



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

MAURILIO TOSCANO DE LUCENA

**MEMBRANA DO BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇÚCAR NO
TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS INDUZIDAS, EM RATOS**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Orientador-Interno:

José Lamartine de Andrade Aguiar

Profº Associado do Depto. de Cirurgia, CCS-UFPE

Orientadores-Externos:

Mario Ribeiro de Melo Júnior

Profº do Depto. de Patologia, CCS-UFPE

Mariana Montenegro de Melo Lira

Profª do Depto. de Patologia, CCS-UFPE

Linha de Pesquisa

Biopolímero da cana-de-açúcar

Convênio UFRPE/UFPE,

D.O.U. 03.11.2009 - Seção 3 pg. 54

RECIFE/PE
2012

L935m Lucena, Maurilio Toscano de.
 Membrana do biopolímero da cana-de-açúcar no tratamento de
 feridas cutâneas induzidas, em ratos / Maurilio Toscano de Lucena. p
 Recife: O autor, 2012.
 xv + 83 f.: il. ; 30 cm.

 Orientador: José Lamartine de Andrade Aguiar.
 Tese (doutorado) p Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, 2012.
 Inclui bibliografia e anexos.

 1. Biopolímeros. 2. Cicatrização de feridas. 3. Membranas. 4. Ratos.
 5. Cana-de-açúcar. I. Aguiar, José Lamartine de Andrade (Orientador).
 II. Título.

617.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-080)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Relatório da Defesa de Tese de MAURÍLIO TOSCANO DE LUCENA, Aluno de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia Clínica e Experimental.

Às oito horas do dia vinte e sete de março de dois mil e doze, no Auditório (térreo) do Prédio das Pós Graduações do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa de Tese de Maurílio Toscano de Lucena, para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr. FÁBIO DE OLIVEIRA VILAR, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. JOSEMBERG MARINS CAMPOS, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr^a. SILVANA MARIA DE MORAIS CAVALCANTI, Doutora do Departamento de Dermatologia da UPE; Dr. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO Doutor do Departamento de Patologia CCS/UFPE; Dr^a. PALOMA LYS DE MEDEIROS, Doutora do Departamento de Histologia e Embriologia do CCS/UFPE; e, para suplentes: interno: SILVIO DA SILVA CALDAS NETO, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, finalmente, externo, Dr. EUCLIDES DIAS MARTINS FILHO, Doutor da Universidade Federal de Pernambuco; tendo, como orientador interno, o Dr. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A Tese apresentada por MAURÍLIO TOSCANO DE LUCENA versou sobre **“APLICAÇÃO DA MEMBRANA DE BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO CONDUTOR DE CÉLULAS EPITELIAIS NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS”**. Após, a explanação de 30(Trinta) minutos pelo candidato, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com data show, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Prof. Dr. FÁBIO DE OLIVEIRA VILAR (Presidente da Banca Examinadora), Prof. Dr. JOSEMBERG MARINS CAMPOS, Prof^a. Dr^a. SILVANA MARIA DE MORAIS CAVALCANTI; Prof. Dr. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO; Prof^a. Dr^a. PALOMA LYS DE MEDEIROS; todas as arguições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. FÁBIO DE OLIVEIRA VILAR (Presidente da Banca Examinadora), menção “Aprovado”, Prof. Dr. JOSEMBERG MARINS CAMPOS, menção “Aprovado”, Prof^a. Dr^a. SILVANA MARIA DE MORAIS CAVALCANTI, menção “Aprovado”, Prof Dr. NICODEMOS TELES PONTES FILHO, menção “Aprovado”, Prof^a. Dr^a. PALOMA LYS DE MEDEIROS, menção “Aprovado”. Nada mais havendo a registrar, foram encerrados os trabalhos e, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Isabela Nogueira Pimentel, Técnica em assuntos Educacionais, assinado depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 27 de Março de 2012.

Prof. FÁBIO DE OLIVEIRA VILAR
Prof. JOSEMBERG MARINS CAMPOS
Prof^a. SILVANA MARIA DE MORAIS CAVALCANTI
Prof. NICODEMOS TELES PONTES FILHO
Prof^a. PALOMA LYS DE MEDEIROS
Sra. ISABELA NOGUEIRA PIMENTEL (Técnica em assuntos educacionais)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fábio de Oliveira Vilar

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Mauro Lucena de Oliveira e Teresinha Pinto Toscano de Lucena**, à minha avó **Mariinha**, que hoje fazem parte das estrelas do firmamento, e de longe iluminam meu caminho .

À minha querida esposa **Sylvania Santos** pela compreensão e apoio durante todas as fases da elaboração desta tese e, principalmente, por levar no ventre meu maior tesouro.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. *Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar*, pela preciosa orientação em todas as etapas deste trabalho. Exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof^o *Mário Ribeiro*, pela coorientação e prestimosa ajuda durante todo o processo de elaboração da tese.

À Prof^a *Mariana Lira*, pelas análises histológicas.

À Prof^a *Célia Castro*, pelas sugestões e por disponibilizar o laboratório de células do Lika.

Ao estudante de Medicina *Leonardo Cavalcanti*, pelo seu comprometimento e indispensável ajuda nos experimentos.

À Prof^a *Paloma Lys de Medeiros*, pela gentileza de permitir a realização das fotos digitais das preparações histológicas.

Ao Prof. *Dr. Luciano Tavares Montenegro*, pela realização da imunoistoquímica.

À Dra. *Adriana Ferreira* e ao Dr. *José Joaquim Alves*, médicos veterinários, e aos funcionários Paulo, Dôra e Lourdes, do Núcleo de Cirurgia Experimental, pelas suas contribuições na realização dos experimentos.

A *Sidcley Bernardino*, técnico de laboratório responsável pela confecção das lâminas para o estudo histológico.

A *Isabela*, secretária do Programa de Pós-graduação em Cirurgia pela organização administrativa.

Às irmãs *Márcia* e *Mércia*, pela formatação da tese e sugestões.

*"Se você pensa que pode ou sonha
que pode, comece. Ousadia tem
genialidade, poder e magia.
Ouse fazer e o poder lhe será dado."*

(Goethe)

RESUMO

Introdução: A pele é frequentemente exposta a traumatismos que podem provocar soluções de continuidade. Quando a perda cutânea é extensa, ocorre um retardo na cicatrização decorrente do processo de organização da ferida e da lenta atividade de reparação das células epiteliais. A utilização de um curativo com função de impermeabilizar a ferida e servir de guia na migração das células epiteliais poderia resultar em proteção, maior velocidade de epitelização e conforto para o paciente. O biopolímero da cana-de-açúcar é um polissacarídeo atóxico e biocompatível, obtido pela síntese de bactérias Gram negativas do gênero *Zoogloea* pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, a partir do melaço da cana-de-açúcar, que pode exercer função transitória de protetor da ferida e guia para migração de células.

Objetivo: Avaliar a eficácia da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas excisionais induzidas, em ratos.

Material e Métodos: Foram utilizados 40 ratos da raça *Wistar*, de ambos os gêneros, nos quais foram confeccionadas feridas cutâneas pela excisão de dois retalhos de espessura total da pele, na região dorsal. Por sorteio, em uma das feridas, foi aplicada membrana do biopolímero da cana-de-açúcar (grupo experimental) e, na outra, foi realizado curativo convencional, com lavagem com soro fisiológico (grupo controle). Os animais foram submetidos a eutanásia no 7º, 14º, 21º e 40º dias de pós-operatório, para a coleta de material das feridas e cicatrizes para estudo histopatológico e imunoistoquímica. Avaliaram-se a intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da fibrose, da fibroplasia e da crosta. Obtiveram-se fotografias digitais das preparações histológicas para determinação da espessura epitelial e contagem do número de vasos neoformados.

Resultados: O tempo de cicatrização completa, observado clinicamente, não diferiu entre as feridas que receberam a membrana (21 dias) e aquelas que não receberam (20 dias), permanecendo a membrana aderida ao leito cruento por um período médio de seis dias. Na comparação das imagens digitalizadas não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes no que se refere à área e ao diâmetro médio das áreas cicatriciais, nos momentos avaliados (2º, 7º e 14º dias de pós-operatório), assim como não houve diferença do ponto de vista estatístico, em relação aos parâmetros histopatológicos avaliados nos grupos experimental e controle, apesar de ter sido observado uma menor intensidade do infiltrado inflamatório polimorfonuclear e da fibroplasia, além de uma menor contagem do número de vasos nas áreas cicatriciais das feridas que receberam a membrana.

Conclusão: Conclui-se que as feridas onde foi aplicada a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar apresentaram, ao estudo histopatológico e morfométrico, características de um processo cicatricial completo e estável, em comparação com aquelas que não receberam a membrana.

Palavras-Chave: Biopolímeros, membranas, cicatrização de feridas, cana-de-açúcar, células epiteliais, ratos.

ABSTRACT

The skin is an organ that is frequently exposed to trauma that may lead to solutions of continuity. In skin trauma, when the loss of tissue is substantial, a delay in healing occurs as a result of the organization of the wound healing process and the slow rate of reproduction of the epithelial cells. The use of a dressing to impermeabilize the wound and serve as a conduit for the epithelial cells could result in protection against trauma, a speedier epithelization and greater comfort for the patient. The sugarcane biopolymer is an atoxic biocompatible polysaccharide, obtained from the synthesis of the Gram-negative bacteria of the genus *Zoogloea* belonging to the *Pseudomonadaceae* family, from the molasses of the sugarcane, which can perform the transitory function of a wound protector and cell conduit. The aim of the use of a membrane of the sugarcane biopolymer in the treatment of excisional wounds in rats was to evaluate the conducting activity of the epithelial cells, the degree of protection of the wound and the reduction in healing time. Forty *Wistar* rats of both sexes were used, in which the skin lesions were reproduced by excising two total thickness flaps from the skin of the dorsal region. A membrane of the biopolymer was applied on one of the flaps from the study group, chosen by draw, and a conventional dressing with lavage using saline solution performed on a flap that served as the control group. The clinically observed total healing time of the two lesions was practically the same (21 days with the membrane and 20 days without the membrane), and the membrane remained adhered to the exposed wound bed for a mean duration of six days. A comparison of the digitalized images likewise failed to show any statistically significant differences with regard to the area and mean diameter of the lesions at the times of evaluation (postoperative days 2, 7 and 14). The animals were sacrificed on the 7th, 14th, 21st and 40th days after surgery for the collection of the material from the wound and scars for histopathology and immunochemistry studies. Evaluations were made of the intensity of the polymorphonuclear and lymphonuclear inflammatory infiltrates, the fibrosis, the fibroplasia and the crust. Digital photographs were obtained from the histological preparations for determination of the thickness of the epithelium and the neoformed vessel count. No statistically significant differences were found between the parameters evaluated in the experimental and control groups, despite the lower intensity of the polymorphonuclear inflammatory infiltrate and fibroplasia, as well as the lower number of vessels in the scar tissue of the lesions to which the membranes were applied. It is concluded that the wounds to which the sugarcane membrane was applied, presented, on the histology and morphometric studies, features of a complete and stable healing process as compared with those which did not receive the membrane.

Key Words: Biopolymers, membranes, wound healing, sugarcane, epithelial cells, rats.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA	biopolímero da cana-de-açúcar
DAB	diaminobenzidina tetrahidrocloreto
EGF	fator do crescimento epidérmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	fator básico do crescimento fibroblástico
HE	hematoxilina-eosina
INFLM	infiltrado inflamatório linfomononuclear
INFPM	infiltrado inflamatório polimorfonuclear
NCE	Núcleo de Cirurgia Experimental
p.o.	pós-operatório
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
TGF- α	fator transformador do crescimento α
TGF- β	fator transformador do crescimento β
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
USA	<i>United States of America</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparações das médias das áreas e diâmetros médios (em <i>pixels</i>), do maior diâmetro das feridas fixadas (em milímetros) e do tempo de cicatrização (em dias) das áreas cicatriciais entre os grupos.	32
Tabela 2	Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais submetidos à eutanásia no 7º p.o.	34
Tabela 3	Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais submetidos à eutanásia no 14º p.o.	34
Tabela 4	Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais submetidos à eutanásia no 21º p.o.	35
Tabela 5	Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais submetidos à eutanásia no 40º p.o.	35
Tabela 6	Comparação dos valores relativos à extensão do epitélio e às médias da espessura epitelial e do número de vasos das áreas cicatriciais das feridas do grupo controle e experimental nos quatro momentos de pós-operatório avaliados.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Histologia da pele humana.	06
Figura 2	Demarcação dos retalhos cutâneos no dorso dos animais.	22
Figura 3	Aposição da membrana fenestrada do biopolímero da cana-de-açúcar numa das feridas e curativo de proteção.	23
Figura 4	Membrana fenestrada do biopolímero da cana-de-açúcar vedada em embalagem de acetato de poliéster em álcool isopropílico em solução aquosa e embalada em papel grau cirúrgico para esterilização em radiação gama.	24
Figura 5	Suporte para fixação da câmera digital.	24
Figura 6	Determinação da área (A) e dos diâmetros longitudinal (B) e transversal (C) das feridas através do programa de análise digital de imagens - ImageJ.	25
Figura 7	Determinação do maior diâmetro das feridas com auxílio de paquímetro digital, após fixação em formol.	26
Figura 8	Câmera (Moticam 1000 de 1,3 Mega Pixel) acoplada a um microscópio óptico (Motic BA 200) e a um computador com o software <i>Motic Images Plus 2.0ML</i> .	28
Figura 9	Determinação da espessura epitelial (A) e contagem dos vasos (B) na área cicatricial utilizando o programa de análise digital de imagens - ImageJ (aumento de 100x e 400x respectivamente, coloração HE).	29
Figura 10	Imunoistoquímica com anticorpos contra citoqueratina 14 evidenciando área de re-epitelização em animal submetido a eutanásia no 21º pós-operatório de implante da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar (aumento de 400x).	36
Figura 11	Queratinócitos marcados por imunoistoquímica utilizando anticorpos contra citoqueratina 14 em área de re-epitelização em animal submetido a eutanásia no 21º pós-operatório de implante da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar (aumento de 1000x).	36

- Figura 12** Achados histopatológicos das áreas cicatriciais em animal submetido à eutanásia no 7º p.o., em A, área cicatricial deferida que não recebeu a membrana, em B, área cicatricial deferida que recebeu a membrana, no mesmo animal (coloração H.E. 400x). 38
- Figura 13** Achados histopatológicos das áreas cicatriciais em animal submetido à eutanásia no 14º p.o., em C, área cicatricial deferida que não recebeu a membrana, em D, área cicatricial deferida que recebeu a membrana, no mesmo animal (coloração H.E. 400x). 38
- Figura 14** Achados histopatológicos das áreas cicatriciais em animal submetido à eutanásia no 21º p.o., em E, área cicatricial deferida que não recebeu a membrana, em F, área cicatricial deferida que recebeu a membrana, no mesmo animal (coloração H.E. 400x). 39
- Figura 15** Achados histopatológicos das áreas cicatriciais em animal submetido à eutanásia no 40º p.o., em G, área cicatricial deferida que não recebeu a membrana, em H, área cicatricial deferida que recebeu a membrana, no mesmo animal (coloração H.E. 400x). 39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Comparação das características cutâneas entre o rato e o ser humano.	11
Quadro 2	Aplicação da celulose microbiana sintetizada pela bactéria <i>Acetobacter xylinum</i> na cicatrização cutânea	15
Quadro 3	Categorização das variáveis relacionadas a cicatrização cutânea	27

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE QUADROS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Apresentação do problema	01
1.2 Justificativa	03
1.3 Objetivos	03
1.3.1 Objetivo geral	03
1.3.2 Objetivos específicos	03
2 REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1 Feridas cutâneas	04
2.2 Aspectos morfofuncionais da pele	05
2.3 Aspectos celulares e moleculares da cicatrização	07
2.4 Escolha do animal	10
2.5 Polímeros aplicados à saúde	13
2.6 Curativos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Animais de experimentação	19
3.2 Seleção dos grupos	19
3.3 Procedimento cirúrgico	19
3.4 Confeção do biopolímero	20
3.5 Avaliação clínica	23
3.6 Avaliação macroscópica e histológica	24
3.7 Metodologia da imunoistoquímica	26
3.8 Análise estatística	30
3.9 Considerações éticas	30

4 RESULTADOS	31
4.1 Observação clínica pós-operatória	31
4.2 Avaliação macroscópica	31
4.3 Avaliação microscópica	32
5 DISCUSSÃO	40
5.1 Material e Método	40
5.1.1 Material	40
5.1.2 Método	42
5.2 Resultados	42
6 CONCLUSÃO	46
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE	59
APÊNDICE A – Artigo original da Tese	59
ANEXOS	83
Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Animais	83



INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

A pele é frequentemente exposta a traumatismos que podem provocar soluções de continuidade; quando a perda de tecido epitelial é extensa, ocorre um retardo na cicatrização decorrente do lento processo de reparação celular cutânea¹.

A capacidade de reparação tecidual é um fenômeno observado nos seres vivos e de grande importância para sua sobrevivência quando ocorrem lesões acidentais ou cirúrgicas. A cicatrização dos tecidos e órgãos se constitui num processo biológico complexo, essencial para manter a integridade do organismo, porém ainda não totalmente compreendido².

Feridas lacerantes, úlceras, queimaduras, ressecções de pele extensas no tratamento de neoplasias e correções cirúrgicas de defeitos cutâneos exigem tratamento especializado para se obter retorno funcional e anatômico da região. Em extensas perdas cutâneas ocorre retardo ou até mesmo impossibilidade de aproximação das margens epiteliais da lesão, necessitando, em muitas ocasiões, da confecção de retalhos para se reparar a área desepitelizada ou aguardar a cicatrização por segunda intenção, que é um processo mais lento, produzindo, comumente, cicatrizes pronunciadas, com retração e com aumento nos custos do tratamento¹.

