido em 1994 na Universidade de São Paulo e mostrou-se biocompatível, promovendo bom processo cicatricial e apresentando-se como um material promissor nas aplicações de reparos teciduais. Assim, diversos experimentos foram realizados desde então, usando a biomembrana do látex para substituir vasos, pericárdio e parede abdominal (MRUE et al., 2004).

A biomembrana do látex da *Hevea brasiliensis* mostrou indução da cicatrização da parede do esôfago de cães, caracterizada por intenso aumento da vascularização (angiogênese) (MRUE, 2000). Outro estudo analisou os efeitos do implante subcutâneo da biomembrana do látex em feridas incisionais suturadas no dorso de camundongos. O processo de reparação nos tecidos expostos ao látex apresentou denso infiltrado inflamatório nos primeiros dias de tratamento da lesão (principalmente neutrófilos), mostrando-se equilibrado já entre o 7º e 14º dias de tratamento. A angiogênese também se apresentou aumentada, com observação de maior quantidade de vasos neoformados entre o 7º e 14º dias de tratamento. Assim, a biomembrana de látex favoreceu a angiogênese, fibroplasia e a reparação tecidual nas lesões analisadas (ANDRADE et al., 2011).

A biomembrana do látex favoreceu a cicatrização de queimaduras de espessura parcial em ratos Wistar. O reparo tecidual apresentou maior angiogênese e quantidade e qualidade das fibras de colágeno, proporcionando um tecido de granulação mais maduro. Os bons resultados da utilização da biomembrana do látex da *Hevea brasiliensis* no processo de cicatrização de tecidos faz acreditar que essa possa ser uma importante alternativa no tratamento das queimaduras (BOLINA-MATOS et al., 2013).

As propriedades terapêuticas da biomembrana do látex podem ser atribuídas as proteínas que apresentam homologia funcional com fatores de crescimento, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator transformador de crescimento alfa (TGF- α) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Esses elementos presentes em sua composição atuariam promovendo a melhora da vascularização local e indução de angiogênese, da adesão celular e da formação de matriz extracelular, estimulando células inflamatórias associadas ao processo de reparo das feridas (ANDRADE et al., 2011; FRADE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; MRUE, 1996).

O Regederm® é um gel-creme derivado do látex da *Hevea brasiliensis*, em cuja composição entram frações proteicas do soro do látex e representa o aprimoramento biotecnológico das pesquisas com o látex da *Hevea brasiliensis* (PENHAVEL et al., 2016). O Regederm® é apresentado como um acelerador do processo cicatricial e apresentou atividade angiogênica em membranas corioalantóides de ovos embrionados de galinha, estimulando a formação de intensa rede vascular (CHAVES et al., 2016).

Cicatrização

A ruptura de integridade da pele desencadeia um dos processos biológicos mais complexos, onde a ativação de múltiplas vias leva à regeneração, reconstituição e restauração das estruturas lesadas. É um processo dinâmico e envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de maneira harmoniosa para garantir a restauração tissular. A cicatrização é comum a todas as feridas, independente do agente causador. Inicia-se imediatamente após a lesão e pode finalizar-se meses depois. As feridas podem ser agudas ou crônicas, sendo que estas ultrapassam seis semanas para cicatrizar (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; DUNN et al., 2013; LEITE et al., 2012; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; RODRIGUES et al., 2015).

O reparo de tecidos pode se dar (1) pela regeneração do tecido, com recuperação funcional ou (2) pela cicatrização, que envolve restabelecimento da homeostasia do tecido, embora com perda funcional e formação de cicatriz fibrótica (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O processo de cicatrização de feridas cutâneas é dividido em três fases: (1) inflamatória, (2) proliferativa ou granulação e (3) maturação ou remodelamento. Essas fases se sobrepõem e sua divisão é didática, mas podem ser caracterizadas pelos aspectos macroscópicos e pela presença de infiltrado celular, coordenados por mediadores químicos para otimizar o processo de reparação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CAMPOS; BORGES-FRANCO; GROUTH, 2007).

1.1.4. Fase inflamatória

A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão e dura aproximadamente até o 4º ao 6º dia. A lesão produz o contato dos elementos do sangue com o colágeno e outras substâncias da matriz extracelular, ativando as plaquetas, a cascata de coagulação e o sistema complemento. Há liberação de substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e numerosos mediadores pró-inflamatórios que resultam na agregação plaquetária, coagulação e formação de coágulo (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-FRANCO;

GROUTH, 2007; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). Esse processo assegura a homeostase e a formação da arquitetura básica da matriz para iniciar o recrutamento e a invasão de células (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

Um dos objetivos dessa etapa é a prevenção de infecções. As plaquetas liberam o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator transformador de crescimento beta (TGF- β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) e estimulam a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. Os neutrófilos são as primeiras células a infiltrar a região da lesão e são responsáveis pela eliminação de debris e bactérias. Os macrófagos, também atraídos ao sítio da lesão, atingem o pico de concentração entre 48h e 72h após a origem da ferida. Os macrófagos liberam grande quantidade de mediadores, como TGF- β , fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), que são importantes para regular a resposta inflamatória, estimular a angiogênese e a formação do tecido de granulação. O TGF- β amplifica a atração de fibroblastos para modular a expressão do colágeno e colagenases e junto com o PDGF estimulam a deposição de tecido conjuntivo. Os linfócitos, por sua vez, atingem a região da ferida após as 72h horas iniciais da lesão (BELDON, 2010; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

Assim, a fase inflamatória apresenta intensa atividade de células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, ativados pelos mediadores químicos liberados na região da lesão (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-FRANCO; GROUTH, 2007; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a).

1.1.5. Fase de proliferação

A fase proliferativa é responsável pelo reparo da lesão e inicia-se após a homeostasia ter sido atingida, a resposta inflamatória ter-se equilibrado e a ferida estar limpa de debris (YOUNG; MCNAUGHT, 2011). Essa fase pode ser dividida em três subfases: angiogênese; fibroplasia e formação do tecido de granulação; e reepitelização.

Se inicia aproximadamente ao 4º dia após a lesão e se estende até o término da segunda semana (14º dia). Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células dessa fase (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-FRANCO; GROUTH, 2007; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a).

A angiogênese é fundamental para organismos vivos em processos como crescimento, reprodução e cura de feridas. É caracterizada pela formação de vasos sanguíneos, possibilitando proliferação, migração, regulação e diferenciação de células vasculares (FERREIRA et al., 2009). Inicia-se 1 ou 2 dias após a lesão, mas ocorre primariamente durante a fase proliferativa. É essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). A angiogênese é uma das características histológicas mais importantes do tecido de granulação no processo de cicatrização da pele (BIONDO-SIMÕES et al., 2006). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de fibroblasto básico (bFF) e o TGF- β são importantes na ativação da angiogênese (BELDON, 2010).

A fibroplasia e formação do tecido de granulação envolve intensa atividade dos fibroblastos e produção de fibras de colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases. O tecido de granulação é uma coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como as fibras proteicas. O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo em processo de cicatrização. O tecido de granulação apresenta de 30% a 40% de colágeno tipo III, sendo considerado um colágeno imaturo (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-FRANCO; GROUTH, 2007; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a).

A reepitelização envolve a migração de queratinócitos não danificados da borda da ferida e dos anexos epiteliais preservados nas lesões de espessura parcial e apenas das margens das lesões de espessura total (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a).

1.1.6. Fase de remodelamento

O remodelamento é a última fase e se caracteriza por mudanças no colágeno e na matriz. Inicia-se por volta do 14º dia e dura meses, sendo responsável pelo aumento da

força tensiva e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. A principal característica da fase de maturação é a deposição organizada das fibras de colágeno, apresentando grande importância clínica. Nessa fase a neovasculatura diminui e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. A formação da matriz extracelular envolve o equilíbrio entre a síntese e degradação de colágeno (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-FRANCO; GROUT, 2007; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a).

Modelo experimental de queimaduras e cicatrização

Existem modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* para o estudo do processo de cicatrização de feridas. Entretanto, os modelos *in vitro* não conseguem reproduzir os complexos mecanismos envolvidos nos processos patológicos dos seres vivo (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014). O objetivo do modelo animal para o estudo do processo de cicatrização de feridas é reproduzir a fisiologia humana e prever resultados terapêuticos (GALIANO et al., 2004). Assim, os modelos animais melhoraram muito a compreensão das causas e desenvolvimento de muitas doenças humanas e tem provado sua importância na descoberta de novos medicamentos e estratégias de tratamento clínico (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014; REN; ZHOU; CHEN, 2012).

Existem diversos tipos de modelos de lesão em animais para o estudo da cicatrização. Os mais comuns são as lesões incisionais, excisionais e queimaduras (GALIANO et al., 2004). Nas queimaduras, os experimentos com os modelos animais são úteis em praticamente todos os aspectos da pesquisa relacionada a patologia e tratamento (JEWELL; FADEYIBI, 2015). Os animais mais usados nos estudos com queimaduras envolvem mamíferos, como ratos, camundongos, suínos, coelhos e animais maiores (PEREIRA et al., 2012). Não existe um modelo mais adequado que o outro. O ideal é que sejam vistos como modelos complementares para o estudo de queimaduras (MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012).

Embora não exista na literatura um modelo animal melhor para a experimentação e estudo do processo de cicatrização de queimaduras, os roedores são muito utilizados por serem animais de pequeno porte, rápido ciclo reprodutivo, de baixo custo e fáceis de manusear (DORSETT-MARTIN, 2004). Isso os tornam o modelo pré-

clínico ideal, pois são muito acessíveis (DUNN et al., 2013). Outra vantagem é o grande número de reagentes moleculares para camundongos e ratos, embora nenhum modelo de cicatrização em roedores se aproxime do processo cicatricial em seres humanos (GALIANO et al., 2004).

Para se avaliar a eficiência do tratamento de queimaduras, é importante que o modelo utilizado seja capaz de recriar queimaduras uniformes e que possam ser reproduzidas (VENTER; MONTE-ALTO-COSTA; MARQUES, 2015). As técnicas mais comuns utilizadas para a produção de queimaduras em modelos animais experimentais é por eletricidade ou contato com superfície quente, como metal ou água aquecidos (MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012). Esta última é considerada o modelo padrão para produção de queimaduras em função da alta frequência na etiologia de queimaduras em humanos (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014). Trata-se do método mais comum de produção de queimadura em modelos experimentais em ratos, produzindo queimaduras de espessura total em animais submetidos a tricotomia e anestesiados com combinação de ketamina e xilazina (DORSETT-MARTIN, 2004; MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012).

O modelo padrão de queimaduras por escaldamento em ratos e camundongos envolve a utilização de um cilindro plástico resistente a temperatura e com abertura de janela para exposição do animal ao líquido quente (FANTINATI et al., 2016; MORAES et al., 2013).

A região mais exposta a queimadura no modelo animal de ratos é o dorso, pela impossibilidade de o animal alcançar a lesão e assim prevenir danos adicionais. Devido ao risco de o animal esfregar-se nas paredes da gaiola e agravar a queimadura, é necessário usar curativos primários e secundários sobre a ferida e usar um agente tópico antibacteriano (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014; DORSETT-MARTIN, 2004; MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012). Um dos agentes tópicos antibacterianos mais utilizados em estudos de cicatrização em modelos de queimaduras de animais é a sulfadiazina de prata 1% (AKHOONDINASAB; AKHOONDINASAB; SABERI, 2014; SCHMAUSS et al., 2015; MILLER et al., 2012). Além disso, a região do dorso é adequada, pois em modelos experimentais de queimadura a área da lesão deve ser pequena o suficiente para não haver repercussão sistêmica, mas ao mesmo tempo larga o suficiente para permitir adequada observação e padronização (VENTER; MONTE-ALTO-COSTA; MARQUES, 2015).

Entretanto, também existem desvantagens do uso do modelo de rato para o estudo de cicatrização (CAI et al., 2014). Apesar das muitas semelhanças entre seres humanos e ratos em aspectos fisiológicos e patológicos, as peles apresentam diferenças. A epiderme e derme são mais espessas nos seres humanos que nos ratos. Os ratos apresentam o panículo carnososo, o que confere condição mais solta a arquitetura da pele dos murinos quando comparada a pele humana. Essa característica confere aos murinos um mecanismo de cicatrização por contração, ao passo que nos seres humanos o mecanismo é por formação do tecido de granulação e reepitelização. Outra grande diferença é a densa presença de pelos na pele murina. Menos evidente é a presença de glândulas apócrina e écrina nos seres humanos e ausentes nos murinos (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014; CAI et al, 2014; DORSETT-MARTIN, 2004; DUNN et al., 2013; GALIANO et al., 2004).

O panículo carnososo é uma fina camada muscular estriada subcutânea ligada à fáscia superficial dos ratos e camundongos, mais profundamente a pele. Essa estrutura não está amplamente distribuída no corpo humano, como acontece com murinos. No corpo humano ela corresponde ao platisma (DORSETT-MARTIN, 2004; DUNN et al., 2013; VENTER; MONTE-ALTO-COSTA; MARQUES, 2015). Essa camada muscular permite movimentos da pele independentes das camadas musculares mais profundas e é responsável pela rápida contração da pele após as lesões. A contração da ferida é uma das mais significativas limitações dos estudos experimentais com animais de pele solta e os dados provenientes desse fechamento são mais representativos de cicatrização por primeira intenção (DAVIDSON; YU; OPALENIK, 2013; DUNN et al., 2013).

Para aproximar o modelo experimental animal do processo que ocorre em humanos, Galiano et al. (2004) propuseram um modelo animal experimental para o estudo do processo de cicatrização, que constitui na fixação de uma tala (anel) ao redor de uma lesão excisional provocada em camundongo. A fixação do anel foi realizada com cola instantânea adesiva e suturas de nylon. A fixação da ferida com anel em camundongos diminuiu a contração e possibilitou que a cicatrização ocorresse por formação do tecido de granulação e epitelização, aproximando o modelo experimental do processo em seres humanos.

A utilização de anéis estabilizadores na lesão em murino torna o processo de reparo da ferida dependente da proliferação celular e angiogênese, formação de tecido de granulação e epitelização, que se assemelha ao processo de reparo que acontece nos seres humanos. Para assegurar a reprodutibilidade e quantificação adequada é

necessário que o anel estabilizador seja fixado a pele por suturas e monitorado diariamente (DUNN et al, 2013). Assim, um modelo animal que possa reproduzir os mecanismos humanos de reparo de feridas deve apresentar reepitelização, maior formação de tecido de granulação e menor contração da ferida (REN; ZHOU; CHEN, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

A queimadura é uma lesão da pele ou outros tecidos orgânicos, geralmente produzida pelo calor. Pode ter gravidade variável e evoluir para a cura sem deixar sequelas ou apresentar complicações diversas como dor, retrações, alterações estéticas e perdas funcionais. A queimadura é uma condição decorrente de acidentes que podem atingir pessoas de todas as faixas etárias e níveis socioeconômicos e culturais.

Apesar da incidência das queimaduras aparentemente estar reduzindo em alguns países ricos, é uma lesão com grande prevalência em todo o mundo e que exige a intervenção de profissionais de saúde altamente especializados e grande diversidade de recursos materiais. Estima-se que no Brasil mais de um milhão de brasileiros sejam vítimas de queimaduras todos os anos, o que onera o Sistema Único de Saúde.

O tratamento da maior parte dessas queimaduras envolve a utilização de agentes tópicos para prevenir a infecção, aliviar a dor e favorecer a cicatrização. Um dos medicamentos utilizados há mais de 50 anos nesse tratamento é a sulfadiazina de prata 1%, reconhecida pela ação bacteriostática, mas com ação questionável na facilitação e aceleração do processo cicatricial. Assim, novos recursos são estudados no mundo todo para buscar agentes que promovam a cicatrização, acelerando o reparo e minimizando as sequelas morfológicas, funcionais e estéticas.

A biomembrana do látex da *Hevea brasiliensis* é um desses recursos, já utilizada com bons resultados em um estudo do tratamento de queimaduras de espessura parcial de camundongos. Uma empresa farmacêutica produziu comercialmente a biomembrana do látex da *Hevea brasiliensis* com o nome Biocure®. Entretanto, a produção foi descontinuada e entrou em seu lugar um creme-gel de nome Regederm®, apresentado pela empresa como um produto cujas frações proteicas derivadas do látex da *Hevea brasiliensis* apresentam atividade angiogênica e aceleradora do processo cicatricial de lesões cutâneas de diversas etiologias. A utilização do Regederm® no tratamento de queimaduras de espessura total pode ser um recurso promissor, caso os resultados sejam semelhantes aos apresentados pela biomembrana.

Entretanto, para que os estudos sobre cicatrização de queimaduras em murinos aproxime-se do processo que acontece em seres humanos, é necessário desenvolver um modelo experimental de queimaduras em ratos que seja reprodutível e utilize

procedimentos comuns ao tratamento da queimadura em humanos e se assemelhe ao padrão de cicatrização humano.

A hipótese proposta considera que o Regerderm® seja um recurso que estimule a angiogênese e fibroplasia, contribuindo significativamente para acelerar e melhorar a qualidade do processo cicatricial.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar um modelo experimental para o estudo da cicatrização de queimaduras de espessura total em ratos e analisar o processo cicatricial em ratos tratados com creme com sulfadiazina de prata 1% ou creme-gel Regederm®.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar um modelo experimental de queimadura, desbridamento e fixação de anel estabilizador em ratos.

Identificar os aspectos morfométricos do processo de cicatrização de queimaduras em ratos tratados com sulfadiazina de prata 1%, com e sem anel, ou Regederm® ao longo de 30 dias.

Identificar os aspectos anatomopatológicos macroscópicos e microscópicos do processo de cicatrização de queimaduras em ratos tratados com sulfadiazina de prata 1%, com e sem anel, ou Regederm®.