O desenvolvimento de um substituto de pele adequado poderia constituir um impacto positivo no cuidado destes pacientes. O substituto adequado para a pele deve desempenhar imediatamente a função da derme e epiderme perdidas, porém, o substituto ideal ainda não foi desenvolvido³.

Atualmente, tem havido interesse pelo uso da celulose de origem bacteriana. Algumas bactérias gram-negativas, tal como o *Acetobacter xylinum*, têm a capacidade de produzir celulose⁸⁷. Essa produção se dá na forma de filamentos extracelulares que rapidamente se agregam em microfibrilas celulósicas formando uma película^{82,88}. Uma das aplicações potenciais para a celulose bacteriana inclui a pele artificial^{82,87-89}.

O biopolímero da cana-de-açúcar (BCA) é um polissacarídeo que foi desenvolvido na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina – UFRPE⁴ e vem sendo aplicado em diferentes ensaios desenvolvidos no Núcleo de Cirurgia Experimental do Hospital das Clínicas da UFPE, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami e Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE. O polissacarídeo é um material novo, de estrutura química polimérica, obtido por síntese biotecnológica, a partir do melaço da cana-de-açúcar.

O biopolímero *in natura*, ainda com açúcares residuais, foi inicialmente empregado no tratamento de feridas acidentais em animais domésticos, resultando em aumento do tecido de granulação, controle da infecção e redução do tempo de cicatrização⁵. Recentemente, o grupo de pesquisa da UFPE em biopolímero da cana-de-açúcar desenvolveu um processo de tratamento para redução dos açúcares residuais do biopolímero, obtendo um produto puro, constituído unicamente de açúcares e ácido glicurônico polimerizados. Assim, obtem-se, elasticidade, resistência à tração, flexibilidade e ainda pode ser modelado em diferentes formas, características físico-químicas fundamentais para a confecção de próteses para implantes biológicos⁴.

O produto apresenta baixo nível de citotoxicidade, determinada por meio do índice de adesividade de macrófagos, de morte celular e de produção de óxido nítrico através de ensaios *in vitro*, caracterizando-o como um material biocompatível^{6,7}.

Em diferentes aplicações *in vivo*, o biopolímero apresentou características adequadas de tolerabilidade e compatibilidade⁸, como, por exemplo, no tratamento de perfurações crônicas da membrana timpânica, miringoplastia, em *Chinchilla laniger*⁹, na reconstrução ureteral¹⁰ e como remendo em arterioplastias femorais, em cães¹¹.

Demonstrou-se também, através de estudo realizado em ratos, nos quais foram aplicadas membrana de BCA e tela de polipropileno no peritônio parietal, que não havia diferença significativa quanto à formação de aderência com o epíploon e alças intestinais e a resposta inflamatória entre os dois tipos de materiais⁴.

1.2 Justificativa

A proposta de utilização da membrana do BCA no tratamento de feridas excisionais interessando a pele e o tecido celular subcutâneo no dorso de ratos objetivou oferecer proteção às feridas, servir de guia para migração de células epiteliais, promover e acelerar o processo de cicatrização. A membrana do biopolímero é constituída por polissacarídeo não aminado, característica que não induz resposta antigênica, além de apresentar boa aderência ao leito das feridas, capacidade de ser utilizado por tempo prolongado, adaptando-se aos contornos das mesmas, baixo custo, fácil armazenamento e manuseio, durável, flexível e resistência ao estiramento.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas excisionais induzidas, em ratos.

1.3.2 Objetivos específicos

- ❖ Comparar clinicamente a cicatrização das feridas cutâneas tratadas com a membrana do BCA com a cicatrização espontânea por segunda intenção;
- ❖ Avaliar, através da morfometria digital e da histopatologia: o diâmetro médio e a área total das feridas, a proliferação vascular, a presença de infiltrados inflamatórios linfomononuclear e polimorfonuclear, a fibroplasia, a fibrose, a crosta e a re-epitelização nos grupos controle e experimental;
- ❖ Confirmar a presença de queratinócitos na área cicatricial, utilizando técnica de imunoistoquímica.



REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Feridas cutâneas

As soluções de continuidade da pele promovem a quebra da barreira de proteção, expondo os tecidos a invasão bacteriana e perda de fluidos vitais¹².

As feridas agudas podem se originar de traumas como queimaduras, acidentes com perda de tecido cutâneo, cirurgias após coleta de enxertos cutâneos para cobrir áreas de ressecção de melanoma e de hemangiomas congênitos da infância, desbridamentos extensos e grandes defeitos da parede abdominal após ressecções em que se faz necessário a peritoneostomia. Além disso, as lesões cutâneas podem ser crônicas, quando se associam a doenças como insuficiência vascular, úlceras de pressão, diabetes mellitus, esclerose sistêmica, anemia e desnutrição¹³.

Um dos graves problemas relacionados ao retardo da cicatrização de feridas cutâneas e que constitui importante questão de saúde pública mundial são as úlceras dos pés diabéticos. Este tipo de agravo à saúde afeta tanto o indivíduo quanto a sociedade, com implicações financeiras e sociais. Segundo fontes dos Estados Unidos, 15,5% da população mundial com idade superior a 30 anos é composta de diabéticos, dos quais cerca de 15% desenvolvem úlceras de difícil cicatrização ao longo da vida, principalmente quando localizadas nos membros inferiores. Estima-se que 6% das internações hospitalares relacionadas ao diabetes mellitus são consequência dessas úlceras e, em caso de amputação, o tempo médio de internação é de cerca de três semanas, gerando, para o sistema de saúde, despesas extras que variam de U\$ 8.000,00 a U\$ 12.000,00/paciente. No Brasil, estima-se a existência de dois milhões de casos, entre os aposentados e os que recebem auxílios-doença em função do diabetes¹⁴.

Os custos dos tratamentos de doenças relacionadas à deficiência cicatricial aumentam a importância de estudos em busca de medicamentos e curativos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo por objetivo acelerar o processo de cicatrização. Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados objetivando identificar substâncias capazes de favorecer o processo de reparo. Também a busca por substâncias com atividade angiogênica tem sido intensa, por seu grande

potencial de aplicação clínica. Dentre as características das substâncias com ação direta no processo de reparo, destacam-se alguns fatores de crescimento que, quando aplicados topicamente sobre a ferida, demonstram boa capacidade de acelerar o reparo tecidual, em experimentos animais¹⁵⁻¹⁷. Nesse grupo, merece destaque o REGRANEX[®], produto à base de fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), recombinante humano que interfere diretamente, de maneira a favorecer o processo de reparo, apresentando bons resultados na cicatrização de úlceras de pacientes diabéticos^{17,18}. No entanto, são curativos de alto custo e, por essa característica, se encontram distantes da realidade socioeconômica da maioria da população portadora de úlceras crônicas. Outras substâncias contendo agentes enzimáticos, como as pomadas à base de DNase e collagenase, atuam promovendo o debridamento da ferida¹⁹ e auxiliam, dessa forma, o curso da restauração tecidual de maneira discreta e indireta. Estas últimas, embora largamente utilizadas na prática clínica, apresentam baixa eficácia na cicatrização de feridas crônicas²⁰.

2.2 Aspectos morfofuncionais da pele

A pele, o maior órgão do corpo dos vertebrados, com aproximadamente 1/10 da massa corpórea, é composta de epiderme e derme, com uma complexa rede neural e vascular. Uma terceira camada, a hipoderme, é formada principalmente de tecido adiposo e de uma camada de tecido conectivo frouxo (Figura 1). Estas três camadas desempenham um importante papel na proteção do organismo contra agressões mecânicas, químicas ou biológicas que podem resultar na formação de feridas²¹.

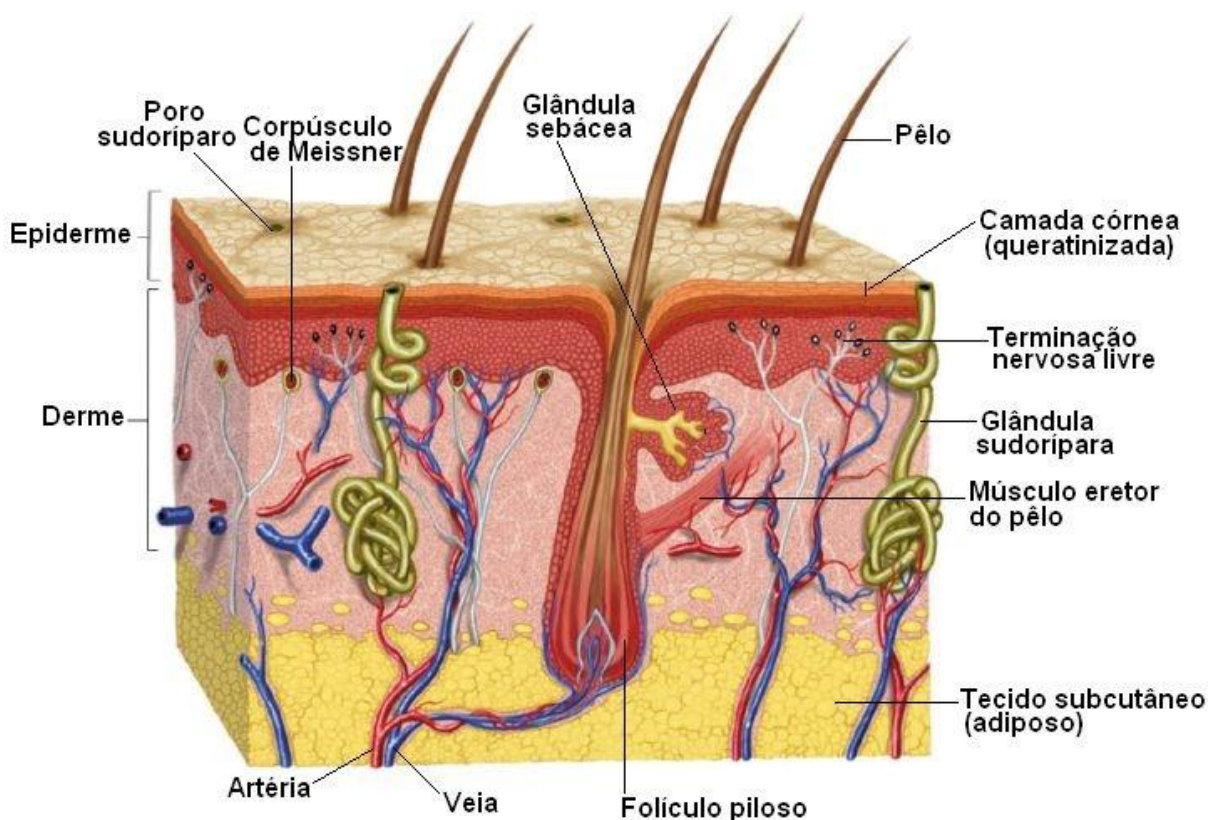


Figura 1. Histologia da pele humana

(Disponível em: <http://www.afh.bio.br/sentidos/img/sentidos%20pele.jpg>).

A epiderme, o componente mais externo da pele, é uma camada delgada, mas que possui espessura suficiente para atuar como barreira protetora, composta por um tipo particular de células epiteliais – os queratinócitos. Outros tipos celulares presentes na epiderme são: os melanócitos e as células de Langerhans e de Merkel, responsáveis por funções especializadas importantes. A epiderme é morfologicamente dividida em diversas camadas ou estratos. No sentido de baixo (mais internamente) para cima (mais externamente) essas camadas são: estrato basal ou germinativo (camada de células basais), estrato espinhoso (camada de células espiculadas), estrato granuloso (camada de células granulares), estrato *lucidum* (camada clara ou transparente) e estrato córneo (camada de células córneas). Os queratinócitos, originados na camada basal, onde ocorre a proliferação celular, deslocam-se em direção ascendente para a superfície externa através de um processo denominado diferenciação epidérmica. Durante este “turn-over”, os queratinócitos mudam sua estrutura e função fisiológica, num ciclo que dura aproximadamente 28 dias²¹⁻²³.

A epiderme dos mamíferos, junto com os seus anexos (pelos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas), mantêm a homeostase através da constante reciclagem das células da membrana basal. A epiderme é exposta constantemente a radiação ultravioleta e o efeito resultante é um dos fatores contribuintes para a constante descamação de células do estrato córneo, que são substituídas por células que migram a partir da membrana basal^{21,22}.

A derme, situada imediatamente abaixo da epiderme, constitui a sustentação da pele, fornecendo energia e nutrição, através de sua rica vascularização. É composta por colágeno com algumas fibras de elastina e glicosaminoglicanos. A porção mais superficial, em contato com a epiderme, é irregular, composta de papilas, e recebe o nome de estrato papilar. A camada mais profunda é denominada estrato reticular, formada por tecido conjuntivo denso e irregular, com poucas células, contendo principalmente fibroblastos e macrófagos. O tipo celular presente mais comumente na derme é o fibroblasto, que é capaz de produzir enzimas de remodelação, tais como proteases e collagenases, que desempenham um importante papel no processo de cicatrização das feridas^{21,24}.

A hipoderme, por sua vez, é a camada situada abaixo da derme e contém uma considerável quantidade de tecido adiposo bem vascularizado, contribuindo para as propriedades mecânicas e termorregulatórias da pele²¹.

A maioria dos epitélios consiste de múltiplos tipos celulares, distintos uns dos outros pela sua expressão de queratina. Acredita-se que as queratinas 5 e 14 são expressas em todos os queratinócitos que formam o epitélio escamoso estratificado, estando as principais queratinas presentes na camada basal^{25,26}.

2.3 Aspectos celulares e moleculares da cicatrização

O reparo tecidual é um processo normalmente rápido que se desenvolveu através da evolução das espécies, permitindo aos animais recuperar a integridade dos tecidos utilizando a cicatrização para aproximar as bordas das feridas ou preencher os espaços vazios²⁷.

O processo de cicatrização tecidual é muitas vezes descrito como um evento sequencial no qual os sinais de um tipo de célula iniciam a cascata de outros tipos celulares, avançando nas diversas fases de cicatrização. É, portanto, um processo interativo que envolve a liberação de mediadores solúveis, componentes da matrix

extracelular, células residentes (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células nervosas) e subtipos de leucócitos que se infiltram na ferida, participando nas diversas fases do processo de cicatrização – inflamação, formação do tecido e remodelação do mesmo²⁸⁻³⁰.

A cicatrização das feridas, no adulto, é um processo essencialmente de reparo, após o qual, normalmente, resulta uma cicatriz. O reparo tecidual começa imediatamente após a lesão, com o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão rico em fibrina, o coágulo de fibrina, que, além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de microrganismos, organiza a matriz provisória necessária para a migração celular. A matriz provisória servirá também como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial³¹⁻³³.

As plaquetas circulantes agregadas no local da lesão liberam vários mediadores inflamatórios, tais como: PDGF, fator transformador do crescimento α e β (TGF- α e TGF- β), fator do crescimento epidérmico (EGF) e fator básico do crescimento fibroblástico (FGF). Acredita-se também que estas moléculas desempenham um papel na regulação negativa do processo de reparo das feridas³¹.

Após a saída das plaquetas do leito vascular, a resposta inflamatória segue através do influxo de neutrófilos, cujo número aumenta gradativamente, alcançando o máximo em 24-48h após o trauma e, nesse momento, constituem cerca de 50% de todas as células do sítio da lesão. Depois desse período, o número de neutrófilos começa a declinar e os macrófagos assumem o controle, repovoando o local da lesão. Além da função de fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, essas células inflamatórias produzem fatores de crescimento, que preparam a ferida para a fase proliferativa, quando fibroblastos e células endoteliais também serão recrutados^{16,31,34-36}.

O processo de reparação evolui para a re-epitelização da ferida, com os queratinócitos migrando através do tecido de granulação da derme profunda, provenientes das células basais das bordas da ferida e dos apêndices epidérmicos. Tão logo os queratinócitos tenham re-estabelecido as propriedades de barreira da pele, eles recuperam o fenótipo da célula basal, com inibição de contato e diferenciação em epitélio escamoso queratinizado estratificado^{31,34,35}.

A fase final da resposta inflamatória e epitelização coincide com a migração de fibroblastos e células endoteliais e a formação do tecido de granulação. A angiogênese e fibroplasia tomam lugar, com os fibroblastos se tornando o tipo celular dominante, produzindo colágeno e matrix extracelular. A remodelação do colágeno ocorre através das metaloproteinases da matrix produzidas pelos fibroblastos e macrófagos, e esta é uma fase que pode demorar vários meses, sendo que, no adulto, é caracterizada pela formação da cicatriz³¹.

O balanço do colágeno recém-formado com a destruição do colágeno antigo estabelece a característica física final da cicatriz. A cicatriz é o ponto final do *continuum* normal do reparo dos tecidos, nos mamíferos³⁷.

As feridas com perda de tecidos envolvem a ruptura ou a perda de alguma ou de todas as camadas da pele. A cicatrização ocorre via preenchimento da área da ferida por tecido de granulação que caracteristicamente cresce a partir da base da lesão. As feridas que envolvem perda de tecidos são classificadas em dois tipos: feridas superficiais, nas quais toda a epiderme e a camada papilar da derme são lesadas, e feridas de espessura total, nas quais todas as camadas da derme e até o tecido celular subcutâneo são lesados^{38,39}.

Variações no processo cicatricial ocorrem em razão do tipo, localização e tamanho do defeito. Obviamente, quanto menos invasivo e mais superficial o insulto, mais rapidamente o processo será concluído. Regiões do corpo com uma maior riqueza vascular, como: face ou locais próximos ao coração cicatrizam mais rapidamente; enquanto os locais mais distais, especialmente as extremidades inferiores, são mais difíceis de cicatrizar. Além disso, tem-se observado que o tempo de cicatrização para feridas excisionais completas é diretamente proporcional à área da superfície, mas não se relaciona com a profundidade. Muitos outros fatores, incluindo comorbidades, nutrição ou lesão prévia, também são variáveis contribuintes^{40,41}.

2.4 Modelos animais de cicatrização de feridas

Nas pesquisas com animais de laboratório recomenda-se o emprego de animais menos desenvolvidos filogeneticamente e que possam ser obtidos em número suficiente, com maior facilidade. Esses princípios são responsáveis por serem os roedores, em especial os ratos, os animais empregados rotineiramente na maioria dos trabalhos científicos. Nos Estados Unidos, 88% das práticas são realizadas com ratos, camundongos, cobaias e coelhos, enquanto cães são utilizados em 0,35%, porcos em 0,28%, gatos em 0,14% e macacos em 0,03% das pesquisas e/ou aulas. O rato, animal mais utilizado nas pesquisas, é o mais apropriado para trabalhos envolvendo choque, sepse, obesidade, peritonite, câncer, úlceras gástricas, operações intestinais, estudos do sistema mononuclear fagocitário, baço, cicatrização e transplantes de órgãos⁴².

O objetivo de um modelo animal de cicatrização de feridas é replicar a fisiologia humana e prever os resultados terapêuticos⁴³. Existem muitos tipos diferentes de modelos animais de feridas cutâneas descritos na literatura, incluindo incisões, excisões, queimaduras e modelos de tecido de granulação. Em um modelo excisional, por exemplo, a cicatrização ocorre a partir das margens da ferida. Este tipo de modelo permite uma avaliação mais completa dos mecanismos envolvidos na cicatrização das feridas, incluindo a epitelização, a formação do tecido de granulação, a contração e a angiogênese. As feridas são facilmente coletadas e podem ser analisadas através da imunoistoquímica e de métodos moleculares. Além disso, essa técnica permite que sejam aplicadas medicações diretamente no leito da ferida, podendo-se avaliar seus efeitos farmacológicos^{43,44}.

Os ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) se caracterizam pela facilidade de manuseio e acomodação, resistência à manipulação, às agressões cirúrgicas e a processos infecciosos. O rato também é amplamente utilizado em estudos, devido à sua disponibilidade, baixo custo e pequeno tamanho, permitindo assim ampliar a discussão e comparação dos resultados com a literatura^{45,46}.

Uma das vantagens em se utilizar modelos animais de cicatrização cutânea, notadamente o rato, é que o processo de cicatrização é bastante acelerado nestes animais, tornando possível o estudo do mesmo em dias, ao invés de semanas, caso fosse pesquisado em seres humanos. Além disso, existe a possibilidade de análise controlada da quantidade e tamanho de amostras, diferindo do que seria possível

em um modelo utilizando seres humanos⁴⁷⁻⁴⁹. A cicatrização de feridas cutâneas em ratos, no entanto, apresenta variações, quando comparada à de seres humanos, por causa da diferente morfologia da pele, entre outros aspectos (Quadro 1)⁵⁰. Devido à elasticidade e redundância da pele e à falta de aderência firme às estruturas subjacentes, os ratos são considerados animais de pele frouxa^{47,48,50}. Por esta razão, nos animais que apresentam estas propriedades cutâneas a contração da ferida desempenha um papel significativo na cicatrização das lesões de pele. Consequentemente, a contração da ferida no rato, usualmente mais rápida que a epitelização, provoca um encurtamento no tempo global de cicatrização, diminuindo a ocorrência de infecções ou outras complicações. Desta forma, são mais difíceis as comparações dos estudos relativos à cicatrização cutânea entre a espécie humana, que possui a pele fixa, e os roedores, cuja pele é frouxa^{48,51,52}.

Os ratos possuem um músculo no panículo carnoso subcutâneo, ausente no homem, e que contribui também para a cicatrização cutânea através da contração e formação do colágeno⁵³.

Outro obstáculo em potencial na comparação da cicatrização de feridas da pele, em ambas as espécies, é que os ratos, ao contrário dos homens, não são suscetíveis ao escorbuto e, consequentemente, não necessitam de suplementação de vitamina C, essencial à síntese do colágeno. Os ratos possuem a enzima L-gluconolactona que converte L-gluconogamalactona em vitamina C, enquanto primatas e cobaias não apresentam a mesma enzima⁴⁵.

Quadro 1. Comparação das características cutâneas entre o rato e o ser humano

Característica	Rato	Ser humano
Epiderme	Sim	Sim
Membrana basal	Sim	Sim
Derme	Sim	Sim
Panículo carnoso	Sim	Não
Crescimento dos pêlos	Retalho	Mosaico
Glândulas apócrinas	Não	Sim
Glândulas écrinas	Não	Sim
Fonte de vitamina C	Endógena	Exógena
Termorregulação	circulação vascular periférica especialmente na cauda, respiração, movimentos físicos	circulação vascular periférica, respiração, movimentos físicos

Fonte: Adaptado de Marx & Mou⁵⁰

Existe uma grande variabilidade nos estudos que utilizam modelos animais de cicatrização cutânea, o que torna bastante difícil a comparabilidade entre os mesmos, além do que, muitas vezes, não é possível transpor os resultados completamente para a prática clínica em seres humanos. Numa revisão feita entre 2000 e 2003, de artigos publicados na literatura sobre modelos de cicatrização cutânea experimental nos quais se utilizou ratos como modelo animal, observou-se que, dos 55 artigos revisados, em 38,2% foram utilizados modelos de feridas incisionais e em outros 38,2% modelos excisionais, com alguns estudos utilizando diferentes combinações. A maioria dos pesquisadores (78,2%) utilizou o dorso do animal como localização da lesão, sendo a espécie *Sprague Dawley* do gênero masculino, com variação de peso de 250-300g, mais frequentemente utilizada. O pentobarbital sódico foi o agente anestésico predominante⁴⁵.

O tamanho da lesão provocada é uma consideração importante no estudo das feridas. Nos estudos experimentais foi demonstrado que não existe associação com a forma original da lesão, sendo o tamanho e a forma resultantes influenciados principalmente pelas forças elásticas da pele, com a tração exercida ao longo das linhas de tensão de uma área em particular. Tem-se recomendado o uso de lesões no formato quadrado, com uma área de, pelo menos 4cm², para que seja possível o estudo dos efeitos da contração, assim como da epitelização, sobre o fechamento da ferida. Entretanto, argumentos contrários foram levantados, pois, o estresse decorrente de uma grande ferida relativa à área de superfície corporal total, poderia influenciar os resultados no estudo da cicatrização das feridas cutâneas^{47,54}. No esforço de minimizar o estresse, tem-se optado por uma ferida de 15x15mm, ao invés de 20x20mm, em ratos adultos fêmeas da espécie *Hooded Lister*, pesando 200 a 350g⁴⁷.

Outro ponto a ser também considerado é a possível influência hormonal sobre a cicatrização de lesões cutâneas, pois tem sido reportado que a deficiência de estrógenos é associada com o retardo na cicatrização. Além disso, foi demonstrado que a pele mais fina, encontrada nas fêmeas de ratos, permite uma cicatrização mais rápida, com uma maior taxa de contração, enquanto as feridas em machos têm uma maior tendência a cicatrizar por epitelização^{47,55}.

Foi demonstrado num estudo que, no rato, a força tênsil de uma ferida dorsal incisional diminui à medida que a ferida se torna mais caudal, ressaltando a importância de se comparar as lesões exatamente nas mesmas localizações, devido

às diferenças na vascularização das diversas regiões da pele, que provocaria também diferenças na força tênsil⁵⁶.

2.5 Polímeros aplicados à saúde

Os polímeros são definidos como substâncias macromoleculares sintéticas ou naturais, originárias da união de monômeros, podendo ser classificados como homopolímeros, quando as unidades são idênticas, ou heteropolímeros, quando são constituídos por duas ou mais espécies de monômeros⁵⁷⁻⁶⁰.

As propriedades físicas dos polímeros dependem fundamentalmente do seu comprimento e da sua massa molecular; como estes envolvem uma larga faixa de valores, é de se esperar grande variação em suas propriedades⁶¹.

Os biopolímeros são macromoléculas de alto peso molecular, formadas pela repetição de unidades fundamentais unidas numa sequência e produzidas por várias espécies de sistemas biológicos⁶².

O termo biopolímero aplica-se aos polímeros biologicamente ativos, como as proteínas e os polímeros sintéticos biocompatíveis, utilizados em aplicações biológicas ou biomédicas, como o silicone e o teflon⁶¹.

Também recebem a denominação de biopolímeros, os polímeros derivados dos óleos vegetais, como o biopolímero da mamona e o látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*). O biopolímero da mamona é utilizado na área médica para a reconstrução do tecido ósseo, enquanto as membranas de latex são utilizadas para o reparo de falhas da parede abdominal e como substituto vascular. Da mesma maneira, são também considerados biopolímeros, os polissacarídeos produzidos por síntese microbiológica e excretados na forma de polímeros solúveis ou insolúveis⁶³⁻⁷⁶.

Como exemplo de espécies macromoleculares sintéticas destacam-se o poliestireno, o náilon, o teflon e os ácidos polifosfóricos. Os polissacarídeos, os ácidos nucleicos e as proteínas são considerados macromoléculas orgânicas naturais, enquanto o diamante, o grafite e a sílica classificam-se como macromoléculas naturais inorgânicas⁵⁹.

Os polissacarídeos são macromoléculas formadas pela união de várias unidades monossacarídicas ou de seus derivados, como os açúcares aminados e os ácidos urônicos, através de ligações glicosídicas. Diferem dos oligossacarídeos não

apenas pelo tamanho da molécula e pelas propriedades físicas que lhes conferem características de polímeros, mas também pela maior facilidade de combinações possíveis durante a biossíntese, permitindo a formação de ramificações em diferentes espécies de monossacarídeos, com diferentes configurações⁷⁷⁻⁷⁹.

Muitas bactérias produzem polímeros extracelulares, independentemente de se propagarem em culturas de suspensão ou biofilmes. No último caso, os polímeros apresentam-se como capsulares e altamente hidratados, anexados às células. Os polímeros bacterianos, quase exclusivamente polissacarídeos, têm sido estudados em virtude de sua aplicação industrial como gomas microbianas⁸⁰.

Diversos polissacarídeos microbianos são produzidos comercialmente, dentre eles destacam-se, em escala industrial, a xantana e os derivados da dextrana, o sephadex, utilizado na técnica cromatográfica, e as dextranas sulfatadas, que apresentam propriedades terapêuticas no tratamento de úlceras, além de possuírem atividade anticoagulante^{65,81}.

Muitos microrganismos têm a habilidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares como polímeros solúveis ou insolúveis em água⁸².

Os exopolissacarídeos são produzidos largamente por bactérias e microalgas e, menos frequentemente, por leveduras e fungos filamentosos. Os polímeros de origem bacteriana apresentam maior viabilidade industrial e comercial, entretanto, apenas uma pequena fração tem sido comercializada, apesar da potencialidade para substituir as gomas obtidas a partir de plantas e algas marinhas^{63,83,84}.

Recentes pesquisas na área médica apontam para a aplicação de determinados polissacarídeos como agentes terapêuticos importantes: β -D-glucanas, como imunomoduladores e agentes antitumorais e levanas na terapia do câncer, além da prevenção de doenças causadas por vírus (como Aids e *influenza*) e por bactérias; também são citadas as celulosas bacterianas, assim como o ácido hialurônico empregado em cosméticos^{65,85,86}.

Atualmente, tem havido interesse pelo uso da celulose de origem bacteriana. Algumas bactérias gram-negativas, tal como o *Acetobacter xylinum*, têm a capacidade de produzir celulose⁸⁷. Essa produção se dá na forma de filamentos extracelulares que rapidamente se agregam em microfibrilas celulósicas formando uma película^{82,88}. Diversas aplicações potenciais para a celulose bacteriana (ou microbiana) incluem, entre outros, o diafragma acústico, os aplicadores tópicos estéreis, a pele artificial, as membranas de filtros, o elemento aditivo para papel e a

fibra dietética^{82,87-89}. No quadro 2 estão representados alguns estudos onde foram utilizados a celulose microbiana na cicatrização cutânea.

Quadro 2. Aplicação da celulose microbiana sintetizada pela bactéria *Acetobacter xylinum* na cicatrização cutânea.

Material	Referência	Aplicação
Celulose microbiana (<i>Acetobacterxylinum</i>)	Slezak A et al ⁹⁰ . Polimery w Medycynie, 2005	Úlcera venosa de MMII (artigo de revisão)
	Czaja W et al ⁹¹ . Biomaterials, 2006	Curativos Substitutos cutâneos
	Helenius G et al ⁹² . Journal of Biomedical Materials Research, 2006	Testes de biocompatibilidade in vivo
	Czaja WK et al. ⁹³ Biomacromolecules, 2007	Cultura de fibroblastos/queratinócitos Cicatrização cutânea
	Barud HS et al. ⁹⁴ 30 ^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007	Incorporação de nanopartículas de prata Cicatrização cutânea
	Thomas S ⁹⁵ . Journal of Wound Care, 2008	Queimaduras e áreas doadoras (artigo de revisão)
	Mendes PN et al ⁹⁶ . Acta Veterinaria Scandinavica, 2009	Arcabouço para células-tronco mesenquimais
	Jung R et al ⁹⁷ . Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2009	Incorporação de nanopartículas de prata Curativos em feridas crônicas e queimaduras
	Solway DR et al ⁹⁸ . International Wound Journal, 2011	Úlcera de pé diabético (estudo clínico)

De uma forma geral, a síntese dos exopolissacarídeos microbianos é realizada por fermentação aeróbica, na qual os parâmetros do processo, como temperatura, aeração e agitação, são definidos em função do tipo de material a ser produzido⁹⁹.

O BCA é um exopolissacarídeo obtido pela síntese de bactérias Gram negativas do gênero *Zoogloea*, pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, a partir do melaço da cana-de-açúcar. O biopolímero foi sintetizado inicialmente na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, a partir de 1990. A estrutura química do biopolímero puro é constituída por diferentes monossacarídeos: glicose 87,57%, xilose 8,58%, ribose 1,68%, ácido glicurônico 0,83%, manose 0,82%, arabinose 0,37%, galactose 0,13%, ramnose 0,01% e fucose 0,01%^{100,101}.

O BCA em estado de pureza apresenta elasticidade, resistência à tração, flexibilidade e ainda pode ser modelado em diferentes formas, características físico-químicas fundamentais para a confecção de implantes biológicos⁴. Deve-se ressaltar ainda que este polímero é constituído apenas de polissacarídeos e de ácido glicurônico e, diferentemente de outros polímeros biológicos, não encerra, em sua estrutura, componentes aminados.

A citotoxicidade *in vitro* do BCA foi avaliada por meio do índice de adesão, produção de óxido nítrico e viabilidade celular de macrófagos alveolares de ratos. O composto apresentou alta biocompatibilidade frente aos três ensaios de citotoxicidade utilizados⁶.

O biopolímero, apresentado em forma de membranas, vem sendo utilizado em diferentes projetos de pesquisa, em curativos cirúrgicos e em *slings*, para o tratamento da incontinência urinária^{5,8}.

Os primeiros ensaios da aplicação do biopolímero foram citados no emprego do exopolissacarídeo *in natura*, ainda com açúcares residuais, quando foram efetuados testes de cicatrização cutânea em animais. Nos estudos realizados, o exopolissacarídeo foi capaz de controlar a infecção pelo efeito bacteriostático e bactericida observados clinicamente nas avaliações, pela redução gradual da secreção presente nas feridas. Os resultados da colheita da secreção no primeiro dia de estudo demonstraram que todas as feridas estavam contaminadas com várias espécies bacterianas, dentre elas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus sp*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella sonnei*. A aplicação do exopolissacarídeo

apresentou um comportamento estável, com liberação gradual de seus constituintes, observado no exsudato da ferida. Verificou-se crescimento acelerado do tecido de granulação na fase inicial da re-epitelização, com o preenchimento de todo o espaço da ferida, em média, após o quinto dia do início do tratamento. Com relação ao tempo de cicatrização, todas as feridas tratadas evoluíram sem intercorrências, com tempo cicatricial menor do que os observados na terapêutica convencional à base de antissépticos e pomadas cicatrizantes. Os autores concluíram que o exopolissacarídeo poderia ser utilizado em feridas cutâneas, levando em conta os aspectos relacionados ao comportamento terapêutico, baixo custo econômico e simplicidade de aplicação^{5,102}.

2.6 Curativos

Certas características são desejadas num curativo independentemente de sua estrutura e do tipo de ferida na qual é utilizado¹⁰³:

1. Proteger a ferida de bactérias e materiais estranhos;
2. Absorver o exsudato da ferida;
3. Promover compressão, a fim de minimizar o edema e obliterar o espaço-morto;
4. Prevenir o aquecimento e perda de fluidos do leito da lesão;
5. Não ser aderente, para limitar traumas à ferida;
6. Manter um ambiente ocluído úmido e aquecido, para maximizar a epitelização e minimizar a dor;
7. Ser esteticamente atraente.