4. MÉTODOS

4.1. Tipo de estudo e aspectos éticos

Estudo experimental com ratos para avaliação dos efeitos cicatriciais da sulfadiazina de prata 1% ou Regederm® no tratamento de queimaduras de espessura total e desenvolvimento de modelo experimental para o estudo do processo cicatricial de queimaduras de espessura total em ratos Wistar.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás - Protocolo nº 22/14. Os princípios e orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal foram aplicados (BRASIL, 2015).

Os animais foram adaptados ao Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás por um período de três dias (DAMY et al., 2010) e mantidos em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha. Foram colocados três ratos por gaiola. A adaptação dos animais ao ambiente proposto priorizou o bem-estar. A luminosidade, temperatura, intensidade de ruído e a umidade relativa do ar foram as do ambiente geral. Água e ração comercial autoclavada para a espécie foram oferecidos aos animais *ad libitum*. A higienização das gaiolas foi realizada duas vezes por semana.

4.2. Grupos experimentais

Para a realização deste estudo foram utilizados 70 ratos fêmeas da espécie *Rattus norvegicus albinus* (linhagem Wistar) com peso entre 200g e 230g ao início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás.

Para o delineamento experimental, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos:

Grupo 1 (G1) – Grupo controle: ratos submetidos a queimadura, excisão tangencial e tratados com creme de sulfadiazina de prata 1% (n = 25).

Grupo 2 (G2) – Grupo Regederm®: ratos submetidos a queimadura, excisão tangencial e tratados com creme Regederm® (n = 25).

Grupo 3 (G3) – Grupo com anel: ratos submetidos a queimadura, excisão tangencial e tratados com creme de sulfadiazina de prata 1% e fixação de anel (n = 20).

Os animais foram igualmente distribuídos e eutanasiados aos 3, 7, 14, 21 e 30 dias após a indução da queimadura (DAI) para acompanhamento dos parâmetros morfológicos e anatomopatológicos do processo de cicatrização. Assim, cada subgrupo (dia experimental) foi composto por cinco animais (n=5). O G3, grupo com anel, não teve animais eutanasiados aos 3 dias de tratamento.

4.3. Procedimentos e materiais

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução aquosa estéril com ketamina 10% e xilazina 2% (0,1 U/g) para a realização das queimaduras, desbridamentos e fixação dos anéis. Em seguida foi realizada a tricotomia da região cervico-dorsal, com posterior higienização e antissepsia da área a ser queimada com gaze estéril embebida em solução de álcool 70%.

O método para delinear a exposição da pele foi descrito por Moraes et al. (2013). As lesões térmicas tiveram aproximadamente 2x2 cm e foram realizadas com água a 95°C para atingir queimadura de espessura total (MORAES et al., 2013). Todos os animais foram medicados com ibuprofeno 100mg/ml diluídos na água por um período de 7 dias após a realização da queimadura.

Logo após a queimadura e diariamente a ferida foi limpa cuidadosamente com soro fisiológico e tratada com aplicação tópica de sulfadiazina de prata 1% ou Regederm®, de acordo com o grupo, aplicada conforme orientações em bula, ou seja, aplicação de uma camada uniforme, delgada, suficiente para cobrir todo o leito da ferida com aproximadamente 1mm de espessura. A lesão foi coberta de forma secundária com curativo oclusivo estéril (tecido morim embebido em glicerina) e manta estéril, trocados diariamente (FIGURA 1). Foram mantidos 2 animais por gaiola durante todo o período de tratamento.

A excisão tangencial é o método padrão para excisão de queimaduras (ISBI, 2016), que consiste em remover a necrose do tecido viável. As lesões foram desbridadas por excisão tangencial no dia 2 após indução da queimadura, como procedimento indicado no tratamento de queimaduras de espessura total (ISBI, 2016; NGUYEN et al., 1996). O procedimento foi realizado apenas uma vez, removendo toda a área de necrose.

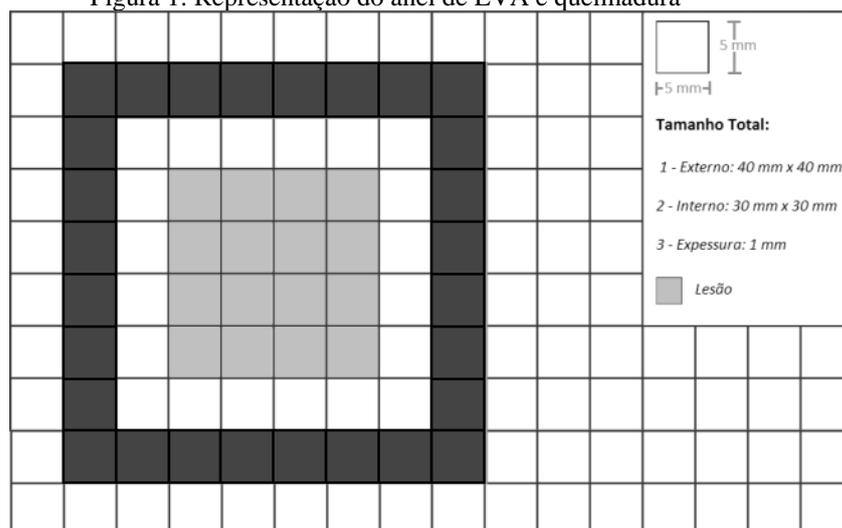
Foi desenvolvido um anel em etileno-acetato de vinila (EVA), adaptado de Galiano et al. (2004), para restringir a contração da ferida e induzir o fechamento da lesão por reepitelização, com densidade de 0.170 g/cm³ e espessura de 2 mm em formato quadrado e três tamanhos diferentes: (1) lado externo de 40x40 mm e abertura interna de 30x30 mm; (2) lado externo de 30x30 mm e abertura de 20x20 mm; (3) lado externo de 25x25 mm e abertura de 15x15 mm.

Apenas o grupo experimental 3 (G3) foi submetido ao uso de anel de EVA. Imediatamente após o desbridamento, o anel de EVA foi colocado com a abertura circundando a queimadura e fixado com cola adesiva rápida a base de etilcianoacrilato e suturas monofilamento nylon 4-0 para assegurar a posição. Foram realizadas 16 suturas ao redor do anel, sendo uma em cada vértice e três em cada lado do quadrado.

Esse primeiro anel utilizado tinha dimensão interna de 30x30 mm. Foi realizada revisão das suturas ao 7º dia após queimadura. No 14º dia de tratamento o anel inicial foi retirado e fixado em seu lugar, seguindo as mesmas indicações de fixação, um anel com dimensão interna de 20 x 20 mm (para os animais de 21 DAI e 30 DAI). No 21º dia pós lesão foi retirado esse anel e fixado em seu lugar um anel com dimensão interna de 15 x 15 mm para os animais de 30 DAI.

Os animais foram eutanasiados com solução aquosa estéril contendo ketamina 10% e xilazina 2% por via intraperitoneal na dosagem de 0,4 U/g. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados aos 3 (exceto grupo 3), 7, 14, 21 e 30 dias após a indução da queimadura (DAI) para acompanhamento de parâmetros morfométricos e anatomopatológicos do processo de cicatrização das feridas.

Figura 1: Representação do anel de EVA e queimadura



Nota: EVA – etileno-acetato de vinila

Avaliação morfométrica e macroscópica

A análise morfométrica das feridas foi realizada com fotografias registradas logo após as queimaduras (dia zero) e após 3 (exceto grupo 3), 7, 14, 21 e 30 dias de tratamento, utilizando-se câmera fotográfica digital conectada a um tripé e a uma distância de 11 cm da prancha de fotografia. As imagens foram analisadas utilizando-se o software Image J 1.3.1 (NIH, EUA).

A delimitação da área inicial (A_i) e final (A_f) da queimadura foi realizada com o software Image J 1.3.1 (NIH, EUA). O grau de redução percentual da área da queimadura ($\Delta A\%$) foi determinada pela fórmula: $\Delta A\% = [(A_i - A_f) / A_i] \times 100$ (AL-WATBAN; ANDRES, 2000).

A avaliação macroscópica (presença de crosta) foi realizada após a eutanásia do animal e classificada de forma semi-quantitativa com os critérios: ausente (escore = 0); discreta, com comprometimento de até 25% da área total da lesão (escore = 1); moderada, com comprometimento entre 26% e 50% (escore = 2); acentuada, com comprometimento acima de 50% (escore = 3) (FANTINATI et al., 2016).

Avaliação microscópica

Para avaliação histológica, um fragmento da ferida (contendo as bordas) foi fixado, processado para inclusão em parafina, cortado com 4 micrometros e corado pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

A avaliação dos processos patológicos gerais na derme considerou os parâmetros: necrose/crosta, fibrina, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares (PMN), infiltrado inflamatório de mononucleares (MN), angiogênese, fibroblasto e colágeno. A presença desses processos patológicos gerais foi classificada de forma semi-quantitativa, seguindo os critérios: ausente (escore = 0); discreta, com comprometimento de até 25% da área total da lesão (escore = 1); moderada, com comprometimento entre 25% e 50% (escore = 2); acentuada, com comprometimento acima de 50% (escore = 3) (FANTINATI et al., 2016).

Os cortes corados por picrosirius foram fotografados em aumento de 200x na microscopia de luz polarizada. Para avaliação dos subtipos de colágeno usou-se a coloração das fibras, considerando-se a birrefringência. Toda a área da ferida foi avaliada para esta caracterização (BIONDO-SIMÕES et al, 2006). As imagens foram analisadas utilizando-se o software Image J 1.3.1 (NIH, EUA).

Cortes de tecidos foram submetidos a imunofluorescência para a detecção de α -actina de músculo liso por meio de incubação com IgG2a monoclonal (sc-32251, IA4, Santa Cruz Biotechnology) a uma diluição de 1:100 durante a noite. Posteriormente, anticorpos específicos secundários conjugados com fluorocromo (sc-2010, IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology) foram usados por duas horas à temperatura ambiente. DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) foi empregado para permitir a visualização dos núcleos das células. Os cortes histológicos foram analisados com um microscópio de fluorescência Olympus BX43 (Olympus, Japão). Os cortes foram fotografados em aumento de 20x. Toda a área da ferida foi avaliada. As imagens foram analisadas utilizando-se o software Image J 1.3.1 (NIH, EUA).

4.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Sigma Stat 2.3. As variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Para análise da variação da área da queimadura, proporção de colágeno e proporção de α -actina foi utilizado o teste t-Student. Para análise macroscópica e microscópica dos processos patológicos gerais foi utilizado o teste Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Artigo 1 – Experimental full thickness burning wound induced in rats – comparison of the healing process after treatment with Regederm® and silver sulfadiazine

Renato de Castro Spada Ribeiro, Sara Oliveira do Vale Ribeiro, Helen Cristian Marques Tomaz, Luís Pedro Ferreira de Assis, Rodrigo Barcelos Ferreira de Carvalho, Yanley Lucio Nogueira, Fátima Mrué, Marina Clare Vinaud, Ruy de Souza Lino Junior

Artigo 2 – Modelo experimental para o estudo da cicatrização de queimaduras de espessura total em ratos

Renato de Castro Spada Ribeiro, Sara Oliveira do Vale Ribeiro, Luís Pedro Ferreira de Assis, Rodrigo Barcelos Ferreira de Carvalho, Yanley Lucio Nogueira, Manoel Francisco Biancardi, Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, Marina Clare Vinaud, Ruy de Souza Lino Junior

Artigo 1.

Title: Experimental full thickness burning wound induced in rats – comparison of the healing process after treatment with Regederm® and silver sulfadiazine

Short running title: Experimental burning wound in rats

Renato de Castro Spada Ribeiro^{1,2}, Sara Oliveira do Vale Ribeiro², Helen Cristian Marques Tomaz², Luís Pedro Ferreira de Assis³, Rodrigo Barcelos Ferreira de Carvalho³, Yanley Lucio Nogueira³, Fátima Mrué³, Marina Clare Vinaud⁴, Ruy de Souza Lino Junior⁴

1. Tropical Pathology and Public Health Post-graduate programme, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiania, Goiás, Brazil.

2. State University of Goiás, Goiania, Goiás, Brazil.

3. Federal University of Goiás, Goiania, Goiás, Brazil.

4. Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiania, Goiás, Brazil. E-mail: marinavinaud@gmail.com; ruyfino@yahoo.com.br

Corresponding author: Ruy de Souza Lino Junior, Tropical Pathology and Public Health Institute – UFG, rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiânia - GO, CEP: 74650-050; telephone: + 55 62 3209 6165; Fax number: + 55 62 3209 6363, email address: ruyfino@yahoo.com.br

Keywords: Burning wound, healing process, Regederm®, 1% silver sulfadiazine, rats, experimental model

Abstract:

Background: The burning wound is an injury with several degrees of severity and varied therapeutic resources may be applied in its treatment. Topic agents with active principles derived from vegetables samples may constitute a low cost resource. Studies indicate that *Hevea brasiliensis* latex derivative substances (Regederm®) may accelerate the regeneration process in injured tissues. The objective of this study was to compare the healing process in full thickness burning wounds in rats treated with 1% silver sulfadiazine (SSD) or Regederm®. **Methods:** Fifty rats were submitted to total width burning wound and divided into the following groups: (1) treated with 1% SSD; (2) treated with Regederm®. The occlusive bandages were replaced daily. The wound debridement was performed through tangential excision 2 days after the injury induction (DAI). The wounds were evaluated morfometrically, macroscopically and microscopically (pathologic processes stained by HE and collagen stained by picro-sirius) at 3, 7, 14, 21 and 30 DAI. **Results:** Morfometrically the group treated with SSD presented greater wound contraction at 7 DAI ($p=0.007$). Macroscopically there was greater presence of crust on the wounds treated with Regederm® at 3 DAI ($p=0.02$) and 7 DAI ($p=0.015$). Microscopically Regederm® induced more intensively the phases of the healing process in the wounds, i.e., in the inflammatory phase (3 DAI) Regederm® induced greater hyperemia ($p=0.036$) and mononuclear and polymorphonuclear cells inflammatory infiltration ($p=0.029$); in the proliferative phase (7 and 14 DAI) Regederm® induced greater hemorrhage ($p=0.015$), presence of mononuclear cells ($p=0.030$) and collagen ($p=0.001$); in the maturation phase (21 DAI) Regederm® induced greater hyperemia ($p=0.017$). There were no differences between the treated groups regarding the angiogenesis and fibroplasia throughout the evaluated period. **Conclusions:** The burning wounds of the animals treated with Regederm® and 1% SSD presented similar angiogenesis and fibroplasia throughout the evaluated period.

Keywords: Burning wound, healing process, Regederm®, 1% silver sulfadiazine, rats, experimental model

Introduction

The burning wound is an injury in the skin or other organic tissue primarily caused by a thermic or other acute trauma¹. It may be caused by heat, cold, electricity, chemical substances, radiation or friction². Most burning wounds happen in domiciliary environment and are provoked by contact with hot liquids¹. This type of injury is one of the main public health problems in high and middle income countries³.

Burning wounds are classified accordingly to the depth of the injury. The full thickness injuries are the ones that affect epidermis and dermis, inducing necrosis and reaching the subcutaneous tissue. They may afflict deep structures such as muscles and bones².

The healing process of acute wounds consists in a complex process ranging from an inflammatory response, to proliferation in order to reestablish and remodel the affected tissue. This is a dynamic process and involves cell mediators such as cytokines and growth factors⁴.

The treatment of burning wounds may significantly influence in the period of time necessary for the healing process. Therefore the adequate treatment will promote an enhance in the quality of the healing process, a better aspect of the injury and decrease the risk of infection⁵. Several resources have been used to treat burning wounds such as 1% silver sulfadiazine, natural topic products such as ointments of *Aloe vera*, different approaches in the bandages such as the traditional, modern or biological ones^{5,6}. According to the literature, there is no ideal bandage that may be used in all kinds of burning wounds throughout the healing process⁶.

Studies performed with derivatives of the *Hevea brasiliensis* latex in the form of a biomembrane have shown positive results regarding biocompatibility^{7,8}, the healing process of acute⁹ and chronic wounds¹⁰. The benefic effects of this biomembrane in treatment of scalding experimentally induced burning wounds in rats have been reported¹¹. The benefic effects of the *H. brasiliensis* biomembrane in the healing process are believed to be related to its proteic fractions that present biological activity inducing angiogenesis and fibroplasia^{9,10,11}.

Regederm® is a gel-ointment derivative from *H. brasiliensis* latex in which composition there are the proteic fractions of the latex serum. Regederm® is indicated to treat cutaneous wounds of varied etiologies. The effect of Regederm® on the healing process of excisional wounds experimentally induced in rats was evaluated positively^{12,13}.

Therefore the aim of this study is to compare the efficacy of Regederm® and 1% SSD in improving the healing process of experimentally induced full thickness burning wounds in rats.

Material and methods

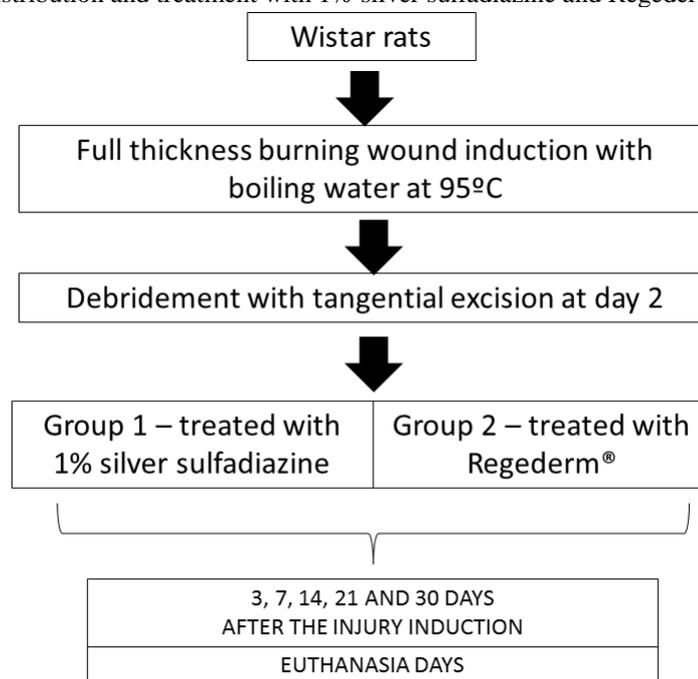
This is a prospective experimental study with rats in order to evaluate the possible healing effect of Regederm® in the treatment of full thickness burning wounds. This study was approved by the Ethics Committee in Animal Use of the Federal University of Goias, protocol n. 22/14. The principles and guidance of the National Counsel of Animal Experimentation Control were observed.

The animals' adaptation to the environment prioritized their well-being. Luminosity, temperature, noise intensity and relative air humidity were the same as of the general environment. Water and commercial ration species specific were offered *ad libitum*. The cleaning of the cages was performed twice a week.

Experimental groups

Fifty female Wistar rats weighing between 200 and 230g were submitted to the full thickness burning wound. The tangential debridement of the wound was performed 2 days after the injury induction (DAI). The animals were divided as follows: control group (G1) – treated with 1% silver sulfadiazine (SSD) ointment; experimental group (G2) – treated with gel-ointment containing serum of *H. brasiliensis* latex (Regederm®) (Figure 1).

Figure 1: Groups distribution and treatment with 1% silver sulfadiazine and Regederm®.



Injury induction

The animals were intraperitoneally anesthetized with a sterile aqueous solution of ketamine 10% and xilazine 2% (0.1U/g) in order to be submitted to the burning wound and the debridement procedure. The trichotomy of the cervico-dorsal region and antisepsis of the skin with 70% alcohol were performed previously to the injury induction.

The burning wound induction was performed with boiling water at 95°C in order to induce a full thickness wound as described previously¹⁴. All animals received 100mg/ml of ibuprofen diluted in the drinking water during a period of 7 days after the injury induction

Every day after the injury induction the wound was carefully cleaned with physiologic solution (NaCl 0.9%), treated with the topic appliance of the 1% SSD or Regederm®. The ointments were applied in according to the manufacturer determination in a uniform thin layer (approximately 1 mm), as to cover the entire wound bed. The wound was secondarily covered with a sterile occlusive bandage which was also changed daily. During the entire experiment two animals were maintained per cage.

The tangential excision is the standard method for the excision of burning wounds (ISBI, 2016). The injuries were debrided through tangential excision 2 DAI as indicated in the standard procedure to treat full thickness burning wounds^{6,15}. This procedure was performed only once in order to remove all the necrotic area.

The animals were euthanized with an intraperitoneal injection of ketamine 10% and xilazine 2% (0.4 U/g). Five animals from each group were euthanized in each experimental day – 3, 7, 14, 21 and 30 in order to allow the morphometric and anatomopathologic analyzes of the healing process of the wounds.

Macroscopic and wound contraction evaluation

The morphometric wound contraction evaluation of the injuries was performed through photographs taken at day 0 right after the injury induction, at 3, 7, 14, 21 and 30 days. The photographs were taken with a digital camera connected to a tripod and at 11cm distance. The images were analyzed through the Image J software 1.3.1 (NIH, EUA).

The degree of wound contraction was determined through the mathematical formula proposed previously¹⁶: Relative wound contraction (%) = [(initial area of the injury – contracted area of the injury)/ initial area of the injury]x100

The macroscopic evaluation of the crust presence was performed in a semi-quantitative form according to the following criteria: absent, discrete up to 25% of area commitment; moderate from 26 to 50% of committed area, and severe with more than 50% of committed area.

Microscopic evaluation

Fragments removed from the wounds were fixed with 10% buffered formaldehyde, processed and stained with hematoxylin and eosin (HE) for the histologic evaluation. The pathological processes evaluated were necrosis/crust, fibrin, polymorphonuclear (PMN) cells inflammatory infiltration, mononuclear (MN) cells inflammatory infiltration, angiogenesis, fibroblasts and collagen. These aspects were classified in a semi quantitative form according to the following criteria: absent

(score=0), discrete (score=1) with up to 25% of committed area; moderate (score=2) with 26 to 50% of committed area; and severe (score=3) with more than 50% of committed area¹⁷.

The collagen quantification was performed after picro-sirius staining and observation through polarized light microscopy under magnification of 200x. All the injury area was evaluated¹⁸. The images were analyzed through the Image J 1.3.1 software (NIH, EUA).

The epithelialization was considered as incomplete when there was crust over the wound and discontinued epithelium or as complete when there was no loss of epithelium continuity.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Sigma Stat 2.3 software. All variables were tested as to normal distribution and homogeneous variance. For the wound contraction analysis Student's t-test was used. For the crust and microscopic analysis Mann-Whitney test was used. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

The morphometric analysis of the full thickness burning wounds showed greater wound contraction in the 1% SSD treated group at 7 DAI, i.e., proliferative phase, when compared to the Regederm® treated group ($p < 0.05$). There was no significant difference in the other analyzed groups (Table 1).

Table 1: Wound contraction (C%) in full thickness burning wound experimentally induced in rats treated with 1% silver sulfadiazine or Regederm® in a period of 30 days.

DAI	G1	G2	P
	Mean ± SD	Mean ± SD	
3	5.51 ± 10.88	4.11 ± 10.30	0.832
7	15.41 ± 2.46	7.17 ± 4.48	0.007*
14	26.50 ± 15.08	22.93 ± 12.05	0.689
21	75.51 ± 8.92	80.98 ± 2.97	0.185
30	78.54 ± 13.52	88.61 ± 6.36	0.129

G1 – group treated with 1% silver sulfadiazine; G2 – group treated with Regederm®. Statistical analysis: t-Student test - * $p < 0.05$. DAI: days after the injury induction; SD: standard deviation.

There was greater presence of crust in the Regederm® treated group at 3 DAI, inflammatory phase, and at 7 DAI, proliferative phase, when compared to the 1% SSD treated group ($p < 0.05$). At 30 DAI, maturation phase, only two animals from each group

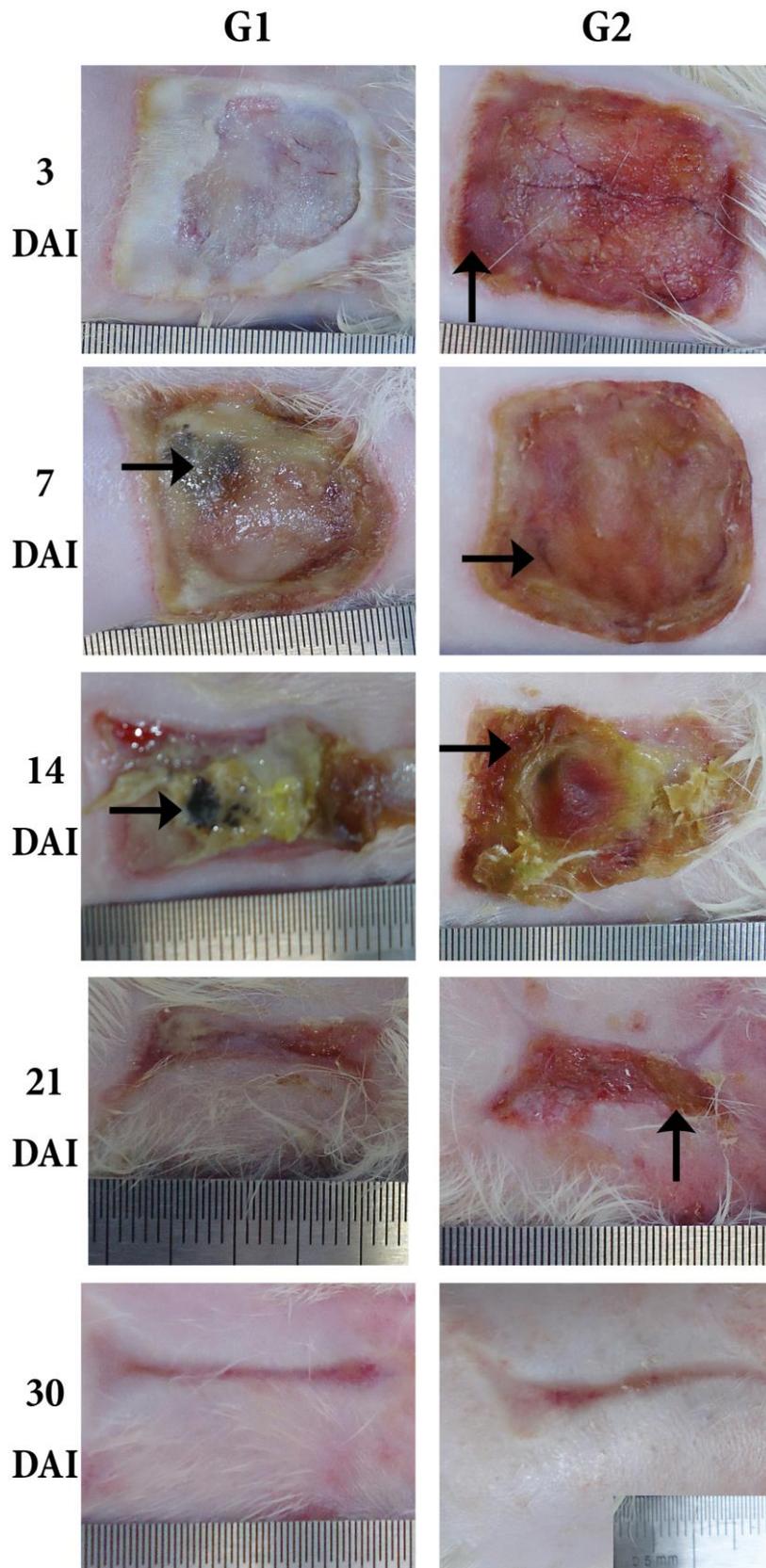
presented complete closure of the wound. There was no significant difference in the time taken for the wound closure between the two treatments (Table 2, Figure 2).

Table 2: Qualitative macroscopic evaluation of the crust formed in full thickness burning wounds experimentally induced in rats treated with 1% silver sulfadiazine or Regederm®.

DAI	G1 Median (min-max)	G2 Median (min-max)	p
3	1 (0-1)	2 (2-3)	0.002*
7	2 (2-2)	3 (2-3)	0.015*
14	3 (1-3)	2.5 (2-3)	0.818
21	1 (0-1)	1 (1-1)	0.394
30	0 (0-1)	0 (0-1)	1.000

DAI – Days after the injury induction; G1- group treated with 1% silver sulfadiazine; G2 – group treated with Regederm®. The lesions were considered as follows: 0 – absent; 1 – discrete; 2- moderate; 3- accentuated. Statistical analysis – Mann-Whitney. * p < 0.05.

Figure 2: Macroscopic evaluation of full thickness burning wounds experimentally induced in Wistar rats treated with 1% silver sulfadiazine (G1) and Regederm® (G2) at 3, 7, 14, 21 e 30 days after injury induction (DAI). Arrows indicate the crust over the wounds.



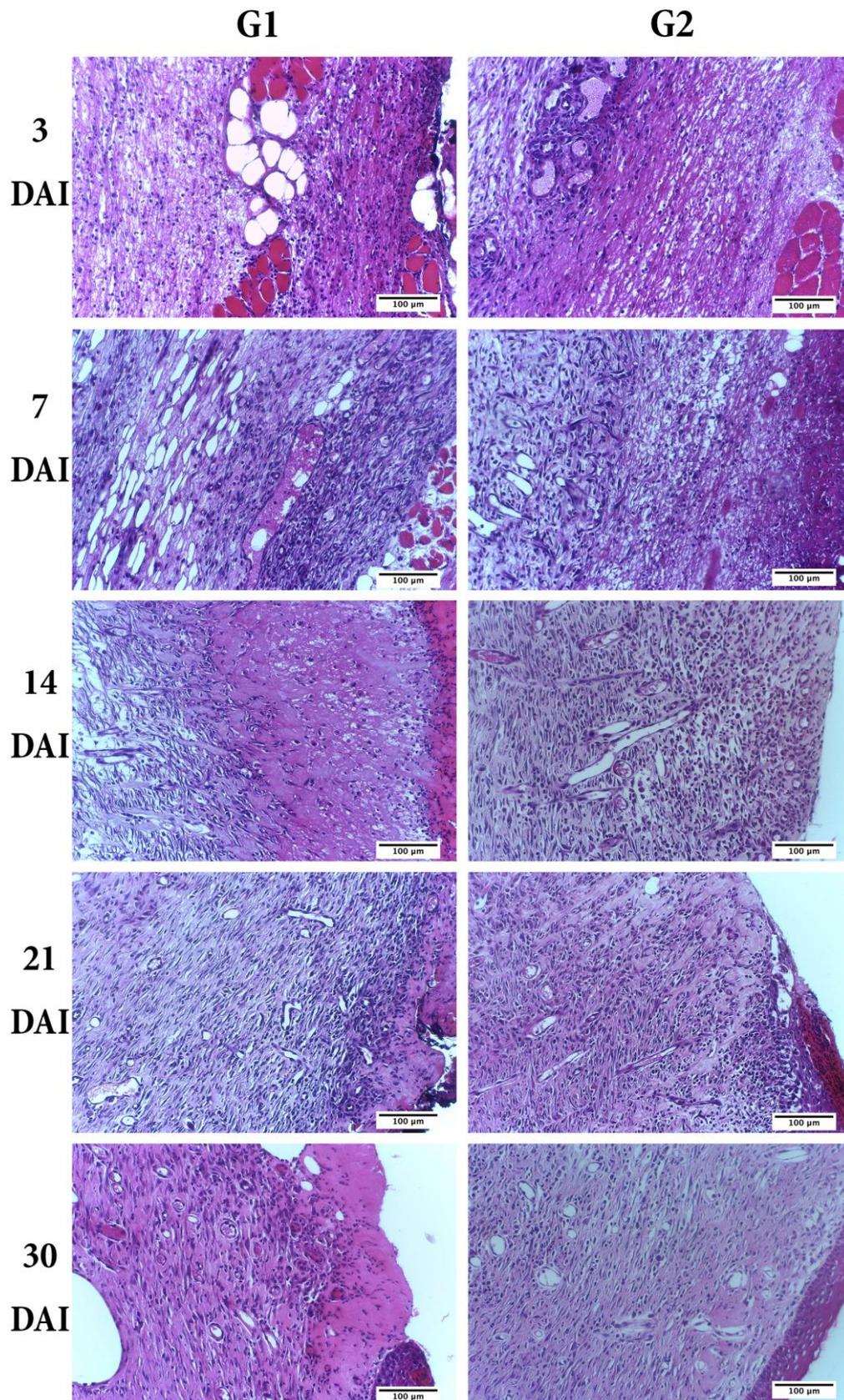
The general pathologic processes were analyzed through comparison of the two treatments, 1% SSD and Regederm® (Table 3, Figure 3). In the inflammatory phase (3 DAI) the Regederm® treated group presented greater hyperemia and inflammatory infiltration of both polymorphonuclear and mononuclear cells. In the proliferative phase (7 and 14 DAI) the Regederm® treated group maintained greater inflammatory infiltration of mononuclear cells and greater hemorrhage. In the maturation phase (21 and 30 DAI) the Regederm® treated group also presented greater hyperemia. There was no difference between the two treatments regarding the presence of fibrin, fibroblasts, necrosis and angiogenesis.

Table 3: Qualitative microscopic analysis of the general pathologic processes in full thickness burning wound experimentally induced in Wistar rats treated with 1% silver sulfadiazine (G1) and Regederm® (G2).

Pathologic process	DAI	G1 Median (min-max)	G2 Median (min-max)	p
Necrosis	3	2.5 (1-3)	3 (2-3)	0.413
	7	2.5 (1-3)	3 (3-3)	0.180
	14	3 (1-3)	3 (1-3)	0.690
	21	1 (0-2)	0 (0-1)	0.126
	30	0 (0-1)	0 (0-1)	0.792
PMN infiltration	3	2 (2-2)	3 (3-3)	0.029*
	7	3 (1-3)	3 (2-3)	0.589
	14	3 (1-3)	3 (1-3)	0.690
	21	1 (0-3)	1 (0-1)	0.247
	30	0.5 (0-1)	0 (0-1)	0.429
MN infiltration	3	1 (1-1)	2 (2-2)	0.029*
	7	2 (1-2)	3 (2-3)	0.030*
	14	2 (2-2)	1 (1-2)	0.151
	21	2 (2-2)	2 (2-2)	1.000
	30	1.5 (1-2)	1 (1-2)	0.792
Fibrin	3	3 (2-3)	3 (2-3)	0.905
	7	2 (1-2)	2 (1-3)	0.485
	14	1 (1-2)	1 (1-2)	1.000
	21	0 (0-1)	0 (0-0)	0.429
	30	0 (0-0)	0 (0-0)	1.000
Hyperemia	3	2 (1-2)	3 (3-3)	0.036*
	7	3 (3-3)	3 (2-3)	0.699
	14	2 (1-3)	3 (1-3)	0.690
	21	1 (0-1)	2 (1-2)	0.017*
	30	1 (0-2)	0 (0-0)	0.082
Hemorrhage	3	1 (0-3)	1 (0-2)	0.905
	7	0 (0-0)	2 (0-3)	0.015*
	14	1 (0-3)	0 (0-2)	0.421
	21	1 (0-1)	0 (0-1)	0.537
	30	0 (0-0)	0 (0-0)	1.000
Angiogenesis	3	0.5 (0-1)	1 (1-2)	0.190
	7	2.5 (2-3)	3 (3-3)	0.180
	14	3 (3-3)	3 (3-3)	1.000
	21	2 (2-3)	3 (2-3)	0.537
	30	2 (2-3)	2 (2-2)	0.429
Fibroblast	3	1 (0-1)	2 (1-2)	0.111
	7	3 (2-3)	3 (3-3)	0.394
	14	3 (2-3)	3 (3-3)	0.690
	21	3 (3-3)	3 (3-3)	1.000
	30	2 (1-2)	2 (2-2)	0.662

DAI: days after the injury induction; G1- group treated with 1% silver sulfadiazine; G2 – group treated with Regederm®. Min – minimum value; Max – maximum value; PMN – polymorphonuclear cells; MN – mononuclear cells. The statistical analysis considered 0 – absent; 1 – discrete; 2- moderate; 3- accentuated. Statistical analysis – Mann-Whitney. * p < 0.05.