Os substitutos cutâneos ideais também devem ter as seguintes características: facilidade no manuseio e aplicação no local da ferida, promover a função de barreira vital com fluxo apropriado de água, ter propriedades mecânica e física adequadas, ser de degradação controlada, estéril, atóxico, não-antigênico e desencadear mínima reação inflamatória. Adicionalmente, os substitutos de pele devem se incorporar ao hospedeiro com mínima cicatriz e dor, facilitar a angiogênese, além de poder ser adquiridos por um custo efetivo¹⁵.

Uma alternativa à aplicação de curativos é simplesmente permitir que uma crosta se forme sobre a ferida, pois a mesma servirá de curativo natural. As crostas são formadas por eritrócitos, plaquetas e outras células do sangue aderidas;

possuem algumas propriedades comuns aos curativos, incluindo: criação de uma barreira contra material estranho, redução da dor, mantendo as bordas da ferida em aproximação, facilitando a contração da mesma e minimizando a perda de fluidos e proteínas. Embora as crostas apresentem muitas funções benéficas, elas não são ideais, retardando a epitelização e podendo fixar bactérias sobre a superfície da ferida, com o risco de levar a infecções¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Em trabalho publicado em 1962 sobre os efeitos da oclusão da ferida na taxa de epitelização, utilizando modelo porcino, as lesões criadas cirurgicamente foram deixadas abertas ou ocluídas sob um filme transparente. Observou-se que a taxa de epitelização sob o curativo oclusivo foi duas vezes maior que na ferida deixada aberta¹⁰⁴.

Os curativos oclusivos limitam a perda de líquidos, vapor d'água e gases do leito da ferida para o ambiente externo¹⁰³. A manutenção de um ambiente úmido ocluído promove um pH levemente ácido e com uma tensão de oxigênio relativamente baixa na superfície da ferida¹⁰⁶. Um gradiente de oxigênio acentuado estimula a angiogênese, um importante fator na cicatrização das feridas¹⁰⁷. Uma baixa tensão de oxigênio também promove condições para a proliferação de fibroblastos e formação do tecido de granulação¹⁰⁸. A formação do tecido de granulação e a epitelização são estimuladas pelas citocinas, que são mais prováveis de serem preservadas em uma ferida num ambiente ocluído. A umidade previne a dessecação, que causa a morte celular; além disso, facilita a migração epidérmica, a angiogênese e a síntese de tecido conjuntivo¹⁰⁹. Adicionalmente, um ambiente úmido também suporta a autólise de material necrótico pelo fornecimento de condições necessárias para a atuação de enzimas que realizam o debridamento. Os curativos oclusivos limitam a dor associada às lesões de espessura parcial numa intensidade muito maior que os curativos não oclusivos¹¹⁰.

A resposta biológica ou morfométrica do material usado no leito de ferimentos cruentos é avaliada por meio do infiltrado celular, da quantidade de fibrose e do grau de vascularização. Além disso, a resposta biológica vai depender de algumas condições: se o material é absorvível ou não, sintético ou natural, se é estruturado por ligações químicas ou não³².



MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados quarenta ratos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mamalia*), com idades variando de dois a oito meses e pesos entre 189 e 485g, de ambos os gêneros (19 machos), procedentes do Biotério José Paulino, do Departamento de Nutrição da UFPE.

Os animais foram mantidos em confinamento em gaiolas coletivas de polipropileno (com quatro animais por gaiola), dispostas em estantes, no biotério de experimentação do Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em ambiente com ar condicionado e temperatura a 22°C, alternando-se 12 horas de ciclo claro-escuro, recebendo água e ração Labina-Purina® *ad libitum*.

3.2 Desenho do estudo

O presente estudo enquadrou-se na tipologia de ensaio biológico ou dos estudos de intervenção ou experimentais, que constituem um tipo especial do estudo de coorte.

3.3 Seleção dos grupos

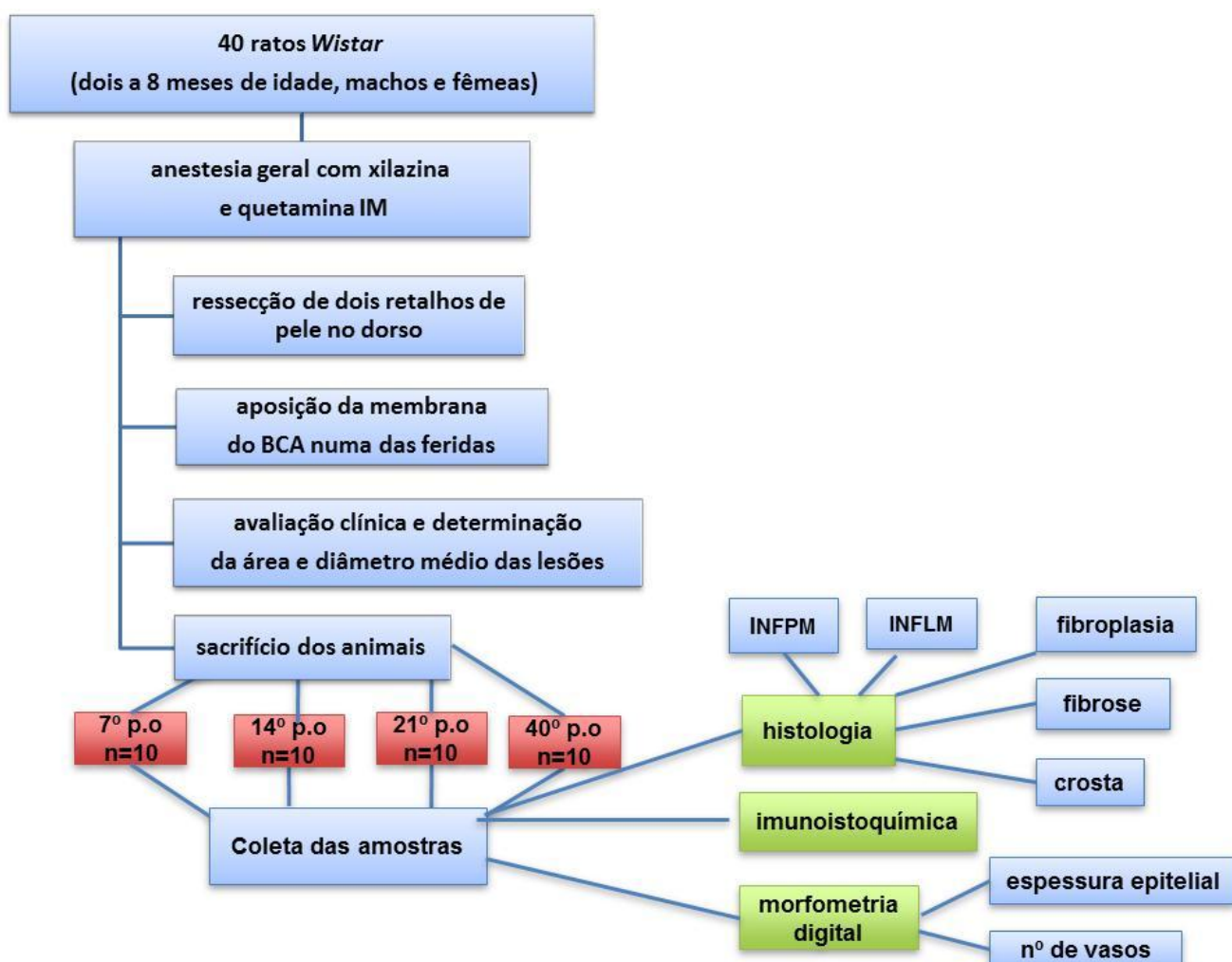
Os animais foram submetidos a excisão de dois retalhos de pele de espessura total na região dorsal, sendo, num deles, por sorteio, aplicado a membrana fenestrada de BCA. Cada animal, portanto, serviu de controle de si mesmo.

Após quatro momentos distintos do pós-operatório (7, 14, 21 e 40 dias), os animais foram sacrificados, para ressecção das áreas cicatriciais.

3.4 Procedimento cirúrgico

Antes de se iniciar o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram em jejum por um período de 12 horas, recebendo apenas água. Cada animal foi submetido a anestesia com uma solução de cloridrato de cetamina na dose de 5mg/100g de peso e cloridrato de xilazina na dose de 2mg/100g de peso, aplicada por via intramuscular. Dez minutos antes da anestesia foi aplicado sulfato de atropina, por via intramuscular, na dose de 0,044mg/Kg¹².

Fluxograma demonstrando a sequência metodológica da pesquisa.



O ato cirúrgico foi realizado na sala de microcirurgia do Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) da UFPE, atendendo às condições básicas de assepsia e antissepsia.

Durante a anestesia, por meio de uma máscara nasal, os animais receberam 0,5 ml/min de oxigênio. Este protocolo permitiu uma anestesia com duração entre 50 e 80 minutos e boa recuperação pós-anestésica.

Após epilação por tração manual da região dorsal, antissepsia com digluconato de clorexidina e aposição de campo cirúrgico estéril fenestrado, os animais foram submetidos a duas excisões de retalho de pele e do panículo carnosso subjacente, medindo 1,0 x 1,0cm, com o auxílio de lâmina de bisturi nº 15 e tesoura de Metzenbaum. Para delinear o retalho, foi utilizado um molde metálico e caneta demográfica, a fim de uniformizar a demarcação e os limites da incisão. A ferida cranial foi realizada na linha média no dorso de cada animal, 3cm abaixo de uma linha imaginária que cruzava a borda inferior das orelhas, sendo a lesão caudal localizada a 2 cm de distância do limite inferior da ferida cranial. (Figura 2)

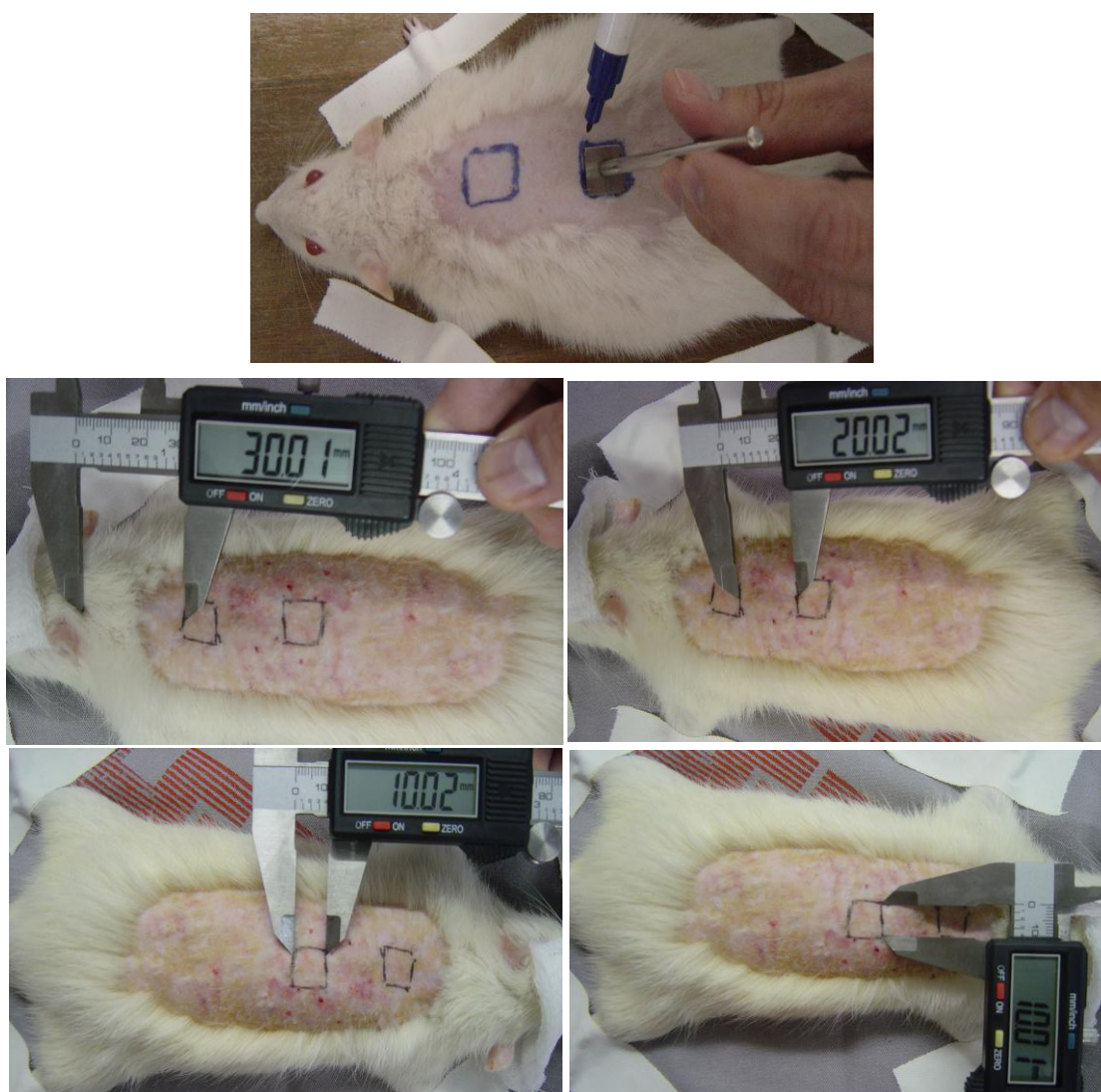


Figura 2. Demarcação dos retalhos cutâneos no dorso dos animais.

Após o procedimento cirúrgico, foi aplicada a membrana do BCA numa das feridas por sorteio, lavagem com soro fisiológico das duas lesões e curativo de proteção com gazes estéreis e esparadrapo, sendo a troca realizada a cada dois ou três dias (Figura 3).

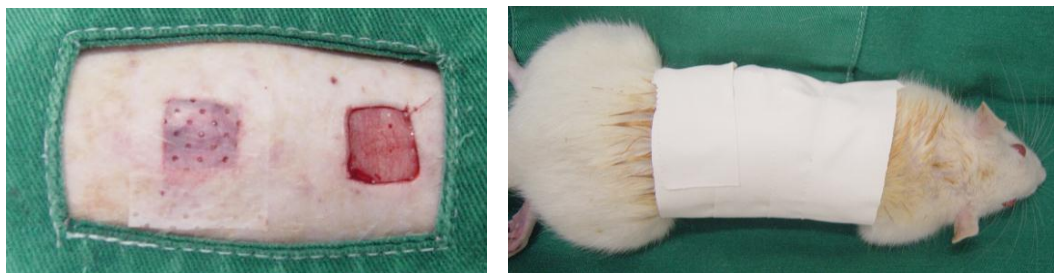


Figura 3. Aposição da membrana fenestrada do biopolímero da cana-de-açúcar numa das feridas e curativo de proteção.

No período pós-operatório, os animais eram mantidos em gaiolas individuais, nas mesmas condições ambientais do pré-operatório.

As avaliações clínica e do processo cicatricial das feridas foram feitas diariamente. Os animais foram submetidos à eutanásia nos momentos pré-estabelecidos do pós-operatório (7º, 14º, 21º e 40º p.o.), por meio da administração intraperitoneal de tiopental sódico e, subsequente, de doses letais deste barbitúrico, por injeção intracardíaca. Realizou-se a coleta das áreas cicatriciais com uma margem de pele normal circunjacente de aproximadamente 1cm, a fim de se proceder ao estudo histopatológico e à imunoistoquímica.

3.5 Confeção do biopolímero

As membranas de biopolímeros fenestradas foram produzidas e fornecidas pelo grupo de pesquisa Biopolímero de Cana-de-Açúcar. O processo de produção foi desenvolvido na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. As membranas, com espessura de 0,1mm, foram perfuradas em um estampo, produzindo perfurações de 1mm de diâmetro, com distância de 1mm entre os poros; a seguir, foram cortadas em fragmentos de 5,0 x 2,0 cm e vedadas em embalagens de acetato de poliéster em álcool isopropílico em solução aquosa e embaladas em papel grau cirúrgico (Figura 4), no serviço de esterilização do Hospital das Clínicas de Pernambuco. A esterilização foi feita através de radiação gama (γ), no Laboratório de Metrologia do Departamento de Energia Nuclear da UFPE, visando atender conceitos pré-estabelecidos de assepsia cirúrgica.



Figura 4. Membrana fenestrada do biopolímero da cana-de-açúcar vedada em embalagem de acetato de poliéster em álcool isopropílico em solução aquosa e embalada em papel grau cirúrgico para esterilização em radiação gama.

3.6 Avaliação clínica

Os animais foram examinados diariamente quanto ao estado geral, comportamento, consumo de alimentos, curva ponderal e, no sítio cirúrgico, quanto à presença de exsudatos e sinais flogísticos.

As feridas cirúrgicas foram fotografadas com auxílio de uma câmera digital de 4,0 *megapixels* e *zoom* óptico de 3x (Sony® Cybershot DSC-P9, Japão) fixada a um suporte próprio, a uma distância de 20cm da superfície da mesa e distância focal de 8mm (Figura 5). As imagens foram transferidas para um computador com *software* de domínio público de análise de imagens digitais (Image Processing and Analysis in Java – ImageJ 1.44o, *National Institute of Health*, USA), a fim de se obter o diâmetro médio (média da soma dos diâmetros longitudinal e transversal) e a área das lesões em *pixels* através do traçado de linhas. (Figura 6)



Figura 5. Suporte para fixação da câmera digital.

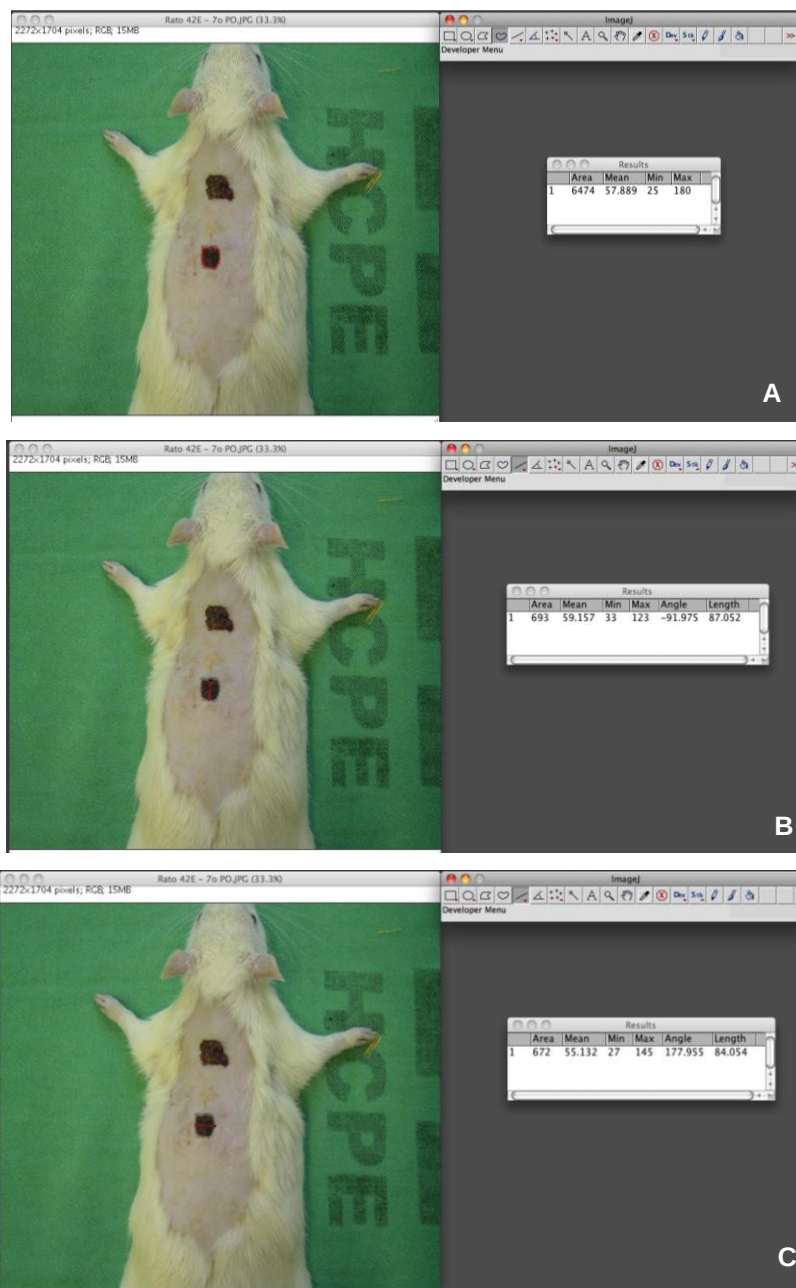


Figura 6. Determinação da área (A) e dos diâmetros longitudinal (B) e transversal (C) das feridas através do programa de análise digital de imagens - ImageJ.

3.7 Avaliação macroscópica e histológica

As amostras foram obtidas através da excisão de toda a extensão da área cicatricial, com uma margem de aproximadamente 1cm de pele íntegra após o sacrifício dos animais, nos períodos de observação pré-estabelecidos. As peças cirúrgicas foram fixadas em papelão e colocadas em formol tamponado a 10%. Cada lesão foi fotografada utilizando uma câmera digital e mensurado o maior diâmetro, em milímetros, com o auxílio de um paquímetro digital (Lee Tools, China). (Figura 7)



Figura 7. Determinação do maior diâmetro das feridas com o auxílio de paquímetro digital, após fixação em formol.

Após inclusão em parafina, foram realizados cortes de 5 μ m, com a utilização do micrótomo, na direção perpendicular em relação à superfície da pele no centro da amostra, em toda a sua espessura, englobando margem de pele normal. As lâminas foram confeccionadas e coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE).

Através da microscopia óptica, foram analisadas as intensidades dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da fibrose, da fibroplasia, além da presença e intensidade da crosta. Utilizou-se para avaliação semiquantitativa dos aspectos analisados, o seguinte escore (Quadro 3):

Quadro 3 – Categorização das variáveis relacionadas a cicatrização cutânea

Nome da variável	Categorização
Variáveis relacionadas a cicatrização cutânea	
Infiltrado inflamatório linfomononuclear	Área ocupada por células inflamatórias
	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Leve: <10% Escore 2 - Moderado: 11-50% Escore 3 - Intenso: >50%
Infiltrado inflamatório polimorfonuclear	Área ocupada por células inflamatórias
	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Leve: <10% Escore 2 - Moderado: 11-50% Escore 3 - Intenso: >50%
Fibrose	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Leve: Discreta, raras fibras em até 10% da área Escore 2 - Moderada: fibras dispersas, jovens, não modeladas, entre 10% e 75% da área Escore 3 - Intensa: fibras maduras, modeladas, entre 75 a 100% da área
Fibroplasia	Da área ocupada por fibroblastos ativados
	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Leve: < 10% Escore 2 - Moderada: 11-50% Escore 3 - Intensa: > 50%
Crosta	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Intensidade discreta Escore 2 - Intensidade moderada Escore 3 - Intensidade acentuada

Foi mensurada também a extensão do epitélio neoformado, com o auxílio da régua microscópica de Breslow.

Foram feitas fotografias digitais de três a cinco campos, aleatoriamente selecionados, das preparações histológicas, com o auxílio de uma câmera (Moticam 1000 de 1,3 Mega Pixel) acoplada a um microscópio óptico (Motic BA 200), com as objetivas de 10x e 40x, utilizando-se o *software Motic Images Plus 2.0ML* instalado em um computador (Figura 8).

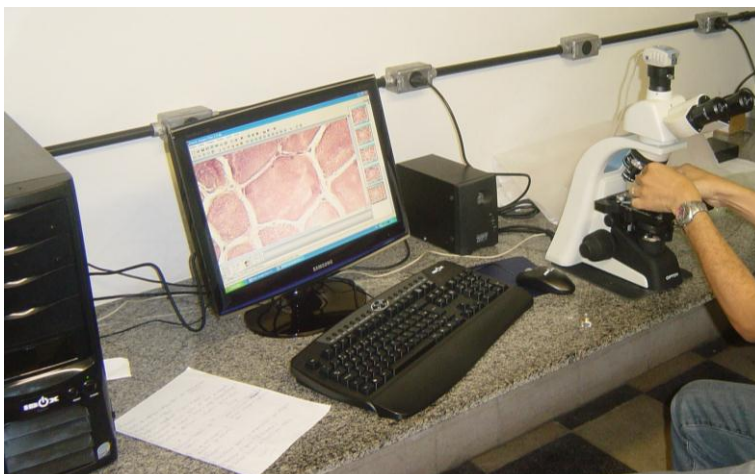


Figura 8. Câmera (Moticam 1000 de 1,3 Mega Pixel) acoplada a um microscópio óptico (Motic BA 200) e a um computador com o *software Motic Images Plus 2.0ML*.

As imagens assim obtidas foram estudadas com o auxílio do *software* de análise de imagens digitais - ImageJ 1.46e, para determinação da espessura do epitélio e contagem dos vasos neoformados na área do tecido de granulação. Foram realizadas, em média, 25 mensurações, para determinação da espessura epitelial, utilizando a objetiva de 10x, com cinco avaliações em cada campo. A contagem dos vasos neoformados na área cicatricial foi feita com o aumento de 40x, avaliando-se em torno de cinco campos. Calculou-se a média aritmética para cada amostra (Figura 9). Em algumas amostras, não foi possível a avaliação em cinco campos, devido às reduzidas dimensões da área cicatricial.

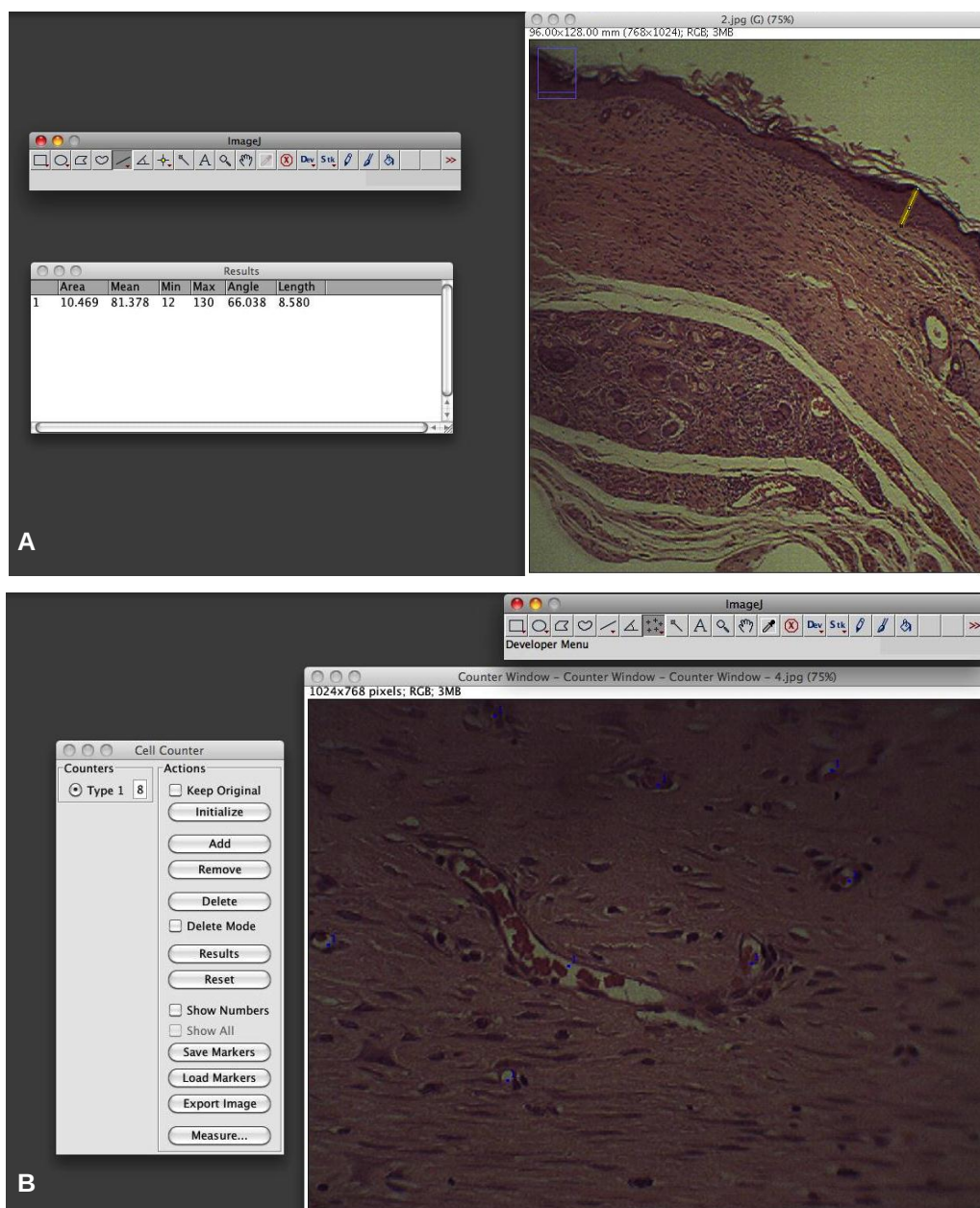


Figura 9. Determinação da espessura epitelial(A) e contagem dos vasos(B) na área cicatricial utilizando o programa de análise digital de imagens ImageJ (aumento de 100x e 400x respectivamente, coloração HE).

3.8 Metodologia da imunoistoquímica

Cortes histológicos com 5µm de espessura foram obtidos a partir dos blocos de parafina dos espécimes teciduais. Utilizaram-se anticorpos monoclonais IgG1 de camundongos contra citoqueratinas 5/8 e 14 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA/USA). Um *steamer* foi empregado para recuperação antigênica por calor úmido. Para revelação, foi empregado o método da estreptoavidina-biotina-peroxidase¹²³. A coloração foi realizada com 3,3 diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB).

3.9 Análise estatística

Os dados foram digitados na planilha Excel 2007 e analisados através dos programas Stata/SE 9.0. As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e de dispersão, sendo apresentadas em forma de tabelas. Foi aplicado o teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*, confirmando-se que as amostras apresentavam distribuição normal. Utilizou-se o teste t de *Student* pareado para comparação das variáveis numéricas – diâmetro médio, área, maior diâmetro após fixação e tempo de cicatrização – entre os grupos. Para as variáveis categóricas, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e linfomononuclear, fibroplasia, fibrose e crosta, foram aplicados o teste do Qui-Quadrado e o teste Exato de Fisher. O nível de significância p, utilizado para se rejeitar a hipótese de nulidade, foi de 5% ($p < 0,05$).

3.10 Considerações éticas

Esta pesquisa seguiu os princípios que regem o Código de Ética experimental e as leis de proteção dos animais, de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei nº 9.605 – art. 32, e o Decreto nº 3.179 – art. 17, de 21/09/1999, que tratam da questão do uso de animais para fins científicos. Além disso, teve aprovação integral do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, conforme processo nº23076.007905/2077-15, inclusive concordando com o fato de que a morte dos animais utilizados neste estudo se justifica, por não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.



RESULTADOS

4.1 Observação clínica pós-operatória

Durante o período do estudo, dois ratos morreram no pós-operatório (1º e 2º p.o.), os quais foram substituídos, o que resultou numa mortalidade de 5%. Os demais animais apresentaram boa vitalidade após o procedimento cirúrgico, aceitando bem a dieta e mantendo a média de peso. As feridas em geral se encontravam secas e com presença de tecido de granulação, sendo mais evidente nas lesões onde não foi aplicada a membrana. Quatro animais apresentaram exsudação no leito da ferida, sendo demonstrado em duas delas que receberam a membrana. A permanência média da membrana nos locais de implante foi de seis dias, variando de dois a 12 dias.

4.2 Avaliação macroscópica

O tempo médio de cicatrização completa de todas as feridas observadas clinicamente foi de 21 dias, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as feridas que receberam a membrana (21 dias) e aquelas que não receberam (20 dias) (Tabela 1).

A análise das áreas cicatriciais através das imagens digitalizadas pelo *software* ImageJ 1.44o não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as feridas nas quais se utilizou a membrana do BCA em relação àquelas em que a mesma não foi utilizada, considerando-se os parâmetros - diâmetro médio e área, nos períodos pós-operatórios avaliados (2º, 7º e 14º p.o.), embora tenha sido observado que, nas feridas em que se aplicou a membrana, tanto o diâmetro médio quanto a área foram menores no 2º e 7º p.o, conforme se pode inferir analisando a tabela 1. Ao contrário do observado no 2º e 7º p.o., os valores desses parâmetros foram maiores no 14º p.o., quando se utilizou a membrana (Tabela 1). Não foram realizadas as determinações da área e do diâmetro médio nos animais no 21º e 40º p.o., pois, nesses momentos, todas as feridas se encontravam completamente epitelizadas.

Ao comparar o maior diâmetro das feridas após ressecção e fixação em formol, não se observou diferença estatisticamente significativa entre as mesmas, apesar de ter sido identificada uma redução no maior diâmetro das lesões nas quais se aplicou a membrana (Tabela 1)

Tabela 1 – Comparações das médias das áreas e diâmetros médios (em *pixels*), do maior diâmetro das feridas fixadas (em milímetros) e do tempo de cicatrização (em dias) das áreas cicatriciais entre os grupos

Variáveis	Áreas Cicatriciais		p-valor *
	Com Membrana	Sem Membrana	
	Média ± DP	Média ± DP	
Área 2º p.o.	26205,4 ± 6529,1	28507,4 ± 7464,9	0,146
Área 7º p.o.	13050,3 ± 6486,2	14590,2 ± 5651,4	0,261
Área 14º p.o.	2071,9 ± 1374,1	1652,9 ± 1298,4	0,242
Diâmetro médio 2º p.o.	168,6 ± 22,2	177,5 ± 24,8	0,101
Diâmetro médio 7º p.o.	119,4 ± 31,0	126,8 ± 23,5	0,237
Diâmetro médio 14º p.o.	49,1 ± 16,5	41,0 ± 15,1	0,060
Maior diâmetro (após-fixação)	8,0 ± 2,6	8,4 ± 2,9	0,492
Tempo de cicatrização	21,5 ± 2,8	20,4 ± 3,2	0,324

(*) Teste t Student.

Na avaliação macroscópica foi demonstrado que, até o 14º dia de p.o., todas as feridas apresentavam crostas, independentemente da presença ou não da membrana. Por outro lado, observou-se também que, a partir do 14º p.o., oito animais dentre os 20 analisados (pertencentes aos grupos de eutanásia no 21º e 40º p.o.), demonstravam crostas que se localizavam exclusivamente na posição caudal (em cinco lesões que receberam a membrana e em três que não receberam).

4.3 Avaliação microscópica

As comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais nos momentos de eutanásia dos animais no pós-operatório (7º, 14º, 21º e 40º p.o.) estão demonstradas nas tabelas 2 a 5.

Observou-se uma menor intensidade do infiltrado inflamatório polimorfonuclear, embora sem diferença estatisticamente significativa, em todas as

feridas em que se aplicou a membrana do BCA, exceto naquelas em que a eutanásia ocorreu no 21º p.o.