Figure 3: Microscopic evaluation of full thickness burning wounds experimentally induced in Wistar rats treated with 1% silver sulfadiazine (G1) and Regederm® (G2) at 3, 7, 14, 21 e 30 days after the injury induction (DAI).



The collagen quantification was significantly higher in the Regederm® treated group at 14 DAI ($p < 0.05$) (Table 4).

Table 4: Collagen quantification (%) in full thickness burning wound experimentally induced Wistar rats treated with 1% silver sulfadiazine (G1) and Regederm® (G2).

DAI	G1	G2	p
	Mean ± SD	Mean ± SD	
14	14.62 ± 5.13	24.79 ± 8.91	0.001*
21	29.46 ± 11.61	25.51 ± 7.74	0.073
30	35.12 ± 0.58	34.90 ± 13.18	0.982

DAI: days after the injury induction; G1 – group treated with 1% silver sulfadiazine; G2 – group treated with Regederm®. * $p < 0.05$.

Discussion

The healing process of full thickness burning wound experimentally induced in Wistar rats, treated with 1% silver sulfadiazine and Regederm®, was evaluated according to macroscopic and microscopic parameters.

Macroscopically the injured area presented a whitish coloration. This aspect in conjunction with the microscopic alterations show a commitment of epidermis, dermis and hypodermis² which is characteristic of a full thickness burning wound. These findings confirm the efficacy of the experimental model with boiling water at 95°C used to induce this kind of injury^{14,17}.

The thickness of the burning wound is not static and may progress according to several pathophysiologic mechanisms linked to the injury cause^{2,19}. Thermal aggression induces proteic denaturation and inflammatory mediators' activation mainly in the committed area. The release of oxidant substances and proteases amplify the skin and endothelial cells death. This mechanism may produce more necrosis and enhance the severity of the burning wound¹⁹. Histological studies show that burning wounds are complex and dynamic injuries that reach their peak in the third day after the injury induction². Therefore the nature of the injury associated to the diversity of the pathophysiologic mechanisms contributes to different zones within the same injury²⁰.

The debridement was performed at the second day (48h) after the injury induction when the injury was already defined. The debridement is considered a standard approach in the treatment of full thickness burning wounds. However, excisions performed after 48h post- injury significantly increase the incidence of infection when compared to the ones performed before this period of time²¹. The change of the occlusive bandages on the wounds was performed daily in order to avoid infections.

It was not found in the literature any study that used the same methodology of injury induction nor similar treatment of burning wounds as the ones described in our study.

The morphometric analysis showed that burning wounds treated with 1% SSD presented greater wound contraction during the proliferative phase when compared to the Regederm® treated group. A similar result was detected in the analysis of the area of experimental excisional wounds induced in the dorsum of rats and treated with gel-ointment derived from *H. brasiliensis* latex in comparison to a non-treated group¹³.

According to the manufacturer Regederm® is commercially indicated as an accelerator of the healing process of cutaneous ulcers. However there was no difference in the wound closure time between the treatments evaluated in our study.

The Regederm® treated group showed greater presence of crust during the inflammatory and proliferative phases of the healing process. Similar findings were reported when Regederm® was used in the treatment of experimental excisional wounds induced in rats when compared to 0.9% NaCl and *Aloe vera* extract in the same phases of the healing process¹². On the other hand the biomembrane of *H. brasiliensis* latex showed a debridement action when used in the treatment of chronic venous ulcers when compared to a control group treated with collagenase¹⁰. This debridement action was not observed in the gel-ointment formulation - Regederm®.

The significant differences observed in the microscopic analysis of the general pathologic processes were observed in the inflammatory phase of the healing process. The Regederm® treated group presented increased acute inflammation such as hyperemia and polymorphonuclear and mononuclear cells inflammatory infiltration in comparison to the other treated group. The intense inflammatory activity induced by Regederm® has been described in the literature. There was a report of a dense inflammatory infiltration in the deepest layers of skin in the second day after subcutaneous implant of the biomembrane in the dorsum of mice showing that it acted in the inflammatory phase and recruited polymorphonuclear cells to the implant site⁹.

In spite of greater hyperemia at 3 and 21 DAI and hemorrhage at 7 DAI in the Regederm® treated group, there was no significant difference in the angiogenesis between the treatments. Other studies have shown increased angiogenic activity of *H. brasiliensis* latex^{9,11,22}. Probably the inflammatory response caused by the bioactive fractions of *H. brasiliensis* latex is the one responsible for the angiogenic activity observed in chicken chorioallantoic membranes exposed to Regederm®²³ and for the fibroplasia observed in mice⁹.

Another study with a derivative of this latex showed that the angiogenesis occurs during a determined period of time until the final functional goal has been achieved²². Angiogenesis persists throughout the proliferative phase and is accompanied by an intense inflammatory infiltration which was observed in the skin of mice and it was more intense at the 14th day⁹. However these studies have not reported the persistence of

angiogenesis during the maturation phase. When the healing process of experimental excisional wounds in rats was evaluated the treatment with the serum of *H. brasiliensis* latex did not show angiogenic nor inflammatory stimuli. Therefore this serum did not influence the healing process in acute cutaneous wounds in rats¹³. Probably this difference is due to the formulation differences between Regederm® and the serum of *H. brasiliensis* latex.

Overall this study differs from other reports because of the use of *H. brasiliensis* derivatives in the treatment experimentally induced burning wounds in rats. The etiology of the injuries and diseases are associated to factors that modify the influence of the latex in the healing process of these injuries¹⁰. Also the studies performed with chicken chorioallantoic membrane showed the angiogenic stimulus of the latex but not the evolution of this process as is observed in other experimental models²³.

The Regederm® treatment of full thickness burning wounds experimentally induced in rats induced greater inflammatory activity in the initial phase of the healing process of these injuries. However it did not show differences in angiogenesis and in fibroplasia from the standard treatment used which is 1% silver sulfadiazine.

References

1. Peck MD. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: distribution and risk factors. *Burns*. 2011;37(7):1087-1100. DOI: 10.1016/j.burns.2011.06.005
2. Evers LH, Bhavsar D, Mailander P. The biology of burn injury. *Experimental Dermatology*. 2010;19(9):777-783. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x
3. Iqbal T, Saaq M, Ali Z. Epidemiology and outcome of burns: early experience at the country's first national burns Centre. *Burns*. 2013;39(2):358-362. DOI: 10.1016/j.burns.2012.07.011
4. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* 2007; 25(1):9-18. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2006.09.007
5. Wasiak J, Cleland H, Campbell F, Spinks A. Dressings for superficial and partial thickness burns (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013;11(3):1-88. DOI: 10.1002/14651858.CD002106.pub4
6. Isbi Practice Guidelines Committee, Steering Committee, Advisory Committee. ISBI Practice Guidelines for Burn Care. *Burns*. 2016;42(5):953-1021. DOI: 10.1016/j.burns.2016.05.013
7. Mrue F, Coutinho-Netto J, Ceneviva R, Lachat JJ, Thomazini JA, Tambelini H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mater. Res.* 2004;7(2):277-283. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-14392004000200010>

8. Domingos AL, Tucci-JR S, Garcia SB, et al.; Use of latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: biocompatibility, clinical and histological outcomes. *Int. Braz. J. Urol.* 2009;35(2):217-224.
9. Andrade TAM, Iyer A, Das PK, et al.; The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2011;44(10):1036-1047. DOI: 10.1590/S0100-879X2011007500116
10. Frade MAC, Assis RVC, Coutinho-Netto J, Andrade TAM, Foss NT. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. *An. Bras. Dermatol.* 2012;87(1):45-51. DOI: 10.1590/S0365-05962012000100005.
11. Bolina-Matos RS, Alves PHM, Rici REG, Favaron PO, Liberti EA. Efeitos da biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) em pele de ratos Wistar submetidos à lesão térmica corporal por escaldamento. *Rev. Bras. Queimaduras.* 2013;12(4):270-277.
12. Brandão ML, Reis PRM, Araújo LA, et al.; Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and *Aloe Vera* extract in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2016;31(9):570-577. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020160090000001>
13. Penhavel MVC, Tavares VH, Carneiro FP, Sousa JB. Effect of *Hevea brasiliensis* latex sap gel on healing of acute skin wounds induced on the back of rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2016;43(1):48-53. DOI: 10.1590/0100-69912016001010
14. Moraes JM, Mendonça DEO, Moura VBL, et al.; Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(4):1169-1176. DOI: 10.1007/s10103-012-1213-1
15. Nguyen TT, Gilpin DA, Meyer NA, Herndon DN. Current treatment of severely burned patients. *Ann. Surg.* 1996;223(1):14-25. PMID: PMC1235059
16. Al-Watban FAH, Andres BL. Effect of He-Ne laser (632,8 nm) and Polygen TM on CHO cells. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 2000;18(3):145-150. DOI: 10.1089/clm.2000.18.145
17. Fantinati MS, Mendonça DEO, Fantinati AMM, et al.; Low intensity ultrasound therapy induces angiogenesis and persistent inflammation in the chronic phase of the healing process of third degree burn wounds experimentally induced in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir. Bras.* 2016;31(7): 463-471. DOI: 10.1590/S0102-865020160070000006
18. Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-Polarization Method. *Histochemistry.* 1982;74(1):153-156. DOI: 10.1007/BF00495061
19. Kao CC, Garner WL. Acute burns. *Plast. Reconstr. Surg.* 2000;105(7):2482-2492. PMID: 11242345

20. Jackson DM. The diagnosis of the depth of burning. *British J. Surg.* 1953;40(164):588-596. DOI: 10.1002/bjs.18004016413
21. Xiao-Wu W, Herndon DN, Spies M, et al.; Effects of delayed wound excision and grafting in severely burned children. *Arch. Surg.* 2002;137(9):1049-1054. DOI: 10.1001/archsurg.137.9.1049
22. Ferreira M, Mendonça RJ, Coutinho-Netto J, Mulato M. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics*, 2009;39(3):564-569. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-97332009000500010>
23. Almeida LM, Floriano JF, Ribeiro TP, et al.; *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility, assessment and angiogenic activity. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2014;25(9):2153-2162. DOI: 10.1007/s10856-014-5255-8.

Artigo 2.

Modelo experimental para estudo da cicatrização de queimaduras de espessura total em ratos

Renato de Castro Spada Ribeiro, Sara Oliveira do Vale Ribeiro, Luís Pedro Ferreira de Assis, Rodrigo Barcelos Ferreira de Carvalho, Yanley Lucio Nogueira, Manoel Francisco Biancardi, Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, Marina Clare Vinaud, Ruy de Souza Lino Junior

RESUMO

Introdução: Os modelos experimentais para o estudo da cicatrização em queimaduras são importantes para a compreensão dos mecanismos patológicos desta lesão e desenvolvimento de propostas terapêuticas. **Objetivo:** Desenvolver modelo experimental de queimadura com espessura total para estudo do processo cicatricial em ratos. **Métodos:** Quarenta ratos foram submetidos a queimadura de espessura total, desbridamento por excisão tangencial no dia 2 após a lesão e tratamento com curativo oclusivo com sulfadiazina de prata 1% (SSD). Foram divididos em dois grupos de 20 animais: (1) grupo controle; (2) grupo experimental (com utilização de artefato para proporcionar a reepitelização - anel). As feridas foram avaliadas morfométrica, macroscopicamente e microscopicamente (HE e expressão de α -actina por imunistoquímica) nos dias 7, 14, 21 e 30. **Resultados:** as queimaduras produzidas foram de espessura total, pois provocaram lesão que atingiu a hipoderme e o desbridamento por excisão tangencial proporcionou a remoção da necrose (crosta) da ferida. A redução da área da ferida foi maior no grupo sem anel ao 7 DAI ($p=0,010$) e no grupo com anel ao 14 DAI ($p=0,009$). Houve maior presença de crosta ($p=0,032$) no grupo sem anel ao 7 DAI. Considerando-se as fases do processo de cicatrização, o grupo sem anel apresentou maior presença de hiperemia ($p=0,002$) e hemorragia ($p=0,030$) na fase proliferativa (7 DAI e 14 DAI) e maior presença de infiltrado mononuclear ($p=0,015$) na fase de remodelamento (21 DAI). Por outro lado, o grupo com anel apresentou maior presença de fibroblastos ($p=0,009$) ao 30 DAI. **Conclusão:** o modelo proposto foi eficiente na produção de queimadura de espessura total e remoção da necrose. A utilização do anel não influenciou no tempo de fechamento da lesão.

Palavras-chave: Queimaduras. Cicatrização. Modelo experimental. Ratos. Sulfadiazina de prata 1%.

Introdução

Os modelos experimentais para o estudo da cicatrização de queimaduras são necessários para a compreensão dos mecanismos de reparo tecidual e desenvolvimento de estratégias para tratamento clínico (REN; ZHOU; CHEN, 2012).

Não há padronização no modelo animal para estudo de queimaduras (MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012), podendo envolver ratos, camundongos, suínos, coelhos e outros animais. Não existe entre eles um que seja considerado mais adequado que o outro e o ideal é que sejam vistos como modelos complementares para o estudo de queimaduras (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014).

Os ratos têm sido amplamente utilizados no estudo de cicatrização de feridas de pele e em pesquisas sobre a eficiência de recursos terapêuticos. Essa espécie é frequentemente escolhida devido a sua disponibilidade, baixo custo, tamanho reduzido, facilidade de manuseio (MITSUNAGA JUNIOR et al, 2012) e por proporcionarem área de pele adequada para o estudo do processo de cicatrização (DORSETT-MARTIN, 2004). Geralmente são utilizados animais com menos de 300g, característica de animais jovens, e não há evidência que indique superioridade de uma linhagem sobre outra para pesquisas de cura de feridas (DORSETT-MARTIN, 2004).

As técnicas para produção de queimaduras são pouco descritas em modelos com ratos e estudos precisos só podem ser alcançados com queimaduras que sejam uniformes no tamanho e profundidade (CAI et al, 2014). As técnicas mais utilizadas para a produção de queimaduras experimentais são por contato com superfície quente, como metal ou água (MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012). A queimadura com água quente (escaldamento) é considerada a mais adequada em função da frequência na etiologia de queimaduras em humanos (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014). A região mais exposta a queimadura no modelo animal de ratos é o dorso (DORSETT-MARTIN, 2004), pela impossibilidade de o animal alcançar a lesão e assim prevenir

danos adicionais (PEREIRA et al, 2012). Estudos demonstram que o modelo experimental para o estudo de queimaduras envolve ratos, com lesões de espessura total no dorso de animais submetidos a tricotomia e anestesiados com combinação de ketamina e xilazina (MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012).

A cicatrização em ratos não mimetiza perfeitamente o processo em humanos, pois a elasticidade da pele do rato e sua baixa aderência as estruturas mais profundas fazem com que seja solta e o mecanismo de cicatrização aconteça predominantemente por contração, processo que é limitado nos seres humanos e confunde a avaliação qualitativa e quantitativa dos reparos em feridas experimentais (DAVIDSON; YU; OPALENIK, 2013). Outro elemento que contribui para a contração das feridas nos ratos e camundongos é a presença do panículo carnoso, uma fina camada muscular na fáscia superficial, ausente nos seres humanos. A pele humana é bastante aderida as estruturas mais profundas, tornando a formação de tecido de granulação e a reepitelização os mecanismos mais adequados para o processo de cicatrização nessas circunstâncias (GALIANO et al., 2004).

Para reduzir a contração de feridas, pode ser usada uma fixação mecânica da pele com a utilização de anéis estabilizadores (DAVIDSON; YU; OPALENIK, 2013). Galiano et al. (2004) propuseram um modelo animal experimental para o estudo do processo de cicatrização, que constitui na fixação de uma tala (anel) ao redor de uma lesão excisional provocada em camundongo. A fixação do anel foi realizada com cola instantânea adesiva e suturas de nylon. A fixação da ferida com anel em camundongos diminuiu a contração e possibilitou que a cicatrização ocorresse por formação do tecido de granulação e epitelização, aproximando o modelo experimental do processo em seres humanos.

A necessidade de consistência nas pesquisas experimentais com animais e cicatrização é importante para possibilitar a comparação entre os estudos e a ampliação da base de conhecimento dos processos e mecanismos da cicatrização (DORSETT-MARTIN, 2004). Apesar de exigir consistência e cuidado, o modelo murino não envolve técnicas cirúrgicas complicadas e permite o estudo de agentes promissores na cicatrização de feridas, por exemplo, que promovam angiogênese ou redução da inflamação (DUNN et al, 2013). Compreender as vantagens e limitações desses modelos animais é essencial para o desenvolvimento de tratamentos que sejam

cl clinicamente relevantes para os seres humanos (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014).

Assim, para que o estudo sobre cicatrização de queimaduras em murinos aproxime-se do processo que acontece em humanos, é necessário desenvolver modelos experimentais de queimaduras em ratos que sejam reprodutíveis e utilizem procedimentos comuns ao tratamento da queimadura em humanos e se assemelhe ao padrão de cicatrização humano. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um modelo experimental de queimaduras de espessura total para o estudo do processo cicatricial em ratos tratados com Sulfadiazina de Prata a 1%.

Métodos

Estudo experimental prospectivo com ratos para validação de modelo experimental em queimaduras de espessura total. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás - Protocolo nº 22/14 e os princípios e orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal foram aplicados (BRASIL, 2015).

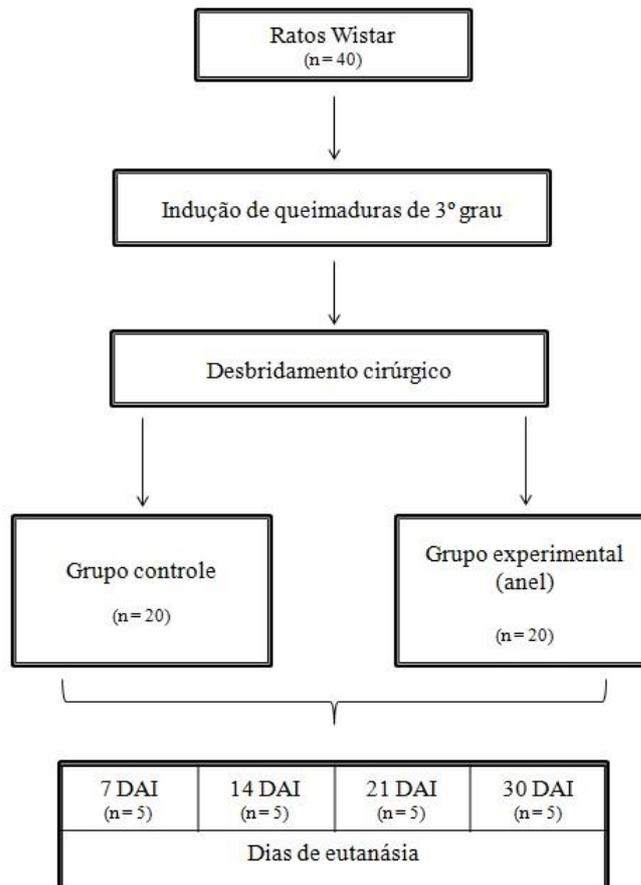
A adaptação dos animais ao ambiente priorizou o bem-estar. Luminosidade, temperatura, intensidade de ruídos e umidade relativa do ar foram as do ambiente geral. Água e ração comercial autoclavada foram oferecidos *ad libitum*. Os ratos foram mantidos em gaiolas, trocadas duas vezes por semana.

Grupos experimentais

Quarenta ratos Wistar fêmeas com peso entre 200 e 230g foram submetidos a queimaduras de espessura total por escaldamento, desbridamento por excisão tangencial realizado no dia 2 após a queimadura, uso tópico de sulfadiazina de prata 1%, curativo oclusivo trocado diariamente e distribuídos em dois grupos: grupo controle (G1); grupo experimental, submetido a fixação de anel - artefato para proporcionar a reepitelização da lesão (G2).

Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados em 7, 14, 21 e 30 dias após a indução da queimadura (DAI) para acompanhamento de parâmetros morfométricos e anatomopatológicos do processo de cicatrização (Figura 1).

Figura. 1: Representação da distribuição dos ratos Wistar em grupos e subgrupos



Procedimentos de queimadura e tratamento

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução aquosa estéril com ketamina 10% e xilazina 2% (0,1 U/g) para a realização das queimaduras e dos desbridamentos. Foi realizada tricotomia da região cervico-dorsal e antissepsia da pele com álcool 70%.

O método para delinear a exposição da pele foi descrito por Moraes et al. (2013). As lesões térmicas foram realizadas com água a 95 °C para atingir queimadura de espessura total (MORAES et al., 2013). Todos os animais foram medicados com

ibuprofeno 100 mg/ml diluído na água por um período de 7 dias após a realização da queimadura.

Logo após a queimadura e diariamente a ferida foi limpa cuidadosamente com soro fisiológico e tratada (cobertura) com aplicação tópica da sulfadiazina de prata 1%, aplicada conforme orientações em bula, ou seja, aplicação de uma camada uniforme, delgada, suficiente para cobrir todo o leito da ferida com aproximadamente 1mm de espessura. A lesão foi coberta de forma secundária com curativo oclusivo estéril (tecido morim embebido em glicerina) e manta estéril, trocados diariamente. Foram mantidos 2 animais por gaiola durante todo o período de tratamento.

A excisão tangencial é o método padrão para excisão de queimaduras (ISBI, 2016), que consiste em remover a necrose do tecido viável. As lesões foram desbridadas por excisão tangencial no dia 2 após indução da queimadura, como procedimento indicado no tratamento de queimaduras de espessura total (ISBI, 2016; NGUYEN et al., 1996). O procedimento foi realizado apenas uma vez, removendo toda a área de necrose.

Procedimento de colocação do anel (artefato para proporcionar a reepitelização da lesão) no grupo experimental

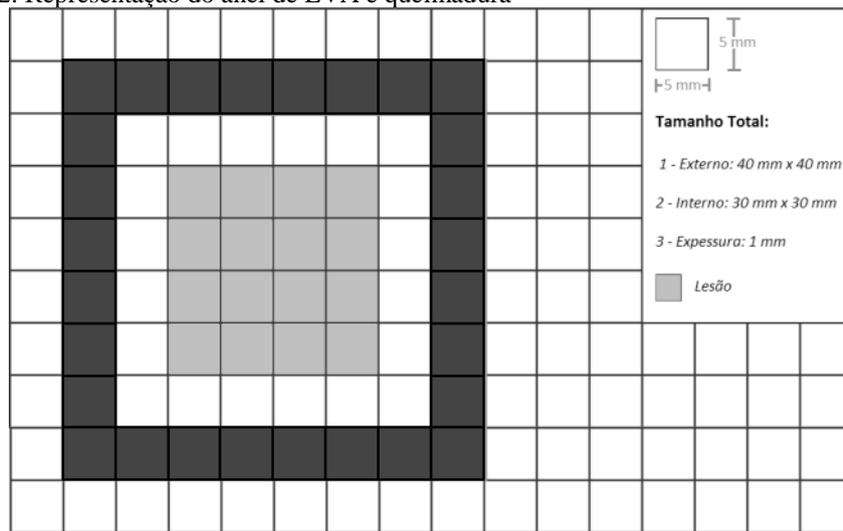
Foi desenvolvido um anel em etileno-acetato de vinila (EVA), adaptado de Galiano et al. (2004), para restringir a contração da ferida e induzir o fechamento da lesão por reepitelização, com densidade de 0.170 g/cm³ e espessura de 2 mm em formato quadrado e três tamanhos diferentes: (1) lado externo de 40x40 mm e abertura interna de 30x30 mm; (2) lado externo de 30x30 mm e abertura de 20x20 mm; (3) lado externo de 25x25 mm e abertura de 15x15 mm (Figura 2).

Apenas o grupo experimental (G2) foi submetido ao uso de anel de EVA. Imediatamente após o desbridamento, o anel de EVA foi colocado com a abertura circundando a queimadura e fixado com cola adesiva rápida a base de etilcianoacrilato e suturas monofilamento nylon 4-0 para assegurar a posição. Foram realizadas 16 suturas ao redor do anel, sendo uma em cada vértice e três em cada lado do quadrado.

Esse primeiro anel utilizado tinha dimensão interna de 30x30 mm. Foi realizada revisão das suturas ao 7º dia após queimadura. No 14º dia de tratamento o anel inicial foi retirado e fixado em seu lugar, seguindo as mesmas indicações de fixação, um anel com dimensão interna de 20 x 20 mm (para os animais de 21 DAI e 30 DAI). No 21º dia pós lesão foi retirado esse anel e fixado em seu lugar um anel com dimensão interna de 15 x 15 mm para os animais de 30 DAI.

Os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésicos em solução aquosa estéril com ketamina 10% e xilazina 2% por via intraperitoneal na dosagem de 0,4 U/g. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7, 14, 21 e 30 dias após a indução da queimadura (DAI) para acompanhamento de parâmetros morfométricos e anatomopatológicos do processo de cicatrização das feridas.

Figura. 2: Representação do anel de EVA e queimadura



Nota: EVA – Etileno-acetato de vinila

Avaliação morfométrica e macroscópica da ferida

A análise morfométrica das feridas foi realizada com fotografias registradas logo após as queimaduras (dia zero) e após 7, 14, 21 e 30 dias de tratamento, utilizando-se câmera fotográfica digital conectada a um tripé e a uma distância de 11 cm da prancha de fotografia. As imagens foram analisadas utilizando-se o software Image J 1.3.1 (NIH, EUA).

A delimitação da área inicial (Ai) e final (Af) da queimadura foi realizada com o software Image J 1.3.1 (NIH, EUA). O grau de redução percentual da área da queimadura ($\Delta A\%$) foi determinada pela fórmula: $\Delta A\% = [(Ai-Af)/Ai] \times 100$ (AL-WATBAN; ANDRES, 2000).

A avaliação macroscópica (presença de crosta) foi realizada após a eutanásia do animal e classificada de forma semi-quantitativa com os critérios: ausente (escore = 0); discreta, com comprometimento de até 25% da área total da lesão (escore = 1); moderada, com comprometimento entre 25% e 50% (escore = 2); acentuada, com comprometimento acima de 50% (escore = 3) (FANTINATI et al., 2016).

Avaliação microscópica

Para a avaliação histológica, um fragmento da ferida (contendo as bordas) foi fixado, processado para inclusão em parafina, cortado com 4 micrometros e corado pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

A avaliação dos processos patológicos gerais na derme considerou os parâmetros: necrose/crosta, fibrina, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares (PMN), infiltrado inflamatório de mononucleares (MN), angiogênese, fibroblasto e colágeno. A presença desses processos patológicos gerais foi classificada de forma semi-quantitativa, seguindo os critérios: ausente (escore = 0); discreta, com comprometimento de até 25% da área total da lesão (escore = 1); moderada, com comprometimento entre 25% e 50% (escore = 2); acentuada, com comprometimento acima de 50% (escore = 3) (FANTINATI et al., 2016).

Cortes de tecidos foram submetidos a imunofluorescência para a detecção de α -actina de músculo liso por meio de incubação com IgG_{2a} monoclonal (sc-32251, IA4, Santa Cruz Biotechnology) a uma diluição de 1:100 durante a noite. Posteriormente, anticorpos específicos secundários conjugados com fluorocromo (sc-2010, IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology) foram usados por duas horas à temperatura ambiente. DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) foi empregado para permitir a visualização dos núcleos das células. Os cortes histológicos foram analisados com um microscópio de fluorescência Olympus BX43 (Olympus, Japão). Os cortes foram fotografados em

aumento de 20x. Toda a área da ferida foi avaliada. As imagens foram analisadas utilizando-se o software Image J 1.3.1 (NIH, EUA).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Sigma Stat 2.3. As variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Para análise da variação da área da queimadura e proporção de α -actina foi utilizado o teste t-Student. Para análise macroscópica e microscópica dos processos patológicos gerais foi utilizado o teste Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Análise morfométrica e macroscópica

A análise morfométrica das queimaduras mostrou diferenças significativas no grau de redução das áreas das queimaduras na fase proliferativa do processo de cicatrização, em 7 DAI e 14 DAI ($p < 0,05$) (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre os grupos no tempo de fechamento das lesões, pois todas estavam abertas aos 30 DAI ($p=0,107$).

Tabela. 1: Redução percentual da área das queimaduras ($\Delta A\%$) de espessura total em ratos Wistar

DAI	G1	G2	p
	Média \pm DP	Média \pm DP	
7	15,41 \pm 2,46	2,46 \pm 8,58	0,010*
14	26,50 \pm 15,08	52,01 \pm 10,70	0,009*
21	75,51 \pm 8,92	80,27 \pm 5,83	0,271
30	78,54 \pm 13,52	93,58 \pm 2,29	0,107

Nota: $\Delta A\%$ - redução percentual da área das queimaduras; DAI - dias após a indução da queimadura; G1 - grupo controle; G2 - grupo experimental; DP - desvio padrão. Teste estatístico t-Student, * $p < 0,05$.

O reparo das queimaduras de espessura total evoluiu com menor presença de crosta no grupo submetido a fixação do anel durante o 7 DAI. Não houveram diferenças significativas entre os grupos na presença de crosta nos outros dias experimentais. A

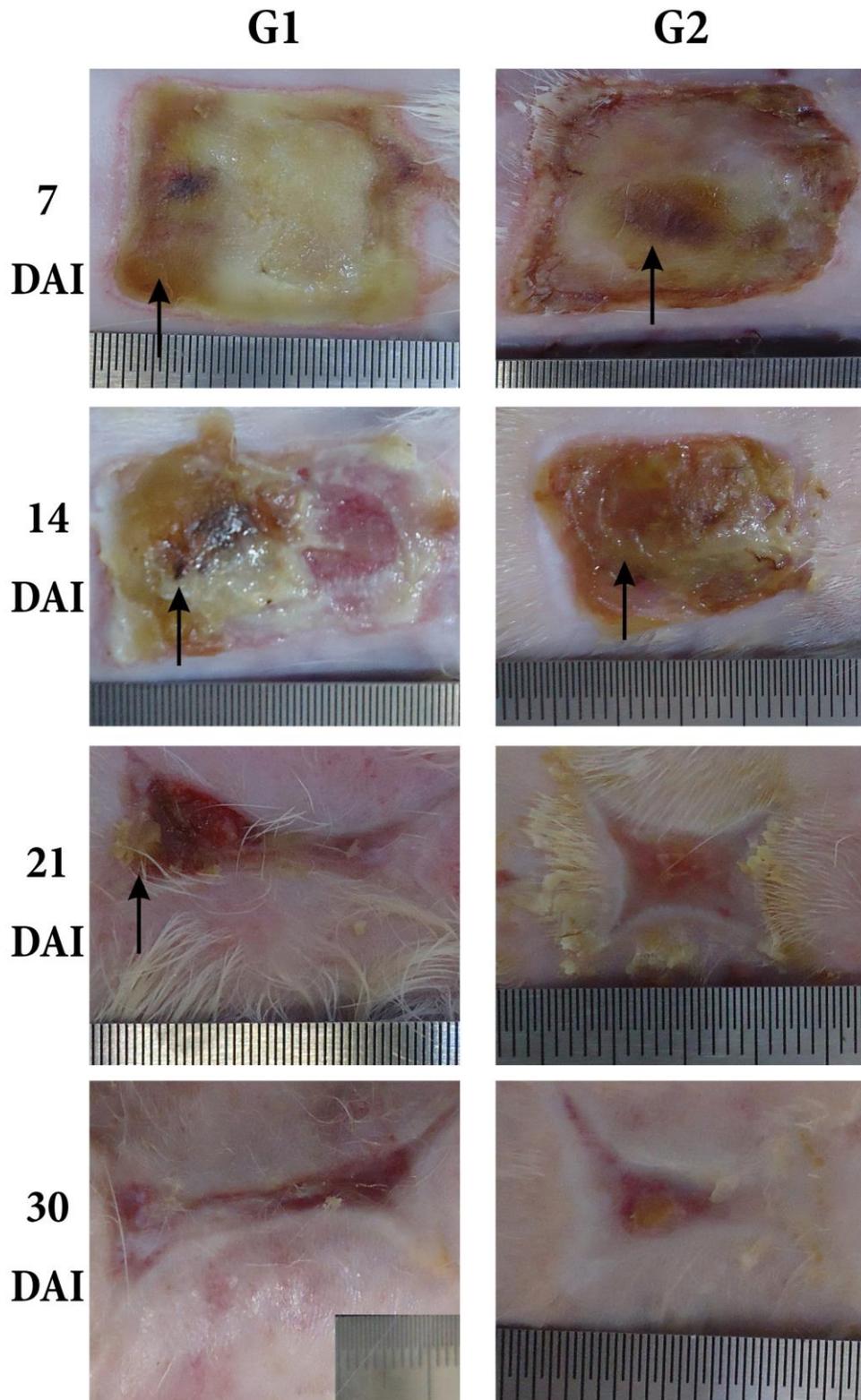
comparação do formato das lesões aos 30 DAI permite observar que nas feridas do grupo controle houve aproximação das bordas em formato de “Y”, indicando o fechamento por contração. Por outro lado, nas feridas que foram submetidas a aplicação do anel, o aspecto era menos fusiforme (Tabela 2, Figura 3).

Tabela. 2: Análise macroscópica qualitativa da crosta em queimaduras de espessura total em ratos Wistar

DAI	G1 Mediana (min-max)	G2 Mediana (min-max)	P
7	2 (2-2)	1 (1-2)	0,032*
14	3 (1-3)	3 (2-3)	0,937
21	1 (0-1)	0 (0-2)	0,731
30	0 (0-1)	0 (0-0)	0,714

Nota: DAI - dias após a indução da queimadura; G1 – grupo controle; G2 – grupo experimental; min – valor mínimo; max – valor máximo. Para análise estatística as alterações foram consideradas: 0 – ausente; 1 – discreto; 2 – moderado; 3 – acentuado. Teste estatístico Mann-Witney, * p < 0,05.

Figura. 3: Aspecto macroscópico de queimaduras de espessura total em ratos após tratamento aos 7, 14, 21 e 30 DAI.