Em relação ao infiltrado inflamatório linfomononuclear, foi observada menor intensidade nas áreas cicatriciais dos animais submetidos a eutanásia no 40º p.o., nos locais em que se aplicou a membrana, embora sem significância estatística ($p=0,141$).

A intensidade da fibrose foi semelhante entre os diversos grupos de pós-operatório, independentemente da presença da membrana. No entanto, nos animais que sofreram eutanásia mais precocemente (7º p.o.), foi menor a ocorrência de fibrose nas feridas em que foi aplicada a membrana do BCA, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa ($p=0,141$).

A intensidade da fibroplasia diminuiu comparativamente entre os grupos, com o transcorrer do período pós-operatório, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as feridas que receberam ou não a membrana.

Não houve significância estatística com relação à frequência e intensidade da crosta nos diversos períodos de pós-operatório entre os grupos, embora tenha sido demonstrado maior frequência no 40º p.o., nas feridas que não receberam a membrana (6/10 feridas no grupo sem membrana x 2/10 feridas no grupo com membrana, $p=0,141$).

Tabela 2 – Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais submetidos a eutanásia no 7º p.o.

Variáveis	Áreas Cicatriciais				p-valor
	Com Membrana		Sem Membrana		
	n	%	n	%	
INFLM					
1	10	100,0	10	100,0	¥
INFPM					
0	1	10,0	0	0,0	0,370 *
1	6	60,0	4	40,0	
2	3	30,0	6	60,0	
Crosta					
1	0	0,0	1	10,0	0,582 *
2	3	30,0	1	10,0	
3	7	70,0	8	80,0	
Fibrose					
1	9	90,0	5	50,0	0,141 *
2	1	10,0	5	50,0	
Fibroplasia					
3	10	100,0	10	100,0	¥

(¥) Teste não aplicável (*) Teste Exato de Fisher

INFLM – infiltrado inflamatório linfomononuclear; INFPM - infiltrado inflamatório polimorfonuclear; p.o. – pós-operatório; os números abaixo de cada variável se referem aos valores dos escores.

Tabela 3 – Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais submetidos a eutanásia no 14º p.o.

Variáveis	Áreas Cicatriciais				p-valor
	Com Membrana		Sem Membrana		
	n	%	n	%	
INFLM					
1	8	80,0	9	90,0	1,000 *
2	2	20,0	1	10,0	
INFPM					
0	2	20,0	1	10,0	0,068 *
1	7	70,0	3	30,0	
2	1	10,0	6	60,0	
Crosta					
1	4	40,0	4	40,0	1,000 *
2	3	30,0	4	40,0	
3	2	20,0	2	20,0	
Fibrose					
1	2	20,0	2	20,0	1,000 *
2	7	70,0	6	60,0	
3	1	10,0	2	20,0	
Fibroplasia					
1	4	40,0	1	10,0	0,303 *
2	6	60,0	9	90,0	

(*) teste exato de fisher

inflm – infiltrado inflamatório linfomononuclear; infpm - infiltrado inflamatório polimorfonuclear; p.o. – pós-operatório; os números abaixo de cada variável se referem aos valores dos escores.

Tabela 4 – Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais submetidos a eutanásia no 21º p.o.

Variáveis	Áreas Cicatriciais				p-valor
	Com Membrana		Sem Membrana		
	n	%	n	%	
INFLM					
0	1	10,0	1	10,0	1,000 *
1	8	80,0	9	90,0	
2	1	10,0	0	0,0	
INFPM					
0	4	40,0	6	60,0	0,656 *
1	6	60,0	4	40,0	
Crosta					
0	3	30,0	4	40,0	1,000 *
1	5	50,0	4	40,0	
2	2	20,0	2	20,0	
Fibrose					
2	10	100,0	10	100,0	¥
Fibroplasia					
1	9	90,0	5	50,0	0,141 *
2	1	10,0	5	50,0	

(¥) Teste não aplicável (*) Teste Exato de Fisher

INFLM – infiltrado inflamatório linfomononuclear; INFPN - infiltrado inflamatório polimorfonuclear; p.o. – pós-operatório; os números abaixo de cada variável se referem aos valores dos escores.

Tabela 5 – Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais submetidos a eutanásia no 40º p.o.

Variáveis	Áreas Cicatriciais				p-valor
	Com Membrana		Sem Membrana		
	n	%	n	%	
INFLM					
0	5	50,0	1	10,0	0,141 *
1	5	50,0	9	90,0	
INFPN					
0	7	70,0	4	40,0	0,475 *
1	2	20,0	5	50,0	
2	1	10,0	1	10,0	
Crosta					
0	8	80,0	4	40,0	0,141 *
1	1	10,0	5	50,0	
2	1	10,0	1	10,0	
Fibrose					
2	4	40,0	4	40,0	1,000 *
3	6	60,0	6	60,0	
Fibroplasia					
0	0	0,0	2	20,0	0,474 *
1	9	90,0	8	80,0	
2	1	10,0	0	0,0	

(*) Teste Exato de Fisher

INFLM – infiltrado inflamatório linfomononuclear; INFPN - infiltrado inflamatório polimorfonuclear; p.o. – pós-operatório; p.o. – pós-operatório; os números abaixo de cada variável se referem aos valores dos escores.

Na avaliação histológica foi observada também a presença de reação histiocítica gigantocelular do tipo corpo estranho, mais frequentemente encontrada nas lesões que receberam a membrana (14 lesões com membrana x sete lesões sem membrana).

A presença do epitélio recém formado foi confirmada através da imunoistoquímica, sendo a marcação mais intensa quando foram utilizados anticorpos contra as citoqueratinas 14 (Figuras 10 e 11).



Figura 10. Imunoistoquímica com anticorpos contra citoqueratina 14 evidenciando área de re-epitelização em animal submetido a eutanásia no 21º dia de pós-operatório de implante da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar. A seta vermelha mostra a transição entre a superfície epitelizada e a não epitelizada (aumento de 400x).

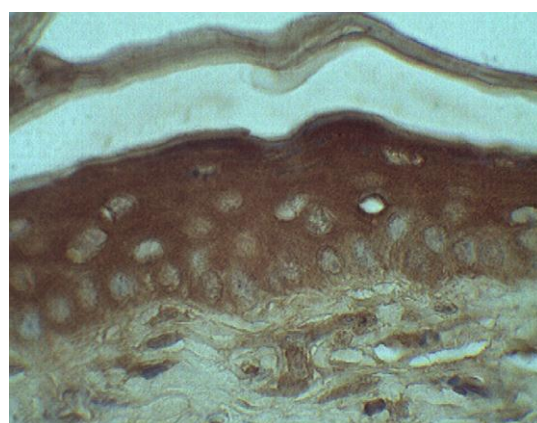


Figura 11. Queratinócitos marcados por imunoistoquímica utilizando anticorpos contra citoqueratina 14 em área de re-epitelização em animal submetido a eutanásia no 21º dia de pós-operatório de implante da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar (aumento de 1000x).

Na tabela 6 são mostrados os valores relativos à extensão do epitélio recém formado e às médias da espessura epitelial e do número de vasos das áreas cicatriciais dos grupos com e sem membrana.

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa em relação às médias da espessura epitelial nas áreas cicatriciais das feridas que receberam ou não a membrana, nos quatro momentos de pós-operatório avaliados.

Quanto ao número de vasos neoformados, em todos os períodos pós-operatórios analisados foi observado uma menor quantidade de vasos nas feridas que receberam a membrana do BCA, embora sem significância estatística. Esta diferença foi maior no 40º p.o. ($p=0,075$).

Tabela 6 – Comparação dos valores relativos à extensão do epitélio e às médias da espessura epitelial e do número de vasos das áreas cicatriciais das feridas do grupo controle e experimental nos quatro momentos de pós-operatório avaliados.

Grupo	Áreas Cicatriciais		p-valor *
	Com Membrana Média ± DP	Sem Membrana Média ± DP	
Grupo Total			
Extensão do epitélio	5,10 ± 3,34	5,47 ± 3,42	0,624 *
Espessura epitelial	5,67 ± 1,85	5,58 ± 1,91	0,829 *
Nº de vasos	8,64 ± 4,41	9,81 ± 4,71	0,254 *
Sacrifício no 7º p.o.			
Extensão do epitélio	1,16 ± 0,32	1,52 ± 0,60	0,048 **
Espessura epitelial	7,44 ± 1,94	6,67 ± 2,68	0,174 **
Nº de vasos	12,66 ± 4,17	14,18 ± 6,07	0,791 **
Sacrifício no 14º p.o.			
Extensão do epitélio	4,39 ± 2,24	4,21 ± 1,41	0,910 **
Espessura epitelial	6,04 ± 0,86	6,58 ± 0,97	0,131 **
Nº de vasos	9,69 ± 3,99	9,74 ± 3,67	0,880 **
Sacrifício no 21º p.o.			
Extensão do epitélio	6,89 ± 2,09	7,51 ± 1,60	0,450 **
Espessura epitelial	4,99 ± 1,64	4,80 ± 1,22	0,940 **
Nº de vasos	6,16 ± 3,25	6,82 ± 2,39	0,650 **
Sacrifício no 40º p.o.			
Extensão do epitélio	7,96 ± 2,91	8,65 ± 3,29	0,821 **
Espessura epitelial	4,21 ± 1,05	4,27 ± 1,11	0,940 **
Nº de vasos	6,05 ± 2,59	8,51 ± 2,69	0,075 **

(*) Teste t Student (**) Teste de Mann-Whitney
p.o. – pós-operatório.

As figuras de números 12 a 15 ilustram os principais achados histológicos encontrados nos grupos de estudo e controle, nos quatro momentos de pós-operatório analisados.

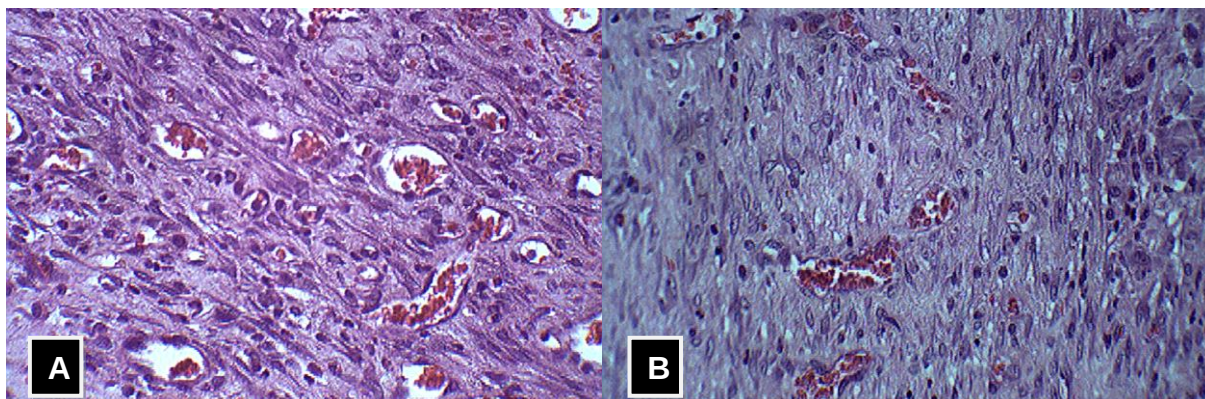


Figura 12. Achados histopatológicos das áreas cicatriciais em animal submetido a eutanásia no 7º p.o., em A, área cicatricial de ferida que não recebeu a membrana, em B, área cicatricial de ferida que recebeu a membrana, no mesmo animal. Nota-se vascularização menos acentuada, sem sinais de hemorragia na área cicatricial da ferida onde foi aplicada a membrana. (coloração H.E., 400x)

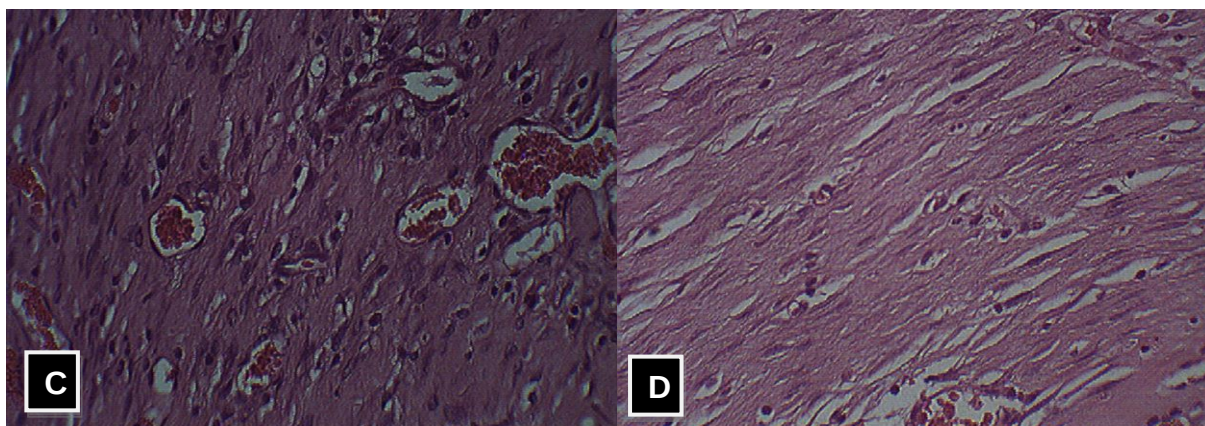


Figura 13. Achados histopatológicos das áreas cicatriciais em animal submetido a eutanásia no 14º p.o., em C, área cicatricial de ferida que não recebeu a membrana, em D, área cicatricial de ferida que recebeu a membrana, no mesmo animal. Nota-se vascularização menos acentuada, com menores infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, além de fibroplasia menos intensa na área cicatricial da ferida onde foi aplicada a membrana. (coloração H.E., 400x)

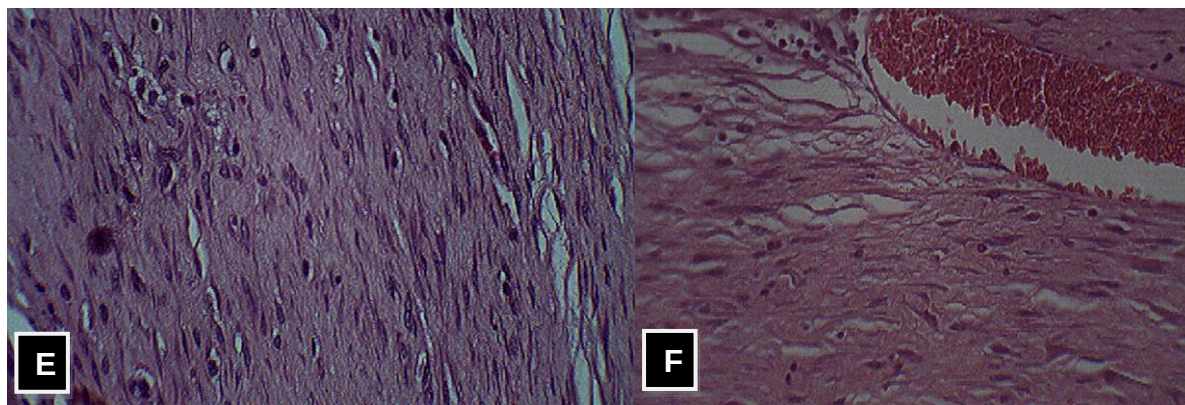


Figura 14. Achados histopatológicos das áreas cicatriciais em animal submetido a eutanásia no 21º p.o., em E, área cicatricial de ferida que não recebeu a membrana, em F, área cicatricial de ferida que recebeu a membrana, no mesmo animal. Nota-se fibroplasia menos acentuada na área cicatricial da ferida onde foi aplicada a membrana. (coloração H.E., 400x)

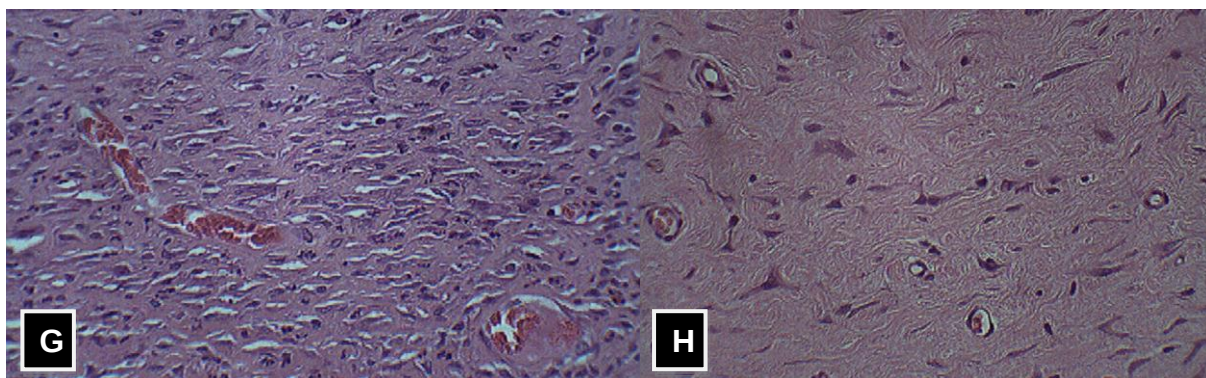


Figura 15. Achados histopatológicos das áreas cicatriciais em animal submetido a eutanásia no 40º p.o., em G, área cicatricial de ferida que não recebeu a membrana, em H, área cicatricial de ferida que recebeu a membrana, no mesmo animal. Nota-se infiltrado inflamatório polimorfonuclear e fibroplasia menos intensos na área cicatricial da ferida onde foi aplicada a membrana. (coloração H.E., 400x)



DISCUSSÃO

5.1 Material e Método

5.1.1 Material

Embora não existam modelos de cicatrização de feridas em roedores que reproduzam fielmente os mecanismos de cicatrização cutânea em seres humanos, estes animais, principalmente os ratos, são utilizados, em virtude da facilidade de obtenção, manuseio e acomodação, resistência à manipulação, trauma cirúrgico e processos infecciosos. Além disso, os modelos de cicatrização cutânea em roedores têm a vantagem de apresentar uma aceleração no seu processo, tornando possível a obtenção de resultados das investigações em menor período de tempo^{43,45-48}. Assim, optou-se pela utilização do rato como modelo animal.