Nota: DAI – dias após indução da queimadura; G1 – grupo controle; G2 – grupo experimental

Análise microscópica

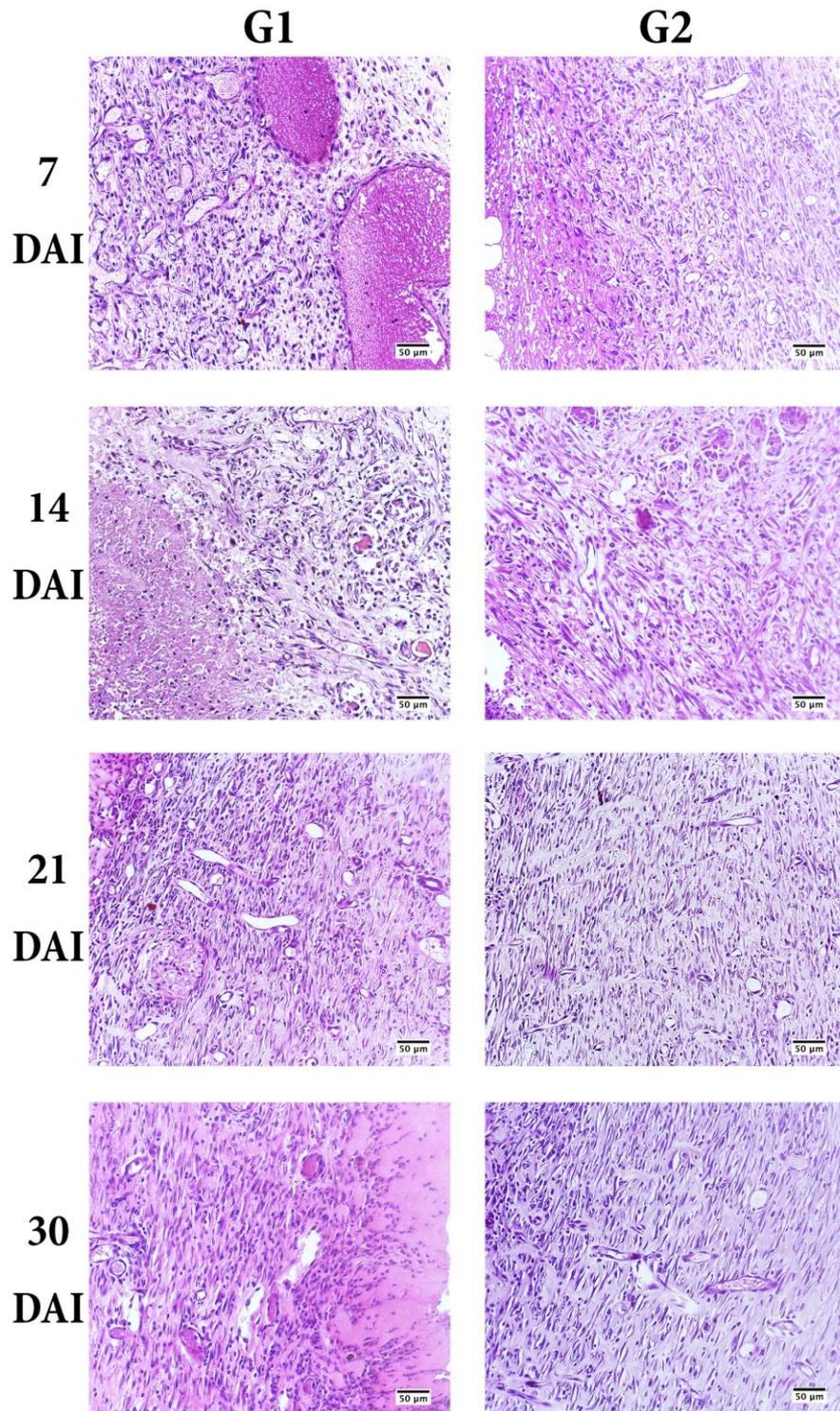
Os processos patológicos gerais foram estudados comparando-se os grupos controle (sem anel) e experimental (submetidos a fixação do anel) (Tabela 3, Figura 4). Na fase proliferativa, o grupo controle apresentou maior hiperemia (7 DAI) e hemorragia (14 DAI). Na fase de remodelamento, o grupo controle apresentou maior intensidade de infiltrado mononuclear (21 DAI) e o grupo com anel apresentou maior presença de fibroblastos (30 DAI). Não houveram diferenças significativas entre os dois grupos na presença de necrose, infiltrado polimorfonuclear, fibrina e angiogênese.

Tabela. 3: Análise microscópica qualitativa dos processos patológicos gerais em queimaduras de espessura total em ratos Wistar.

Processo patológico	DAI	G1 Mediana (min-max)	G2 Mediana (min-max)	p
Necrose	7	2,5 (1-3)	2,5 (2-3)	0,818
	14	3 (1-3)	2 (0-3)	0,126
	21	1 (0-2)	0 (0-2)	0,180
	30	0 (0-1)	0 (0-1)	1,000
Infiltrado PMN	7	3 (1-3)	2,5 (2-3)	0,818
	14	3 (1-3)	1,5 (0-3)	0,126
	21	1 (0-3)	0,5 (0-2)	0,310
	30	0,5 (0-1)	0 (0-1)	0,699
Infiltrado MN	7	2 (1-2)	2 (2-3)	0,126
	14	2 (2-2)	2 (2-2)	1,000
	21	2 (2-2)	1 (1-2)	0,015*
	30	1,5 (1-2)	1 (1-2)	0,394
Fibrina	7	2 (1-2)	2,5 (1-3)	0,240
	14	1 (1-2)	1 (0-1)	0,247
	21	0 (0-1)	0 (0-0)	0,394
	30	0 (0-0)	0 (0-0)	1,000
Hiperemia	7	3 (3-3)	2 (2-2)	0,002*
	14	2 (1-3)	2 (0-2)	0,247
	21	1 (0-1)	0 (0-1)	0,180
	30	1 (0-2)	0,5 (0-1)	0,485
Hemorragia	7	0 (0-0)	0 (0-0)	1,000
	14	1 (0-3)	0 (0-0)	0,030*
	21	1 (0-1)	0 (0-0)	0,065
	30	0 (0-0)	0 (0-0)	1,000
Angiogênese	7	2,5 (2-3)	3 (3-3)	0,180
	14	3 (3-3)	3 (3-3)	1,000
	21	2 (2-3)	3 (2-3)	0,180
	30	2 (2-3)	3 (2-3)	0,394
Fibroblasto	7	3 (2-3)	3 (3-3)	0,394
	14	3 (2-3)	3 (3-3)	0,662
	21	3 (3-3)	3 (3-3)	1,000
	30	2 (1-2)	3 (2-3)	0,009*

Nota: DAI – dias após a indução da lesão; G1 – grupo controle; G2 – grupo experimental; min – valor mínimo; max – valor máximo; PMN – polimorfonucleares; MN - mononucleares. Para análise estatística as alterações foram consideradas: 0 – ausente; 1 – discreto; 2 – moderado; 3 – acentuado. Teste estatístico Mann-Witney, * p < 0,05.

Figura. 4: Fotomicrografia da região da derme de queimaduras de espessura total em ratos após tratamento aos 3, 7, 14, 21 e 30 DAI.



Nota: DAI – dias após indução da queimadura; G1 – grupo controle; G2 – grupo experimental. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Escala: 50 micrometros.

Não houveram diferenças entre os grupos na quantificação de α -actina durante todo o processo de cicatrização.

Tabela. 4: Proporção de alfa-actina (%) em queimaduras de espessura total em ratos

DAI	G1	G2	p
	Mediana (max-min)	Mediana (max-min)	
7	0,224 (1,248 – 0)	0,065 (1,506 – 0)	0,582
14	0,227 (1,257 – 0,010)	0,148 (1,044 – 0)	0,176
21	0,212 (2,783 – 0)	0,176 (2,536 – 0,013)	0,852
30	0,123 (0,249 – 0,084)	0,050 (0,149 – 0,029)	0,183

Nota: DAI – dias após a indução da lesão; G1 – grupo controle; G2 – grupo experimental; DP – desvio padrão. Teste estatístico t-Student, *p < 0,05.

Discussão

Neste estudo foi demonstrado um modelo experimental com ratos, desbridamento e utilização de anel estabilizador para o estudo de cicatrização de queimaduras de espessura total. Esse modelo apresentou muitas características do tratamento de queimaduras e processo de cicatrização de feridas que acontecem em seres humanos.

O método utilizado para produção das queimaduras nos ratos permitiu controle adequado da exposição da área a ser lesada nos procedimentos de queimadura (MORAES et al., 2013). A região dorsal do rato exposta a água fervente apresentou aspecto branco nacarado após a queimadura, característica macroscópica de queimaduras de espessura total (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010). A lesão apresentou aproximadamente 4 cm². As queimaduras em dorso de animais por contato com água quente são as mais comuns em estudos desse tipo (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014; DORSETT-MARTIN, 2004; MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012).

Os aspectos microscópicos observados nos animais submetidos a eutanásia evidenciam o comprometimento de epiderme, derme e hipoderme, caracterizando a queimadura como de espessura total, com dano total de pele e subcutâneo. Esses achados confirmam o modelo experimental de queimadura de espessura total, com

exposição a água com temperatura de 95 °C (FANTINATI et al., 2016; MORAES et al., 2013).

Os curativos oclusivos foram realizados com intervalos de 24h, do dia de indução da queimadura (dia zero) ao dia previsto para eutanásia. A utilização do curativo oclusivo visou manter úmido o ambiente da lesão, prevenindo dessecação e infecções e acelerando o processo cicatricial (ISBI, 2016; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; VUJANOVIC; VUJANOVIC, 2013; WASIAK et al., 2013). Além disso, evita danos físicos adicionais as lesões (ABDULLAHI; AMININIK; JESCHKE, 2014; DORSETT-MARTIN, 2004; MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012).

O desbridamento por excisão tangencial foi realizado em todos os animais no segundo dia após a queimadura (48h), quando a lesão já estava definida. Foi retirada toda a necrose, preservando o tecido saudável adjacente. O desbridamento é considerado a abordagem padrão no tratamento de feridas de espessura total. Entretanto, desbridamentos realizados com mais de 48h da lesão aumentam significativamente a incidência de contaminação por bactérias e fungos e a infecção da lesão quando comparados com procedimentos realizados em até 48h após a queimadura (ISBI, 2016; XIAO-WU et al., 2002).

As queimaduras não são lesões uniformes e a profundidade da queimadura não é estática e determinada logo após a agressão. A profundidade da lesão pode progredir em função dos diversos mecanismos patofisiológicos vinculados a queimadura. A agressão térmica produz desnaturação proteica e ativação de mediadores inflamatórios. A liberação de substâncias oxidantes e proteases ampliam a morte de células da pele e células endoteliais. Isso pode produzir mais necrose e ampliar a gravidade da queimadura (KAO; GARNER, 2000). A natureza da lesão e a diversidade dos mecanismos patofisiológicos contribuem para que a lesão seja dinâmica e tenha diferentes zonas (JACKSON, 1953). Assim, no presente trabalho, os desbridamentos foram realizados após a estabilização da queimadura e antes dos riscos aumentados de infecção.

No momento do desbridamento, os animais do grupo experimental (G2) foram submetidos a fixação do anel de EVA para restrição da cicatrização por contração e indução da reepitelização. A fixação de anel ao redor de uma lesão excisional em

camundongos diminuiu a contração e promoveu a formação de tecido de granulação e reepitelização, aproximando o modelo experimental do processo que ocorre em humanos (DUNN et al, 2013; GALIANO et al., 2004; REN; ZHOU; CHEN, 2012).

A revisão das suturas utilizadas para fixação dos anéis a pele dos ratos ao 7º dia e as trocas dos anéis aos 14º e 21º dias após a indução da queimadura permitiram acompanhar a redução da área da lesão, mantendo as suturas firmes. Um estudo descreveu que a maioria das suturas se soltaram da pele por volta do 5º dia pós-operatório de implante de anéis em subcutâneo de ratos (REN; ZHOU; CHEN., 2012). Além disso, os curativos oclusivos diários possibilitaram a inspeção contínua da lesão e dos anéis e sua proteção mecânica. Davidson et al. (2013) relatam que a utilização de curativos oclusivos é uma estratégia adequada para evitar danos aos anéis. Por fim, a influência da inflamação local produzida pelas suturas é minimizada pela distância entre estas e as bordas da ferida, como descrito por Dunn et al. (2013).

As diferenças morfométricas e macroscópicas no processo cicatricial entre os grupos controle e experimental foram observadas durante a fase proliferativa. Ao 7 DAI o grupo controle apresentou maior redução da área da queimadura e maior presença de crosta que o grupo experimental. Apesar da eutanásia acontecer no início da fase proliferativa (7DAI), esse momento é logo após a fase inflamatória e esta não tem a atividade de epitelização como característica. A redução da área da queimadura nos animais do grupo controle ao 7 DAI deve-se à contração da lesão, condição dificultada no grupo experimental pela presença do anel. Era esperado que durante a fase inflamatória a epitelização no grupo experimental não fosse acentuada. Trabalhos relatam que a pele solta dos murinos possibilita a cicatrização por contração, mais rápida que a epitelização (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014; DORSETT-MARTIN, 2004; GALIANO et al., 2004; REN; ZHOU; CHEN, 2012). Um estudo comparou a cicatrização de feridas excisionais em camundongos com e sem a utilização de anel estabilizador de silicone. Foi observado que as feridas que utilizaram o anel de estabilização foram maiores entre o 2º e 12º dias de cicatrização (REN; ZHOU; CHEN, 2012).

Ao final da fase proliferativa, ao 14 DAI da lesão, o grupo experimental apresentou maior redução da área total da queimadura. Essa redução não observada no grupo experimental ao início da fase proliferativa (7 DAI) e presente ao final (14 DAI) pode ter sido produzida por intenso processo de reepitelização estimulado pela fixação

do anel em torno da queimadura, ocorrido durante a fase proliferativa. A fase proliferativa é a responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita, sendo dividida em três subfases: reepitelização; fibroplasia e formação do tecido de granulação; e angiogênese (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). Se inicia aproximadamente ao 4º dia pós lesão e se estende até o término da segunda semana (14º dia, (CAMPOS; BORGES-FRANCO; GROUTH, 2007), exatamente o período observado entre as avaliações de 7 DAI e 14 DAI. Assim, a epitelização pode ter sido a responsável pela grande redução na área da queimadura no grupo com anel.

A partir do 14º dia após a queimadura os anéis maiores foram substituídos pelos menores, mantendo a estabilização o mais próximo possível da área da queimadura. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas morfométricas e macroscópicas entre o grupo controle e grupo experimental após 14 DAI.

Um estudo com queimaduras de espessura parcial profunda com 1 cm² produzidas em ratos Wistar indicou que as lesões ainda estavam abertas aos 28 dias (PEREIRA et al, 2012). Esses dados são semelhantes aos descritos aqui, pois ao 30DAI as feridas ainda estavam abertas e não houve diferença significativa entre os grupos no tempo de fechamento das lesões ($p = 0,107$). Deve-se considerar que neste estudo as lesões foram maiores (4 cm²) e mais profundas (espessura total) que no estudo de Pereira et al (2012).

A análise microscópica evidenciou maior presença de hiperemia (7DAI), hemorragia (14DAI) e infiltrado mononuclear (21DAI) no grupo controle que no experimental. O grupo experimental apresentou maior presença de fibroblastos que no grupo controle ao 30 DAI ($p=0,009$). Entretanto, ao ser realizada a análise mais precisa de quantificação indireta de miofibroblastos pela presença de α -actina, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Esse achado foi confirmado pela ausência de diferença na contração das feridas aos 30DAI.

O modelo proposto apresenta potenciais limitações, que incluem a inflamação local produzida pelas suturas. Entretanto, as suturas são fixadas relativamente distantes das bordas das feridas (DUNN et al, 2013). Outro estudo com anéis implantados relata que a maioria dos pontos se soltaram da pele por volta do 5º dia pós-operatório e apresentaram dificuldades para resuturar devido a contração que já havia acontecido (REN; ZHOU; CHEN, 2012). Esse problema foi contornado com a revisão dos pontos ao 7º dia após queimadura (5º após desbridamento e fixação do anel) e substituição dos anéis e suturas aos 14º e 21º dias após queimaduras. Outra limitação observada em

estudos relacionados incluem o dano ao material do anel, produzidos pelo próprio animal ou pela interação com o outro animal da gaiola. Davidson et al (2013) sugerem que esse problema pode ser atenuado com a utilização de curativos protetores, mas que a grande mobilidade do animal pode aumentar a taxa de insucesso do experimento. Neste estudo usamos cobertura primária e secundária em curativos realizados diariamente.

Modelos experimentais com técnicas padronizadas e reprodutíveis devem ser explorados para que os resultados de diferentes pesquisas e experimentos possam ser comparados de maneira científica. Isso ampliará a eficiência dos tratamentos e a base de conhecimento (DORSETT-MARTIN, 2004). Além disso, o conhecimento oriundo das pesquisas com modelos experimentais com animais é importante para a implementação da pesquisa clínica com seres humanos.

Conclusão

O modelo experimental proposto foi eficiente na produção da queimadura de espessura total por escaldamento e remoção da necrose por meio do desbridamento. A utilização do anel não influenciou no tempo de fechamento da lesão.

Referências

ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 17, p. 3241-55, 2014. DOI: 10.1007/s00018-014-1612-5

AL-WATBAN, F. A. H.; ANDRES, B. L. Effect of He-Ne laser (632,8 nm) and Polygen TM on CHO cells. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 18, n. 3, p. 145-50, 2000. DOI: 10.1089/clm.2000.18.145

BEHESHTI, A. et al. Comparison of topical sucralfate and silver sulfadiazine cream in second degree burns in rats. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 32, n. 4, p. 481-87, 2013. PMID: 23986207

BELDON, P.A. Basic science of wound healing. **Surgery**, v. 28, n. 9, p. 409-412, 2010. DOI: 10.1016/j.mpsur.2010.05.007

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Normativas do CONCEA: para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. 2. ed. Brasília, 2015.

CAI, E. Z. et al. Creation of Consistent Burn Wounds: A Rat Model. **Archives of Plastic Surgery**, v. 41, n. 4, p. 317-324, 2014. DOI: 10.5999/aps.2014.41.4.317

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROUTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007. DOI: 10.1590/S0102-67202007000100010

DAVIDSON, J. M.; YU, F.; OPALENIK, S. R. Splinting strategies to overcome confounding wound contraction in experimental animal models. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 4, p. 142-148, 2013. DOI: 10.1089/wound.2012.0424

DORSETT-MARTIN, W. A. Rat models of skin wound healing: a review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 6, p. 591-9. DOI: 10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x

DUNN, L. et al. Murine model of wound healing. **Journal of Visualized Experiments**, v. 75, n. e50265, p. 1-6, 2013. DOI: 10.3791/50265

FANTINATI, M. S. et al. Low intensity ultrasound therapy induces angiogenesis and persistent inflammation in the chronic phase of the healing process of third degree burn wounds experimentally induced in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 463-71, 2016. DOI: 10.1590/S0102-865020160070000006

GALIANO, R. D. et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 4, p. 485-92, 2004. DOI: 10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x

HETTIARATCHY, S.; DZIEWULSKI, P. ABC of burns: introduction. **British Medical Journal**, v. 328, n. 7452, p. 1366-68, 2004a. DOI: 10.1136/bmj.328.7452.1366

ISBI PRACTICE GUIDELINES COMMITTEE; STEERING COMMITTEE; ADVISORY COMMITTEE. ISBI Practice Guidelines for Burn Care. **Burns**, v. 42, n. 5, p. 953-1021, 2016. DOI: 10.1016/j.burns.2016.05.013

JACKSON, D. M. The diagnosis of the depth of burning. **British Journal of Surgery**, v. 40, n. 164, p. 588-596, 1953. DOI: 10.1002/bjs.18004016413

KAO, C. C.; GARNER, W. L. Acute burns. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, n. 7, p. 2482-92, 2000. PMID: 11242345

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares, parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003a. DOI:

MITSUNAGA JUNIOR, J. K. et al. Rat an experimental model for burns. A systematic review. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 417-23, 2012. DOI: 10.1590/S0102-86502012000600010

MORAES, J. M. et al. Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 4, p. 1169-1176, 2013. DOI: 10.1007/s10103-012-1213-1

NGUYEN, T. T.; GILPIN, D. A.; MEYER, N. A.; HERNDON, D. N. Current treatment of severely burned patients. **Annals of Surgery**, v. 223, n. 1, p. 14-25, 1996. PMCID: PMC1235059

PECK, M. D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: distribution and risk factors. **Burns**, v.37, n. 7, p. 1087-100, 2011. DOI: 10.1016/j.burns.2011.06.005

PEREIRA, D. S. T. et al. Development of animal model for studying second-degree thermal burns. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012: 460841, p. 1-8, 2012. DOI: 10.1155/2012/460841

REN, L.; ZHOU, B.; CHEN, L. Silicone ring implantation in an excisional murine wound model. **Wounds**, v. 24, n. 2, p. 36-42, 2012. PMID: 25876236

WASIAK, J. et al. Dressings for superficial and partial thickness burns (Review). **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, n. 3, p. 1-88, 2013. DOI: 10.1002/14651858.CD002106.pub4

XIAO-WU, W. et al. Effects of delayed wound excision and grafting in severely burned children. **Archives of Surgery**, v. 137, n. 9, p. 1049-54, 2002. DOI: 10.1001/archsurg.137.9.1049

6. DISCUSSÃO

O processo de cicatrização de queimaduras de espessura total experimentalmente induzidas em ratos Wistar foi avaliado considerando-se os parâmetros macroscópicos e microscópicos dos processos patológicos gerais. Ainda foi avaliada, dependendo do grupo, a proporção de distribuição de colágeno e/ou miofibroblastos das feridas.

Os dados do processo de cicatrização das queimaduras dos animais do grupo 1 (grupo controle – G1) serviram de referenciais para comparações com os dados dos demais animais. Todos os ratos deste estudo foram submetidos aos mesmos procedimentos de queimadura, desbridamento e curativos oclusivos diários.

Os curativos oclusivos foram realizados com intervalos de 24h, do dia de indução da queimadura (dia zero) ao dia previsto para a eutanásia. A utilização do curativo oclusivo visou manter úmido o ambiente da lesão, prevenindo dessecação e infecções e acelerando o processo cicatricial (ISBI, 2016; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; VUJANOVIC; VUJANOVIC, 2013; WASIAK et al., 2013). Além disso, evita danos físicos adicionais as lesões (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014; DORSETT-MARTIN, 2004; MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012). As diferenças entre os grupos consistiram apenas na utilização do agente tópico de escolha ou do anel estabilizador das feridas. No grupo controle foi utilizado o creme com sulfadiazina de prata 1% por tratar-se de medicamento amplamente utilizado no tratamento de queimaduras nos últimos 50 anos (BEHESHTI et al., 2013; FERREIRA; PAULA, 2013; FOX, 1968; WASIAK et al., 2013).

O método utilizado para produção das queimaduras nos ratos permitiu controle adequado da exposição da área a ser lesada nos procedimentos (MORAES et al., 2013). Em todos os animais a região dorsal exposta a água fervente apresentou aspecto branco nacarado após a queimadura, característica macroscópica de queimaduras de espessura total (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010). A lesão apresentou aproximadamente 4 cm². As queimaduras por contato com água quente em dorso de ratos são as mais comuns em estudos desse tipo (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014; DORSETT-MARTIN, 2004; MITSUNAGA JUNIOR et al., 2012),

pois em modelos experimentais de queimaduras a área exposta à lesão deve ser larga o suficiente para permitir a adequada execução, padronização e observação da queimadura. Entretanto, a lesão deve ser pequena o bastante para não ampliar o efeito sistêmico, consequência de queimaduras com comprometimento maior de 30% da superfície corporal total (KECK et al., 2009). Os ratos utilizados no presente estudo tinham peso entre 200g e 230g e apresentaram queimaduras com aproximadamente 1,1% a 1,2% da superfície corporal total. A proporção da área queimada foi calculada considerando-se o valor da constante k da fórmula de Meeh para cálculo da área da superfície corporal total de ratos Wistar com peso entre 195g e 240g, conforme os estudos realizados por Gouma et al. (2012).

O aspecto microscópico observado nas feridas dos animais submetidos as queimaduras confirmaram o comprometimento de epiderme, derme e hipoderme, caracterizando a lesão como de espessura total, com dano total de pele e subcutâneo. Esses achados microscópicos confirmam o modelo experimental de queimadura de espessura total, com exposição a água com temperatura de 95 °C (FANTINATI et al., 2016; MORAES et al., 2013).

O desbridamento por excisão tangencial foi realizado em todos os animais no segundo dia após a queimadura (48h), quando a lesão já estava definida. Foi retirada toda a necrose, preservando o tecido saudável adjacente. O desbridamento é considerado a abordagem padrão no tratamento de queimaduras de espessura total. Entretanto, desbridamentos realizados com mais de 48h da lesão aumentam significativamente a incidência de contaminação por bactérias e fungos e infecção quando comparados com procedimentos realizados em até 48h após a queimadura (ISBI, 2016; NGUYEN et al., 1996; XIAO-WU et al., 2002).

As queimaduras não são lesões uniformes e a profundidade não é estática e determinada logo após a agressão. A profundidade da lesão pode progredir em função dos diversos mecanismos fisiopatológicos vinculados a queimadura. A agressão térmica produz desnaturação proteica e ativação de mediadores inflamatórios. A liberação de substâncias oxidantes e proteases ampliam a morte de células da pele e células endoteliais. Isso pode produzir mais necrose e ampliar a gravidade da queimadura (KAO; GARNER, 2000). A natureza da lesão e a diversidade dos mecanismos fisiopatológicos da queimadura contribuem para que a lesão seja dinâmica e tenha

diferentes zonas (JACKSON, 1953). Assim, no presente trabalho, os desbridamentos foram realizados após a estabilização da queimadura e antes dos riscos aumentados de infecção.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizaram metodologia para indução da lesão por queimaduras e tratamentos semelhantes aos utilizados no presente estudo. Esse modelo apresentou muitas características do tratamento de queimaduras em humanos, como o desbridamento e a utilização de curativos oclusivos.

Para minimizar o fechamento da lesão por contração, o grupo 3 (grupo com anel – G3) foi submetido à colocação do anel, como artefato para proporcionar reepitelização da lesão. Para esse grupo foram desenvolvidos anéis em etileno-acetato de vinila (EVA), adaptados de Galiano et al. (2004), fixados com cola adesiva rápida e suturas descontínuas. Os anéis foram colocados imediatamente após o desbridamento para restrição da cicatrização por contração e indução da cura por epitelização. A fixação de anel ao redor de uma lesão excisional em camundongos diminuiu a contração e promoveu a formação de tecido de granulação e reepitelização, aproximando o modelo experimental do processo que ocorre em seres humanos (DUNN et al, 2013; GALIANO et al., 2004; REN; ZHOU; CHEN, 2012).

A revisão das suturas utilizadas para fixação dos anéis a pele dos ratos ao 7º dia e as trocas dos anéis aos 14º e 21º dias após a indução da queimadura permitiram acompanhar a redução da área da lesão, mantendo as suturas firmes. Um estudo descreveu que a maioria das suturas se soltaram da pele por volta do 5º dia pós-operatório de implante de anéis em subcutâneo de ratos (REN; ZHOU; CHEN., 2012). Além disso, os curativos oclusivos diários possibilitaram a inspeção contínua da lesão e dos anéis e sua proteção mecânica. Davidson et al. (2013) relatam que a utilização de curativos oclusivos é uma estratégia adequada para evitar danos aos anéis. Por fim, a influência da inflamação local produzida pelas suturas é minimizada pela distância entre estas e as bordas da ferida, como descrito por Dunn et al. (2013).

As características macroscópicas, morfométricas e microscópicas do processo cicatricial das queimaduras nos grupos controle (G1) e com anel (G3) foram comparadas. A comparação da análise macroscópica e morfométrica apresentou maior presença de crosta no grupo controle aos 7 DAI e maior redução da área total da queimadura observada no grupo controle ao 7 DAI e no grupo com anel ao 14 DAI. A

maior redução da área da queimadura nos animais do grupo controle ao 7 DAI deve-se à contração da lesão, condição dificultada no grupo experimental (G3) pela presença do anel. Era esperado que durante a fase inflamatória a epitelização no grupo com anel não fosse acentuada, pois essa é uma característica da fase proliferativa. Vários trabalhos descrevem que em animais de pele solta a cicatrização acontece por contração, mais rápida que a epitelização (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014; DORSETT-MARTIN, 2004; GALIANO et al., 2004; REN; ZHOU; CHEN, 2012). Outro estudo relata que entre o 2º e 12º dias de cicatrização as feridas excisionais com anel estabilizador são maiores que as feridas sem anel (REN; ZHOU; CHEN, 2012). Entretanto, ao final da fase proliferativa (14 DAI), o grupo com anel apresentou significativa redução da área da queimadura, provavelmente produzida por intenso processo de reepitelização estimulado pela fixação do anel em torno da queimadura. Como descrito na literatura, a fase proliferativa se caracteriza pela angiogênese, fibroplasia e reepitelização (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-FRANCO; GROUTH, 2007; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). A partir do 14º dia após a queimadura os anéis maiores foram substituídos pelos menores, mantendo a estabilização o mais próximo possível da área da queimadura. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na redução da área da queimadura entre os grupos controle (G1) e com anel (G3). Esse resultado difere dos encontrados por Galiano et al. (2004), que descrevem que as feridas com anéis demoraram mais para fecharem que as feridas sem anéis.

A análise microscópica evidenciou maior presença de hiperemia (7DAI), hemorragia (14DAI) e infiltrado mononuclear (21DAI) no grupo controle que no grupo com anel. O grupo com anel apresentou maior presença de fibroblastos que o grupo controle ao 30 DAI. Entretanto, ao ser realizada a análise mais precisa de quantificação de miofibroblastos pela presença de α -actina, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Esse achado pode ser confirmado pela ausência de diferença na contração das feridas aos 30DAI.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a influência dos anéis de estabilização no processo de cicatrização de queimaduras de espessura total em ratos. O desenvolvimento de modelos experimentais com técnicas padronizadas e reprodutíveis devem ser explorados para que os resultados de diferentes pesquisas e experimentos possam ser comparados de maneira científica. Isso ampliará a eficiência dos tratamentos

e a base de conhecimento (DORSETT-MARTIN, 2004). Além disso, o conhecimento oriundo das pesquisas com modelos experimentais com animais é importante para a implementação da pesquisa clínica com seres humanos.

Na comparação do processo cicatricial das queimaduras tratadas com creme de sulfadiazina de prata 1% (grupo controle – G1) ou creme Regederm® (grupo Regederm® – G2), a análise morfométrica evidenciou que as queimaduras tratadas com creme de sulfadiazina de prata 1% apresentaram maior contração da ferida durante a fase proliferativa (7 DAI) que o grupo tratado com Regederm®. Não houveram diferenças significativas na contração das feridas nos outros dias experimentais. Resultado semelhante foi apontado por um estudo que analisou a área de feridas excisionais no dorso de ratos tratados com o gel-creme derivado do látex da *Hevea brasiliensis* e ratos sem tratamento, observando que aos 14 dias não houveram diferenças significativas na redução das áreas das lesões entre os grupos (PENHAVEL et al., 2016).

As queimaduras do grupo tratado com Regederm® (G2) evoluiu com maior presença de crosta nas fases inflamatória (3 DAI) e proliferativa (7 DAI). Achados semelhantes foram descritos por estudo que comparou a cicatrização de lesões excisionais no dorso de três grupos de ratos tratados com solução salina 0,9%, extrato de *Aloe vera* ou Regederm® aos 7, 14 e 21 dias após lesão. O grupo tratado com Regederm® apresentou maior presença de crosta em todos os dias experimentais quando comparados aos grupos tratados com *Aloe vera* ou solução salina 0,9% (BRANDÃO et al., 2016). Estes resultados diferem de outro estudo, que demonstrou ação desbridante da biomembrana do látex da *Hevea brasiliensis* no tratamento de úlceras crônicas venosas quando comparado aos resultados do grupo controle, tratados com colagenase (FRADE et al., 2012). Assim, a ação desbridante atribuída à membrana não foi observada no gel-creme.

As maiores diferenças microscópicas dos processos patológicos gerais entre os grupos tratados com sulfadiazina de prata 1% e Regederm® foram observadas na fase inflamatória (3 DAI). Os animais tratados com Regederm® apresentaram mais sinais de inflamação aguda, como maior hiperemia e presença de infiltrado celular polimorfonuclear e mononuclear. A intensa atividade inflamatória induzida pelo látex da *Hevea brasiliensis* tem sido descrita na literatura. Um estudo observou denso

infiltrado inflamatório ocupando as camadas mais profundas da pele no segundo dia após implante subcutâneo de biomembrana no dorso de camundongos, relatando que a biomembrana atuou na fase inflamatória e recrutou células inflamatórias para o local do implante, especialmente polimorfonucleares (ANDRADE et al., 2011).

Entre os grupos estudados não foram observadas diferenças significativas na angiogênese, embora o grupo tratado com Regederm® tenha apresentado maior hiperemia ao 3 DAI e 21 DAI e maior hemorragia ao 7 DAI. Estudos tem demonstrado grande atividade angiogênica do látex (ANDRADE, 2011; BOLINA-MATOS et al., 2013; FERREIRA et al., 2009) e a resposta inflamatória causada pelas frações bioativas do látex provavelmente é a responsável pela atividade angiogênica observada na membrana corioalantóide de galinhas expostas ao Regederm® (ALMEIDA et al., 2014) e fibroplasia observada em camundongos (ANDRADE, 2011).

Estudo com derivado do látex demonstrou que a angiogênese ocorre por um determinado período de tempo, até que o objetivo funcional tenha sido atingido (FERREIRA et al., 2009). Angiogênese persistente ao longo da fase proliferativa, acompanhada de intenso infiltrado inflamatório, foram observados na pele de camundongos (ANDRADE, 2011). Entretanto, os trabalhos não têm relatado persistência da angiogênese ao longo da fase de remodelamento.

Um estudo que analisou os efeitos do gel-creme do látex da *Hevea brasiliensis* no processo cicatricial de lesões excisionais em ratos não encontrou estímulos angiogênico ou inflamatório quando comparados com o grupo sem tratamento (grupo controle). Assim, considerou-se que o gel-creme do látex da *Hevea brasiliensis* não interfere no processo cicatricial de lesões cutâneas agudas em ratos (PENHAVEL et al., 2016). Talvez isso tenha ocorrido pelas diferenças de formulação entre o Regederm® e a biomembrana do látex da *H. brasiliensis*. No processo de fabricação da biomembrana há adição de amônia como o único conservante do látex, utilizada logo após a extração. Uma composição de enxofre é então adicionada como único agente de cura. Em seguida o látex é polimerizado a baixas temperaturas em molde de vidro e o resultado é a biomembrana (MRUE et al., 2004). A composição do Regederm®, por sua vez, apresenta 25 substâncias além do soro derivado do látex da *Hevea brasiliensis*, dentre elas: óleo de girassol, óleo de *Camelina sativa*, óleo de oliva hidrogenado, ésteres de manteiga de karité e outros.

De maneira geral, os resultados encontrados neste estudo diferem de outros estudos, pois envolvem a utilização de derivados do látex no tratamento de queimaduras em ratos. A etiologia da lesão e doenças associadas são fatores que modificam a influência do látex no processo de cicatrização de lesões (FRADE et al., 2004). Além disso, os estudos com membrana corioalantóide e utilização de derivados do látex são executados com aves, o que pode limitar seu aproveitamento integral para mamíferos (ALMEIDA et al., 2014).