Entretanto, algumas considerações devem ser feitas quando se compara o processo de cicatrização cutânea no rato e nos seres humanos, relacionadas principalmente às diferenças morfológicas e funcionais da pele entre essas duas espécies. A principal desvantagem decorre do fato da cicatrização cutânea no rato depender principalmente da propriedade mecânica de contração da ferida, ao contrário do homem, que tem a epitelização como o fenômeno mais importante no processo de cicatrização. A maior contração da ferida observada no rato é consequência da presença de um músculo no panículo carnoso subcutâneo, ausente na espécie humana⁵³.

Nos estudos realizados em camundongos, tem sido empregados moldes de silicone que minimizam o efeito da contração, permitindo que o processo de cicatrização ocorra principalmente à custa da re-epitelização e da formação do tecido de granulação. As feridas em que foram utilizados os moldes apresentaram tempo mais prolongado para fechamento e aumento da formação de tecido de granulação, sem interferir na velocidade de re-epitelização⁴³.

A opção de se utilizar um modelo experimental de dupla lesão no dorso do animal, na linha média, teve o objetivo de tornar inacessível as feridas cirúrgicas às tentativas do animal para alcançá-las, além de possibilitar o emprego do mesmo animal como controle de si mesmo, pois, uma das lesões serviu de estudo e a outra de controle⁴⁹. O modelo de dupla lesão possibilitou, ainda, utilizar menor número de

animais de experimentação, conforme preceitua o artigo IV do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal em seus Princípios Éticos de Pesquisa.

Para minimizar a interferência da força tênsil e da vascularização, que diferem nas regiões da pele do animal, foi realizado sorteio da lesão para receber a membrana, o que tornou fidedigna a comparação dos resultados do processo de cicatrização cutânea, reduzindo o efeito das variáveis anatômicas sítio específicas⁵⁶.

Tem sido demonstrado que os períodos mais adequados para o estudo do processo cicatricial cutâneo são o 7º, 14º e 21º p.o.¹¹¹; no presente estudo, além desses dias, incluiu-se também a avaliação no 40º p.o., para estudar os eventos tardios.

A depilação do dorso dos animais foi feita por tração manual, método que habitualmente não resulta em lesões na pele, diferentemente do que acontece quando são utilizadas lâminas para a tricotomia¹¹².

Em alguns trabalhos tem sido demonstrado que o gênero interfere no processo de cicatrização cutânea. Os estrógenos influenciariam a cicatrização das feridas cutâneas através da modulação da resposta inflamatória, da expressão das citocinas e da deposição da *matrix*, promovendo a aceleração da re-epitelização, além de estimular a angiogênese e a contração da ferida e de regular a proteólise¹¹³⁻¹¹⁸. Outro estudo realizado em camundongos, no entanto, não evidenciou interferência do gênero no processo de re-epitelização, demonstrando apenas discreta contração entre as fêmeas¹¹⁹. Neste estudo, não foram evidenciadas alterações de cicatrização entre os gêneros frente aos parâmetros analisados.

A população de animais do presente estudo apresentou uma variação de seis meses, dispersão que poderia comprometer a uniformidade da amostra. Os animais poderiam apresentar diferentes características morfofuncionais da pele, interferindo na dinâmica do processo cicatricial; no entanto, em estudo no qual foi utilizado ratos da espécie *Wistar* com idades variando de dois dias a 34 meses, ficou demonstrado que a espessura da epiderme diminui até por volta da 4ª semana de vida, permanecendo constante a partir de então. A densidade dos feixes de colágeno por área não se modificou entre as idades de um a 34 meses, conforme análise das imagens por morfometria¹²⁰. Portanto, baseado nesses dados, a variação da idade dos animais utilizados no presente estudo, não foi considerada como fator de confusão em relação ao processo de cicatrização cutânea.

5.1.2 Método

Nos últimos 40 anos, o estudo dos cuidados das feridas cutâneas tem avançado consideravelmente. À medida que o conhecimento científico progride, faz-se necessário a utilização de ferramentas confiáveis para mensuração do processo de cicatrização, a fim de se avaliar os diferentes tratamentos empregados. As mensurações macroscópicas da área e do diâmetro médio das regiões cicatriciais, além da contagem do número de vasos e determinação da espessura epitelial por meio de imagens digitais, utilizou recursos de informática, como o programa de análise de imagens digitais (Image Processing and Analysis in Java – ImageJ), método já consolidado^{118,121,122}. O método é confiável e fornece uma avaliação objetiva e reproduzível. A utilização de ferramentas de avaliação quantitativa teve como objetivo a obtenção de dados numéricos do processo cicatricial, evitando-se a subjetividade de uma análise histológica qualitativa.

Os biomateriais devem ser submetidos a testes de biocompatibilidade para avaliar como eles e seus extratos interagem com os diversos sistemas orgânicos. Um material, para ser considerado biocompatível, não deve causar reações adversas após implantação, tais como: irritação, inflamação, reação imunológica e desprender componentes. De acordo com as normas do *Food and Drug Administration* (FDA), os dispositivos médicos implantáveis e seus constituintes não devem produzir reação adversa local ou sistêmica, não ser carcinogênico, não afetar o sistema reprodutivo e o desenvolvimento^{123,124}. A citotoxicidade da membrana de biopolímero foi testada *in vitro* por meio da produção de óxido nítrico, do índice de adesão e da viabilidade celular de macrófagos alveolares. O BCA apresentou baixa citotoxicidade e alta biocompatibilidade frente aos três ensaios de citotoxicidade⁶.

5.2 Resultados

Em estudos realizados em cães, a utilização de membrana do BCA *in natura*, ainda com açúcares residuais, na cicatrização de feridas cutâneas, resultou em crescimento acelerado do tecido de granulação na fase inicial da re-epitelização com um tempo cicatricial menor, comparando-se com a terapêutica convencional à base de antissépticos e pomadas^{5,102}. No presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao tempo em que ocorreu a

epitelização completa das lesões, embora tenha sido evidenciado, à microscopia óptica, uma extensão epitelial menor nas feridas que receberam a membrana, sem diferença estatisticamente significativa, com exceção dos animais sacrificados no 7º p.o. Foi demonstrada também a presença de tecido de granulação em menor intensidade nas feridas onde se aplicou a membrana do BCA, confirmado pelos achados histológicos de um menor número de vasos neoformados, associadamente a um menor infiltrado inflamatório polimorfonuclear na área da lesão onde se utilizou a membrana do BCA. Esses achados podem indicar um processo de cicatrização mais avançado nas feridas onde se aplicou a membrana do BCA, observando-se uma diminuição da angiogênese, possivelmente decorrente da desintegração dos vasos neoformados através da apoptose, o que estaria ocorrendo num momento mais precoce quando se utilizou a membrana do BCA¹¹⁴. Tem sido considerado que uma das características da última fase do processo de reparação tecidual (fase de maturação) é a regressão endotelial¹²⁵.

Ocorreu redução da intensidade da fibroplasia com o decorrer do tempo, sendo mais acentuada essa redução nas feridas onde se aplicou a membrana do BCA, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa em comparação com as feridas que não receberam a membrana. Observação que denota um processo de substituição do tecido de granulação rico em fibroblastos ativados por um tecido cicatricial relativamente acelular, através da apoptose, desencadeada por mecanismos de sinalização ainda não totalmente esclarecidos, como tem sido evidenciado em um estudo experimental de cicatrização cutânea por segunda intenção, que avaliou a fragmentação do DNA *in situ* e através da análise morfométrica com o uso da microscopia eletrônica¹²⁶. Além dos fibroblastos, as células inflamatórias e a maioria dos vasos sanguíneos desapareceram do local da ferida com o decorrer do processo de maturação e remodelagem, como foi demonstrado também no presente estudo.

Esse mecanismo é importante porque, caso persista a celularidade no local, pode ocorrer a formação de cicatrizes hipertróficas ou quelóideanas¹²⁷. Considera-se que ocorreu um processo cicatricial em fases mais adiantadas nas feridas onde se utilizou a membrana do BCA, conforme demonstrado histologicamente pela menor celularidade, embora sem constatação de diferença estatisticamente significativa.

Demonstrou-se a presença de reação histiocítica e gigantocelular do tipo corpo estranho predominantemente nas lesões com membrana (14 lesões com

membrana x 07 lesões sem membrana), achado tipicamente encontrado nas reações em que se encontra material de difícil fagocitose. Tal achado poderia ser atribuído à presença da membrana no tecido em cicatrização que estaria desencadeando a reação tipo corpo estranho pelos macrófagos; entretanto, em algumas feridas que cicatrizaram espontaneamente, sem a presença da membrana, também foi demonstrado este aspecto histológico, o que leva a deduzir que a presença da membrana do BCA em contato com o leito da ferida, não seria um fator isolado para desencadear o processo, embora o tornasse mais frequente. Considerou-se que a observação de um maior tempo de permanência da membrana no leito das feridas que evidenciaram a reação histiocítica e gigantocelular do tipo corpo estranho (7,4 dias), contribuiu para a ocorrência desta reação.

A coloração pela HE foi utilizada, por se tratar de corante universal, usado rotineiramente para avaliações em estudos histológicos. É um método de coloração simples e barato, adequado para quantificar e identificar os elementos celulares envolvidos no processo cicatricial. Em trabalhos onde foram utilizadas colorações tipo *Picrosirius red* e tricrômio de Masson, os resultados obtidos foram semelhantes à HE¹²⁸⁻¹³⁰. A coloração pela técnica da hematoxilina-eosina revelou-se adequada, para análise dos resultados, não havendo necessidade do uso de colorações adicionais¹³¹.

A imunoistoquímica foi utilizada para confirmar a presença de queratinócitos nas áreas cicatriciais. Foi utilizado anticorpos monoclonais contra as citoqueratinas 5 e 14, pois, estas citoqueratinas estariam presentes em todos os queratinócitos, sendo expressas principalmente nas células da camada basal¹³². No estudo ficou comprovada a presença de queratinócitos, confirmada pela boa marcação com a utilização desses anticorpos, principalmente quando se usou os anticorpos contra a citoqueratina 14, que evidenciou uma marcação mais intensa. A marcação através dos anticorpos anti-citoqueratina 5 e 14, no presente estudo, ao contrário do que tem sido referido¹³², não ocorreu de forma predominante nas células da camada basal, mas, indiferentemente, em toda a espessura da epiderme, conforme se pode observar em exemplos ilustrados nas figuras 9 e 10.

Os curativos devem possuir certas características para ser considerados adequados⁹⁴. A membrana do BCA apresenta algumas dessas características, o que torna interessante seu emprego, especialmente nas feridas abertas; serve como barreira mecânica de proteção contra traumas e presença de materiais estranhos,

mantém um ambiente ocluído úmido e aquecido, favorecendo a epitelização e minimizando a dor pela proteção aos terminais nervosos expostos, promovendo a compressão do leito cruento diminuindo o edema e obliterando o espaço-morto. A ocorrência de uma menor intensidade da vascularização e do tecido de granulação, assim como um menor infiltrado inflamatório polimorfonuclear na área cicatricial das feridas onde se aplicou a membrana do BCA, embora sem significância estatística ao se comparar com as feridas controle, denota uma menor resposta inflamatória provavelmente em consequência da maior proteção oferecida pela membrana, que minimizaria os efeitos dos repetidos traumas sobre a ferida, principalmente durante as trocas do curativo.



CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos com a metodologia empregada, conclui-se que:

- As feridas onde foi aplicada a membrana do BCA apresentaram características de um processo cicatricial completo e estável, em comparação com aquelas que não receberam a membrana;
- As áreas cicatriciais das feridas que receberam a membrana do BCA evidenciaram clinicamente menos tecido de granulação;
- Os aspectos histopatológicos e morfométricos do processo cicatricial das feridas que receberam ou não a membrana do BCA foram semelhantes;
- A presença de queratinócitos nas áreas cicatriciais foi constatada em todas as feridas independentemente da presença ou não da membrana.



PERSPECTIVAS FUTURAS

Os achados encontrados no presente estudo permite projetar a realização de ensaios clínicos com a membrana do BCA como alternativa de curativo em feridas excisionais, promovendo proteção e abreviando o processo cicatricial. Pode-se ainda empregar este material no tratamento de queimaduras cutâneas.

O BCA tem a vantagem de ser custo-efetivo, por conta da natureza abundante da fonte de produção do material, além do que, por se tratar de um instrumento que não provoca poluição ou degradação no decorrer do processo de industrialização, pode também ser considerado como ecologicamente correto.



REFERÊNCIAS

1. Coelho COM, Rezende CMF, Tenório APM. Contração de ferida após cobertura com substitutos temporários de pele. *Ciênc Rural*. 1999; 29: 297-303.
2. Amorim E, Matias JEF, Coelho JCU, Campos ACL, Stahlke Jr HJ, Timi JRF, Rocha LCA, Moreira ATR, Rispoli DZ, Ferreira LM. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (Babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas - estudo controlado em ratos. *Acta Cir Bras*. [periódico na Internet] 2006; Suppl 2:67-66. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>
3. Hu K, Dai Y, Hu Q, Li J, Yuan J, Li J, Wu Q. An experimental study on the repair of full skin loss of nude mice with composite graft of epidermal stem cells. *Burns*. 2006; 32: 416-22.
4. Lima FR, Lima JRA, Hirakawa P, Medeiros Júnior MD, Lima FMT, Aguiar JLA. Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno[®] implantadas no peritônio parietal de ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*. 2005; 50: 37-40.
5. Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota RA, Tenório Filho F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras*. 2002; 17: 11-3.
6. Castro CMMB, Aguiar JLA, Melo FAD, Silva WTF, Marques E, Silva DB. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*. 2004; 39: 119-23.
7. Bellón JM, Buján J, Contreras LA, Carrera-San Martín A, Jurado F. Comparison of a new type of polytetrafluoroethylene patch (mycromesh) and polypropylene prothesis (Marlex) for repair of abdominal wall defects. *J Am Coll Surg*. 1996; 183: 11-8.
8. Vilar FO, Vasconcelos GB, Lima RFB, Lima SVC, Aguiar JL. Um novo material para tratamento da incontinência urinária: Estudo em ratas. *Acta Cir Bras*. 2005; 20: 319.
9. Silva DB, Aguiar JLA, Marques A, Coelho ARB, Rolim Filho EL. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar e fáscia autóloga em *Chinchilla laniger*. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 2006; 51: 45-51.

10. Chagas HM, Aguiar JLA, Andrade RT, Montoro M, Vilar FO, Lima SVC. Uso da membrana de biopolímero de cana-de-açúcar na reconstrução ureteral. Anais do 30º Congresso Brasileiro de Urologia; 2005 Outubro; Brasília, BR. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Urologia; 2005.
11. Lins EM. Membrana de biopolímero de cana-de-açúcar como remendo em arterioplastias femorais em cães [Tese de Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Cirurgia; 2007.
12. Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol.* 1990; 136: 1235-46.
13. Auger FA, Lacroix D, Germain L. Skin substitutes and wound healing. *Skin Pharmacology and Physiology* 2009; 22: 94-102.
14. Toscano MC, Mengue, SS. Avaliação do plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus no Brasil/Ministério da Saúde – Organização Pan-Americana da Saúde Brasília; ed MS, 2004. p.13.
15. Mustoe TA, Pierce GF, Morishima C, Deuel TF. Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. *J Clin Invest* 1991; 87: 694-703.
16. Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992; 140: 1375-88.
17. Pierce GF, Tarpley JE, Allman RM, Goode PS, Serdar CM, Morris B, Mustoe TA, Bande BJ. Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant plateletderived growth factor BB. *Am J Pathol* 1994; 145: 1399-410.
18. Steed DL. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Sur* 1998; 25: 397-405.
19. Hebda PA, Klingbeil CK, Abraham JA, Fiddes JC. Basic fibroblast growth factor stimulation of epidermal wound healing in pigs. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 626-31.
20. Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol* 2009; 84: 257-62.

21. Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface*. 2007; 4: 413–37.
22. Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev*. 2003; 17: 1189-200.
23. Escámez MJ, Martínez-Santamaría L, García M, Guerrero-Aspizua S, Carretero M, Larcher F. Bioengineered skin. In: Uday Khopkar, editor. *Skin biopsy-perspectives*. InTech 2011. p.261-96.
24. Sezer AD, Cevher E. Biopolymers as Wound Healing Materials: Challenges and New Strategies. In: Rosario Pignatello, editor. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. InTech 2011. p 383-414.
25. Nelson WG, Sun TT. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J Cell Biol*. 1983; 97: 244-51.
26. Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, Nathrath WBJ, Leigh IM, Lane EB. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci*. 1990; 97: 39-50.
27. Caplan AI. Embryonic development and the principles of tissue engineering. *Novart Fdn Symp*. 2003; 249: 17-25.
28. Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: Clark RAF, editor. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. 2nd ed. New York, London, Plenum, 1996. p 1–50.
29. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med*. 1999; 341: 738-46.
30. Sweitzer SM, Fann SA, Borg TK, Baynes JW, Yost MJ. What is the future of diabetic wound care? *Diabetes Educ*. 2006; 32: 197–210.
31. Chettibi S, Ferguson MWJ. Wound repair: an overview. In: Gallin JI, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p 864-81.
32. Lopes LGF, Mendes Júnior ECS, Sanches JA, Vidal MA, Bussolaro RA, Rocha AB. Epidemiologia do grande queimado de 2001 a 2003 atendidos na U.T.Q. da Faculdade de Medicina de Catanduva-SP. *Rev Klinikos*. 2004;19:83-88.
33. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Gene therapy and wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25: 79-92.