Os três grupos de ratos submetidos a queimadura de espessura total apresentaram feridas abertas aos 30 DAI. Um estudo com queimaduras de espessura parcial profunda com 1 cm² produzidas em ratos Wistar indicou que as lesões ainda estavam abertas aos 28 dias (PEREIRA et al, 2012). Esses dados são semelhantes aos apresentados aqui, pois ao 30DAI as feridas ainda estavam abertas e não houve diferença significativa entre os grupos no tempo de fechamento das lesões. Entretanto, deve-se considerar que neste estudo as lesões foram maiores (4 cm²) e mais profundas (espessura total) que no estudo de Pereira et al (2012). Outro estudo produziu queimaduras de espessura total com 4,15 cm² (1% da superfície corporal total) em ratos Wistar, semelhantes em profundidade, área e superfície corporal total atingida com as queimaduras realizadas nesta pesquisa. Os autores relatam que o processo de cicatrização foi acompanhado sem qualquer intervenção terapêutica e as queimaduras precisaram de 49 dias para completo fechamento da lesão (VENTER; MONTE-ALTO-COSTA; MARQUES, 2015).

O Regederm® foi comercialmente apresentado pelo fabricante como um acelerador do processo cicatricial indicado para o tratamento e cicatrização de úlceras cutâneas. Entretanto, não houve diferença significativa no tempo de fechamento de queimaduras tratadas com Regederm® ou com sulfadiazina de prata 1%.

7. CONCLUSÕES

O modelo experimental proposto foi eficiente na produção da queimadura de espessura total por escaldamento e remoção da necrose por meio do desbridamento. A utilização do anel não influenciou no tempo de fechamento da lesão.

O tratamento com Regederm® de queimaduras de espessura total experimentalmente induzidas em ratos apresentou maior atividade inflamatória na fase inicial do processo de cicatrização de lesões, porém não apresentou angiogênese e fibroplasia significativamente diferente das queimaduras dos animais tratados com creme com sulfadiazina de prata 1%.

REFERÊNCIAS

ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 17, p. 3241-55, 2014. DOI: 10.1007/s00018-014-1612-5

AKHOONDINASAB, M. R.; AKHOONDINASAB, M.; SABERI, M. Comparison of healing effect of *Aloe vera* extract and silver sulfadiazine in burn injuries in experimental rat model. **World Journal of Plastic Surgery**, v. 3, n. 1, p. 29-34, 2014. PMID: 25489521

ALMEIDA, L. M.; FLORIANO, J. F.; RIBEIRO, T. P.; MAGNO, L. N.; MOTA, L. S. L. S.; PEIXOTO, N.; MRUE, F.; MELO-REIS, P.; LINO JR, R. S.; GRAEFF, C. F. O. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility, assessment and angiogenic activity. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 25, n. 9, p. 2153-62, 2014. DOI: 10.1007/s10856-014-5255-8

AL-WATBAN, F. A. H.; ANDRES, B. L. Effect of He-Ne laser (632,8 nm) and Polygen TM on CHO cells. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 18, n. 3, p. 145-50, 2000. DOI: 10.1089/clm.2000.18.145

ANDRADE, T. A. M.; IYER, A.; DAS, P. K.; FOSS, N. T.; GARCIA, S. B.; COUTINHO-NETTO, J.; JORDÃO-JR, A. A.; FRADE, M. A. C. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, 2011. DOI: 10.1590/S0100-879X2011007500116

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005. DOI: 10.1590/S1516-93322005000100004

BEHESHTI, A. et al. Comparison of topical sucralfate and silver sulfadiazine cream in second degree burns in rats. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 32, n. 4, p. 481-87, 2013. PMID: 23986207

BESSEY, P. Q. et al. Synopsis of the 2013 annual report of the National Burn Repository. **Journal of Burn Care & Research**, v. 35, n. 2, p. S218-34, 2014. DOI: 10.1097/BRC.0000000000000080

BIONDO-SIMÕES, M. L. P. et al. Cicatrização de feridas: estudo comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 2, p. 74-78, 2006. DOI: 10.1590/S0100-69912006000200004

BOLINA-MATOS, R. S. et al. Efeitos da biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) em pele de ratos Wistar submetidos à lesão térmica corporal por escaldamento. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 12, n. 4, p. 270-7, 2013.

BRANDAO, M. L. et al. Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and *Aloe vera* extracts in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 570-577, 2016. DOI: 10.1590/S0102-865020160090000001

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Normativas do CONCEA: para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. 2. ed. Brasília, 2015.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, s. 7S, p. 1e-S-32e-S, 2006. DOI: 10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9

BRUSSELAERS, N. et al. Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity and mortality. **Critical Care**, v. 14, n. 5, R188, p. 1-12, 2010. DOI: 10.1186/cc9300

CAI, E. Z. et al. Creation of Consistent Burn Wounds: A Rat Model. **Archives of Plastic Surgery**, v. 41, n. 4, p. 317-324, 2014. DOI: 10.5999/aps.2014.41.4.317

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROUTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007. DOI: 10.1590/S0102-67202007000100010

CHAVES, D. A. et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n.2, p. 524-30, 2016. DOI: 10.1590/1983-084X/15_093

COSTA, G. O. P.; SILVA, J. A.; SANTOS, A. G. Perfil clínico e epidemiológico das queimaduras: evidências para o cuidado da enfermagem. **Ciência & Saúde**, v. 8, n. 3, p. 146-155, 2015. DOI: 10.15448/1983-652X.2015.3.21360

DAMY, S. B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal: aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-11, 2010. DOI: 10.1590/S0104-42302010000100024

DAVIDSON, J. M.; YU, F.; OPALENIK, S. R. Splinting strategies to overcome confounding wound contraction in experimental animal models. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 4, p. 142-148, 2013. DOI: 10.1089/wound.2012.0424

DOMINGOS, A. L.; TUCCI, S. JR.; GARCIA, S. B.; DE BESSA, S. JR.; COLOGNA, A. J.; MARTINS, A. C. Use of latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: biocompatibility, clinical and histological outcomes. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 35, n. 2, p. 217-24, 2009. PMID: 19409126

DORSETT-MARTIN, W. A. Rat models of skin wound healing: a review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 6, p. 591-9. DOI: 10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x

DUNN, L. et al. Murine model of wound healing. **Journal of Visualized Experiments**, v. 75, n. e50265, p. 1-6, 2013. DOI: 10.3791/50265

ELLISSON, D. L. Burns. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 273-85, 2013. DOI: 10.1016/j.ccell.2013.02.003

EMING, S. A.; MARTINS, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 265, p. 1-36, 2014. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009337

EVERS, L. H.; BHAVSAR, D.; MAILANDER, P. The biology of burn injury. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 9, p. 777-783, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x

FANTINATI, M. S. et al. Low intensity ultrasound therapy induces angiogenesis and persistent inflammation in the chronic phase of the healing process of third degree burn wounds experimentally induced in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 463-71, 2016. DOI: 10.1590/S0102-865020160070000006

FERREIRA, M. et al. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 3, p. 564-569, 2009. DOI: 10.1590/S0103-97332009000500010

FERREIRA, F. V.; PAULA, L. B. Sulfadiazina de prata versus medicamentos fitoterápicos: estudo comparativo dos efeitos no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 12, n. 3, p. 132-139, 2013.

FOX, C. L. Silver sulfadiazine – a new topical therapy for Pseudomonas in burn. **Archives of Surgery**, v. 96, n. 2, p. 184-8, 1968. PMID: 5638080

FRADE, M. A. C. et al. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **International Journal of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 238-240, 2001. PMID: 11422535

FRADE, M. A. C. et al. Management of diabetic skin wounds with a natural látex biomembrane. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 32, n. 4, p. 157-62, 2004.

FRADE, M. A. C.; ASSIS, R. V. C.; COUTINHO-NETTO, J.; ANDRADE, T. A. M.; FOSS, N. T. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 1, p. 45-51, 2012. DOI: 10.1590/S0365-05962012000100005

GALIANO, R. D. et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 4, p. 485-92, 2004. DOI: 10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x

GAWRYSZEWSKI, V. P. et al. Atendimentos decorrentes de queimaduras em serviços públicos de emergência no Brasil, 2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 4, p. 629-40, 2012. DOI: 10.1590/S0102-311X2012000400003

GOUMA, E. et al. A simple procedure for estimation of total body surface area and determination of a new value of Meeh's constant in rat. **Laboratory Animals**, v. 46, n. 1, p. 40-5, 2012. DOI: 10.1258/la.2011.011021

HETTIARATCHY, S.; DZIEWULSKI, P. ABC of burns: introduction. **British Medical Journal**, v. 328, n. 7452, p. 1366-68, 2004a. DOI: 10.1136/bmj.328.7452.1366

HETTIARATCHY, S.; DZIEWULSKI, P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. **British Medical Journal**, v. 328, n. 7453, p. 1427-1429, 2004b. DOI: 10.1136/bmj.328.7453.1427

HETTIARATCHY, S.; PAPINI, R. Initial management of a major burn: II, assessment and resuscitation. **British Medical Journal**, v. 329, n. 7457, p. 101-03, 2004. DOI: 10.1136/bmj.329.7457.101

IQBAL, T.; SAAIQ, M.; ALI, Z. Epidemiology and outcome of burns: early experience at the country's first national burns Centre. **Burns**, v. 39, n. 2, p. 358-62, 2013. DOI: 10.1016/j.burns.2012.07.011

ISBI PRACTICE GUIDELINES COMMITTEE; STEERING COMMITTEE; ADVISORY COMMITTEE. ISBI Practice Guidelines for Burn Care. **Burns**, v. 42, n. 5, p. 953-1021, 2016. DOI: 10.1016/j.burns.2016.05.013

IURK, L. K. et al. Evidências no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 3, p. 95-9, 2010.

JACKSON, D. M. The diagnosis of the depth of burning. **British Journal of Surgery**, v. 40, n. 164, p. 588-596, 1953. DOI: 10.1002/bjs.18004016413

JEWO, P. I.; FADEYIBI, I. O. Progress in burn research: a review of advances in burn pathophysiology. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. 28, n. 2, p. 105-15, 2015. PMID: 27252608

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-Polarization Method. **Histochemistry**, v.74, n. 1, p. 153-6, 1982. DOI: 10.1007/BF00495061

KAO, C. C.; GARNER, W. L. Acute burns. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, n. 7, p. 2482-92, 2000. PMID: 11242345

KECK, M. et al. Pathophysiology of burns. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 159, n. 13-14, p. 327-36, 2009. DOI: 10.1007/s10354-009-0651-2

LEITE, A. P. et al. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. **Revista Gaucha de Enfermagem**, v. 33, n. 3, p. 198-207, 2012. DOI: 10.1590/S1983-14472012000300026

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2006.09.007

MACEDO, A. C. et al. Estudo epidemiológicos dos pacientes internados na Unidade de Tratamento de Queimados do Conjunto Hospitalar de Sorocaba entre 2001 a 2008.

Revista Brasileira de Queimaduras, v. 11, n. 1, p. 23-5, 2012.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares, parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003a. DOI:

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares, parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-42, 2003b. DOI: 10.1590/S0365-05962003000500002

MILLER, A. C. et al. Silver sulfadiazine for the treatment of partial-thickness burns and venous stasis ulcers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 5, p. e 159-65, 2012. DOI: 10.1016/j.jaad2010.06.014

MITUNAGA JUNIOR, J. K. et al. Rat an experimental model for burns. A systematic review. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 417-23, 2012. DOI: 10.1590/S0102-86502012000600010

MONSTREY, S. et al. Assessment of burn depth and burn wound healing potential. **Burns**, v. 34, n. 6, p. 761-9, 2008. DOI: 10.1016/j.burns.2008.01.009

MORAES, J. M. et al. Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 4, p. 1169-1176, 2013. DOI: 10.1007/s10103-012-1213-1

MRUE, F. et al. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004. DOI: 10.1590/S1516-14392004000200010

MRUE, F. Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex: estudo experimental em cães. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em

Medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MRUE, F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

NGUYEN, T. T.; GILPIN, D. A.; MEYER, N. A.; HERNDON, D. N. Current treatment of severely burned patients. **Annals of Surgery**, v. 223, n. 1, p. 14-25, 1996. PMID: PMC1235059

OLIVEIRA, J. A. A. et al. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 5, p. 649-55, 2003. DOI: 10.1590/S0034-72992003000500010

PECK, M. D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: distribution and risk factors. **Burns**, v.37, n. 7, p. 1087-100, 2011. DOI: 10.1016/j.burns.2011.06.005

PENHAVEL, M. V. C.; TAVARES, V. H.; CARNEIRO, F. P.; SOUSA, J. B. Effect of *Hevea brasiliensis* latex sap gel on healing of acute skin wounds induced on the back of rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 048-053, 2016. DOI: 10.1590/0100-69912016001010

PEREIRA, D. S. T. et al. Development of animal model for studying second-degree thermal burns. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012: 460841, p. 1-8, 2012. DOI: 10.1155/2012/460841

REN, L.; ZHOU, B.; CHEN, L. Silicone ring implantation in an excisional murine wound model. **Wounds**, v. 24, n. 2, p. 36-42, 2012. PMID: 25876236

RODRIGUES, A. L. S. et al. Effectiveness of papain gel in venous ulcer treatment: randomized clinical trial. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 23, n. 3, p. 458-65, 2015. DOI: 10.1590/0104-1169.03812576

SCHIEFER, J. L. et al. Etiology, incidence and gender-specific patterns of severe burns in a German Burn Center – Insights of 25 years. **Burns**, v. 42, n. 3, p. 687-96, 2016. DOI: 10.1016/j.burns.2015.10.031

SCHMAUSS, D. et al. Treatment of secondary burn wound progression in contact burns: a systematic review of experimental approaches. **Journal of Burn Care & Research**, v. 36, n. 3, p. e176-e189, 2015. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000131

SMOLLE, C. et al. Recent trends in burn epidemiology worldwide: a systematic review. **Burns**, v. 43, n. 2, p. 249-257, 2016. DOI: 10.1016/j.burns.2016.08.013

STYLIANOU, N.; BUCHAN, I; DUNN, K. W. A review of the international Burn Injury Database (iBID) for England and Wales: descriptive analysis of burn injuries 2003-2011. **BMJ**, v. 5, n. 2, e006184, 2015. DOI: 10.1136/bmjopen-2014-006184

TOUSSAINT, J.; SINGER, A. J. The evaluation and management of thermal injuries: 2014 update. **Clinical and Experimental Emergency Medicine**, v. 1, n. 1, p. 8-18, 2014. DOI: 10.15441/ceem.14.029

VENTER, N. G.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; MARQUES, R. G. A new model for the standardization of experimental burn wounds. **Burns**, v. 41, n. 3, p. 542-7, 2015. DOI: 10.1016/j.burns.2014.08.002

VUJANOVIC, S.; VUJANOVIC, J. Bioresources in the pharmacotherapy and healing of burns: a mini-review. **Burns**, v. 39, n. 6, p. 1031-1038, 2013. DOI: 10.1016/j.burns.2013.03.016

WASIAK, J. et al. Dressings for superficial and partial thickness burns (Review). **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, n. 3, p. 1-88, 2013. DOI: 10.1002/14651858.CD002106.pub4

XIAO-WU, W. et al. Effects of delayed wound excision and grafting in severely burned children. **Archives of Surgery**, v. 137, n. 9, p. 1049-54, 2002. DOI: 10.1001/archsurg.137.9.1049

YOSHINO, Y. et al. The wound/burn guidelines – 6: Guidelines for the management of burns. **The Journal of Dermatology**, v. 43, n. 9, p. 989-1010, 2016. DOI: 10.1111/1346-8138.13288

YOUNG, A; MCNAUGHT, C. The physiology of wound healing. **Surgery**. v. 29, n. 10, p. 475-479, 2011.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Goiânia, 16 de junho de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO

Protocolo nº 22/14

I. IDENTIFICAÇÃO:

Título do projeto: “A influência do látex da *Hevea brasiliensis* no processo de cicatrização de queimaduras de espessura total em ratos e camundongos”

Pesquisador Responsável:

Ruy de Souza Lino Júnior - IPTSP/UFV -

Pesquisadora Participante:

Renato de Castro Spada Ribeiro – Mestrado – Elaboração e execução

Fátima Mrue – Doutorado - Elaboração e execução

Mara Rúbia Nunes Celes – Doutorado - Análise de citocinas

Milton Adriano Pelli Oliveira – Doutorado – Veterinário responsável pelos animais

Marcelo Silva Fantinati – Mestrado – Execução do projeto

Diego Eterno de Oliveira Mendonça – Graduação - Execução do projeto

Vânia Beatriz Lopes Moura – Técnica laboratório

Local de realização: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP

II - Parecer do CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás **Aprovou** o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFV, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

III - Data da reunião: 16/06/2014

Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFV

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Sambaíba (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufv@gmail.com

Anexo 2 – Comprovante de submissão do artigo

International Journal of Experimental Pathology

INTERNATIONAL JOURNAL OF **Experimental
Pathology**

Experimental full thickness burning wound induced in rats – comparison of the healing process after treatment with Regederm® and silver sulfadiazine

Journal:	<i>International Journal of Experimental Pathology</i>
Manuscript ID:	IJEP-2017-07-2603
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	25-Jul-2017
Complete List of Authors:	Spada, Renato; Tropical Pathology and Public Health Post-graduate programme, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goias, Goiania, Goiás, Brazil Ribeiro, Sara; Universidade Estadual de Goias Tomaz, Helen; Universidade Estadual de Goias Mrué, Fatima; Federal University of Goias Vinaud, Marina; Federal University of Goias, Parasitology Lino-Junior, Ruy; Federal University of Goias, Pathology
Keywords:	Burning wound, healing process, Regederm®, 1% silver sulfadiazine, rats, experimental model

SCHOLARONE™
Manuscripts