34. Jones SA, Wolf M, Qin S, Mackay CR, Baggiolini M. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *P Natl Acad Sci USA* 1996; 93, 6682–86.
35. Schaffer CJ, Nanney LB. Cell biology of wound healing. *Int Rev Cytol.* 1996; 169, 151–81.
36. Clark RA. The molecular and cellular biology wound repair. 2nd ed. New York: Plenum Press 1996.
37. Bayat A, McGrouther DA, Ferguson MW. Skin scarring. *Br Med J.* 2003; 326: 88–92.
38. Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29: 5-17.
39. Chanson M, Derouette J, Roth I, Foglia B, Scerri I, Dudez T et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *BBA* 2005, 1711: 197-207.
40. Lawrence CM, Comaish S, Dahl MGC. Excision of skin tumors without wound closure. *Br J Dermatol.* 1986; 115: 563 - 71.
41. Rivera AE, Spencer JM. Clinical aspects of full-thickness wound healing. *Clin Dermat* 2007; 25: 39–48.
42. Petroianu A. Aspectos éticos na pesquisa em animais. *Acta Cir Bras* 1996; 11: 157-64.
43. Galiano RD, Michaels J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* 2004, 12: 485-92.
44. Greenhalgh DG, Warden GD. Wound care models. In: Souba WW, Wilmore DW, editors. *Surgical research*. London: Academic Press, 2001. p 379–91.
45. Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen.* 2004; 12: 591–9.
46. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF, Santis-Isolan PMB, Oliveira RM, Arruda ECM. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir Bras.* 2006, 21: 55-65.

47. Cross SE, Naylor IL, Coleman RA, Teo TC. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg*. 1995; 48:189–97.
48. Mogford JE, Mustoe TA. Experimental models of wound healing. In: Falanga V, editor. *Cutaneous wound healing*. London: Martin Dunitz, 2001. p 109–22.
49. Cabral LM, Ferreira LM, Simões MJ, Mora AO. Experimental model of double wounds on the rats back, in order to study the skin cicatrization process on rat treated with cellulose coat. *Acta Cir Bras*. 2003, 18: 65-8.
50. Marx G, Mou X. Characterizing fibrin glue performance as modulated by heparin, aprotinin, and factor XIII. *J Lab Clin Med*. 2002; 140: 152–60.
51. Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res*. 1998; 290: S1–S11.
52. Lindblad WJ. Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies. *J Biomat Sci-Polym E*. 2008; 19: 1087-96.
53. Gottrup F, Agren MS, Karlsmark T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen* 2000;8:83–96.
54. Montandon D, D'Anoiran G, Gabbiani G. The mechanism of wound contraction and epithelialization: clinical and experimental studies. *Clin Plast Sur*. 1977; 4: 325–46.
55. Pirila E, Parikka M, Ramamurthy NS, Maisi P, McClain S, Kucine A, Tervahartiala T, Prikk K, Golub LM, Salo T, Sorsa T. Chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen promote wound healing in ovariectomized rats: effects on matrix metallo-proteinase-2, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and laminin-5 gamma2-chain. *Wound Repair Regen*. 2002; 10: 38–51.
56. Kullander S, Olsson A. On the tensile strength of healing cutaneous wounds in pregnant rats. *Acta Endocrinol*. 1962; 41: 314–20.
57. Walton AG & Blackweell J. *Biopolymers*. New York. Academic Press 1973. p 465-511.
58. Tager A. *Physical Chemistry of Polymers*, Moscow: Mir Publishers, 2^a ed., 1978. p 652.
59. Mano EB. *Introdução a polímeros*. Edgard Blucher. São Paulo, 3^a ed., 1985. p 111.

60. Odian G. Polyethylene. Principles of polymerization. John Wiley & Sons Co., Inc. New York. N.Y., USA, 3^a ed., 1991. p 305-656.
61. Canevarolo Jr. SV. Ciência dos polímeros. São Paulo: Artliber Editora LTDA; 2004.
62. Khachatoorian R, Petrisor IG, Kwan C, Yen TF. Biopolymer plugging effect: laboratory-pressurized pumping flow studies. J Petrol Sci Eng. 2003; 38: 13-21.
63. Lopes LMA, Andrade CT. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. Rev Quim Ind. 1995; 703: 19-23.
64. Shuterland IW. Industrially useful microbial polysaccharides. Microbiol Sci. 1996; 3: 5-9.
65. Shuterland IW. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends Biotechnol. 1998; 16: 41-6.
66. Thomazine JA, Freitas MAS, Lachat JJ, Coutinho Neto J, Cherri J. Structural and ultrastructural study of the luminal surface of femoral arteries of dogs submitted at arterioplasty with implants of prosthesis manufactured from natural latex of Hevea Brasilienses. Acta Microsc. 2001; 2: 263-64.
67. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesised cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. Prog Polym Sci. 2001; 26: 1561-603.
68. Ewald E, Malafaia A, Matias JEF. Celulose liofilizada para fechamento do retroperitônio em ratos. Arq Bras Cir Dig. 2001; 14: 129-32.
69. Nemetz AP, Loures DRR, Coelho JCU. Efeito estrutural da utilização de celulose biossintética e politetrafluoretileno expandido como substitutos do peritônio em cães. Arq Bras Cir Dig. 2001; 14: 139-42.
70. Sutherland IW. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. Int Dairy J. 2001; 11: 663-74.
71. Souza AMG. Aplicação clínica do biopolímero da mamona para reconstrução de falhas ósseas após ressecção de tumores no esqueleto apendicular [Tese de Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Cirurgia, 2002.
72. Leonel ECF, Porciúncula HF, Andrade Sobrinho J, Ramalho LTO, Mangilli PD, Rapoport A. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. Acta Cir Bras. 2004; 19: 342-50.
73. Entcheva E, Bien H, Yin L, Chung CY, Farrel M, Kostov Y. Functional cardiac cell constructs on cellulose-based scaffolding. Biomaterials. 2004; 25:5753-62.

74. Paulo NM, Lima FG, Siqueira-Júnior JT. Membrana de látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polisina a 0,1% e tela de marlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. *Acta Cir Bras*. 2005; 20: 2005-305.
75. Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*. 2005; 26:419-31.
76. Cavalcante AHM, Carvalho LB, Carneiro-da-Cunha MG. Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. As a film support for trypsin immobilization. *Bioch Eng. J* 2006; 4203: 1-4.
77. Bobbio FO, Bobbio PA. Introdução à química de alimentos. São Paulo: Varela Ltda; 1989. p 223.
78. Brock TD, Madigan MT. *Biology of microorganisms*. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall International Editions; 1991. p 874.
79. Glazer N, Nikaido H. *Microbial biotechnology fundamentals of applied microbiology*. New York: Company; 1995. p 642.
80. Sanford PA, Baird J. Industrial utilization of polysaccharides. In: Aspinall GO, editor. *The polysaccharides*, New York: Academic Press; 1983. p 411.
81. Kennedy JF, White CA. Bioactive carbohydrates. In: *Chemistry, Biochemistry and Biology*. England: Ellis Horwood Limited; 1993. p 319.
82. Sutherland IW. *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge: Cambridge University Press; 1990. p 163.
83. Roller S, Dea ICM. Biotechnology in production and modification of biopolymers for foods. *Crit Rev Biotechnol*. 1992; 12: 261-75.
84. Roseiro JC, Esgalhado ME, Collaço MTA, Emery AN. Medium development for xanthan production. *Process Biochem*. 1992; 27: 167-75.
85. Yalpani M, Sandford P. Commercial polysaccharides: recent trends and developments. In: *Industrial polysaccharides – Progress in Biotechnology*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam; 1987. p 311-36.
86. Calazans GMT, Lopes CE, Lima RMOC, França FP. Antitumour activities of levans produce by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol Lett*. 1997; 19: 19-21.
87. Masaoka S, Ohe T, Sakota N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *J Ferment Bioeng*. 1993; 75: 18-22.

88. Almeida UL, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W. Biotecnología industrial. Procesos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard, São Paulo, SP, Brasil; 2001. p 219-45.
89. Okiyama A, Motoki M, Yamanaka S. Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials. Food Hydrocolloid. 1992; 6: 479-87.
90. Slezak A, Kucharzewski M, Jasik-Slezak J. Medical properties of the membrane dressing made of bacterial cellulose. Polim Med. 2005; 35: 23-31.
91. Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM. Microbial cellulose – the natural power to heal wounds. Biomaterials. 2006; 27:145-51.
92. Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. J Biomed Mater Res A. 2006; 76: 431-8.
93. Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM. The future prospects of microbial in biomedical applications. Biomacromolecules. 2007; 8: 1-12.
94. Barud HS, Regiane T, Barrios C, Marques RFC, Molina C, Verelst M, Dexpert-Ghys J, Messaddeq Y, Ribeiro SJL. Membranas de celulose bacteriana contendo nanopartículas de prata. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007.
95. Thomas S. A review of the physical, biological and clinical properties of a bacterial cellulose wound dressing. J Wound Care 2008; 17: 349-52.
96. Mendes PN, Rahal SC, Pereira-Junior OC, Fabris VE, Lenharo SL, de Lima-Neto JF, da Cruz Landim-Alvarenga F. In vivo and in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. Acta Vet Scand. 2009; 51: 12-5.
97. Jung R, Kim Y, Kim HS, Jin HJ. Antimicrobial properties of hydrated cellulose membranes with silver nanoparticles. J Biomater Sci Polym Ed. 2009; 20: 311-24.
98. Solway DR, Clark WA, Levinson DJ. A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers. Int Wound J 2011; 8: 69-73.
99. Han YD. Microbial levan. Adv Appl Microbiol. 1990; 35: 171-94.
100. Peterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros VA. Cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. Carbohydr Polym. 2000; 42: 375-83.

101. Melo FAD. Contribuição ao Estudo Cinético da Produção de Polissacarídeo Extracelulares por *Zoogloea* sp em Melaço de Cana-de-Açúcar, [Tese de Doutorado], Recife; 2003.
102. Melo FAD, Coelho MCOC, Ferreira VM, Monteiro VL, Carrazzone PG. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. Anais 7º Congresso STAB, 25 a 28 de outubro. Londrina, Paraná, Brasil; 1999. p 251-5.
103. Lionelli GT, Lawrence WT. Wound dressings. Surg Clin North America. 2003; 83: 617–38.
104. Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds of the skin in the young domestic pig. Nature. 1962; 193: 293–4.
105. Snowden JM, Kennedy DF, Cliff WJ. Wound contraction: the effects of scab formation and the nature of the wound bed. Aust J Exp Biol Med Sci. 1982; 60:73–82.
106. Varghese MC, Balin AK, Carter DM, Caldwell D. Local environment of chronic wounds under synthetic dressings. Arch Dermatol. 1986; 122(1): 52–7.
107. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. Surgery. 1981; 90: 262–70.
108. Alvarez OM, Mertz PM, Eaglstein WH. The effect of occlusive dressings on collagen synthesis and reepithelialization in superficial wounds. J Surg Res. 1983; 35: 142–8.
109. Alvarez O, Rozint J, Wiseman D. Moist environment: matching the dressing to the wound. Wounds; 1989; p.35–51.
110. Barnett A, Berkowitz RL, Mills R, Vistnes LM. Comparison of synthetic adhesive moisture vapor permeable and fine mesh gauze dressings for split-thickness skin graft donor sites. Am J Surg. 1983; 145: 379–81.
111. Simões MJ, Cabral ACV, Boyaciyar K, Kulay Jr I, Sasso WS. Aspectos ultraestruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. Rev Paul Med. 1986; 104: 132-5.
112. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. Acta Cir Bras. 2006; 21: 55-65.
113. Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz

- GS, Ferguson MW. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. *Nat Med*. 1997; 3: 1209- 15.
114. Ilan N, Mahooti S, Madri JA. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci*. 1998; 111: 3621-31.
 115. Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol*. 1999; 155: 1137- 46.
 116. Gilliver SC, Ashworth JJ, Ashcroft. The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25: 56-62.
 117. Gilliver SC, Ashcroft GS. Sex steroids and cutaneous wound healing: the contrasting influences of estrogens and androgens. *Climateric*. 2007; 10: 276-288.
 118. Wendelken ME, Berg WT, Lichtenstein P, Markowitz L, Comfort C, Alvarez OM. Wounds measured from digital photographs using photodigital planimetry software: validation and rater reliability. *Wounds*. 2011; 23: 267-75.
 119. Gerharz M, Baranowsky A, Siebolts U, Eming S, Nischt R, Krieg T, Wickenhauser C. Morphometric analysis of murine skin wound healing: Standardization of experimental procedures and impact of an advanced multitissue array technique. *Wound Rep Reg*. 2007; 15: 105–12.
 120. Voros E, Robert AM. Changements histomorphométriques de la peau de Rat en fonction de l'âge. *C R Soc Biol*. 1993; 187: 201-9.
 121. Langemo DK, Melland H, Olson B, Hanson D, Hunter S, Henly SJ, Thompson P. Comparison of two wound volume measurement methods. *Adv Skin Wound Care*. 2001; 14: 190–6.
 122. Richard JL, Daures JP, Parer-Richard C, Vannereau D. Of mice and wounds: reproducibility and accuracy of a novel planimetry program for measuring wound area. *Wounds* 2000; 12: 148–54.
 123. US Food and Drug Administration. Electronic and information technology accessibility standards economic assessment. [serial Internet]. Nov 2000. [citado em 2011 Out 11]. Available from: www.fda.gov/accessibility.html.
 124. Lucena RG. Utilização do biopolímero da cana-de-açúcar como novo material para sling pubo vaginal: análise estereológica. [Tese de Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Cirurgia; 2007.

125. Modolin M, Bevilacqua RG, Ruy G. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. *Rev Bras Clin Terap*, 1985; 14: 208-13.
126. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995; 146: 56-66.
127. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther*. 1991; 52: 407-22.
128. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997; 77: 509-28.
129. Oliveira AB. Espectrofotometria no controle de qualidade de fitoterápicos da *Schinus terebinthifolius* Raddi: uso de marcadores. [Dissertação-Mestrado]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2001.
130. Mesquita LAF. Estudo da cicatrização cutânea causada pelo laser de CO₂ ultrapulsado em retalho dorsal de ratos. [Dissertação-Mestrado]. Curitiba: Instituto de Pesquisas Médicas, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba; 2002.
131. Nunes Jr JAT, Ribas-Filho JM, Malafaia O, Czezko NG, Inácio CM, Negrão AW, Lucena PLH, Moreira H, Wagenfuhr Jr J, Cruz JJ. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) no processo de cicatrização da linea alba de ratos. *Acta Cir Bras*. 2006; 21: 8-15.
132. Nelson WG, Sun TT. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J. Cell Biol* 1983; 97: 244-51.



APÊNDICE

APÊNDICE A

Artigo original da Tese submetido ao Journal of Biomaterials Applications

MEMBRANA DO BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇÚCAR NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS INDUZIDAS, EM RATOS

Maurilio Toscano de Lucena¹, José Lamartine de Andrade Aguiar², Mário Ribeiro de Melo Júnior³, Mariana Montenegro de Melo Lira³, Célia Maria Machado Barbosa de Castro⁴, Leonardo Aguiar Cavalcanti⁴

*Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CCS-UFPE),
Departamento de Patologia do CCS-UFPE

¹Doutor em Cirurgia, Médico Coloproctologista do Hospital Barão de Lucena, Recife-PE

²Prof. Associado do Departamento de Cirurgia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CCS-UFPE

³Professores Adjuntos do Departamento de Patologia – CCS-UFPE

⁴Profa. Associado do Departamento de Medicina Tropical – CCS-UFPE

⁵Estudante de Medicina da UFPE

Correspondência: Rua Frei Jaboatão, 180 – apto. 1201 – Torre – Recife-PE – CEP 50710-030 – Fone: (81) 9174-9541 - e-mail:mtlucena@oi.com.br

ABSTRACT

The skin is an organ that is frequently exposed to trauma that may lead to solutions of continuity. In skin trauma, when the loss of tissue is substantial, a delay in healing occurs as a result of the organization of the wound healing process and the slow rate of reproduction of the epithelial cells. The use of a dressing to impermeabilize the wound and serve as a conduit for the epithelial cells could result in protection against trauma, a speedier epithelization and greater comfort for the patient. The sugarcane biopolymer is an atoxic biocompatible polysaccharide, obtained from the synthesis of the Gram-negative bacteria of the genus *Zoogloea* belonging to the *Pseudomonadaceae* family, from the molasses of the sugarcane, which can perform the transitory function of a wound protector and cell conduit. The aim of the use of a membrane of the sugarcane biopolymer in the treatment of excisional wounds in rats was to evaluate the conducting activity of the epithelial cells, the degree of protection of the wound and the reduction in healing time. Forty *Wistar* rats of both sexes were used, in which the skin lesions were reproduced by excising two total thickness flaps from the skin of the dorsal region. A membrane of the biopolymer was applied on one of the wounds from the study group, chosen by draw, and a conventional dressing with lavage using saline solution performed on a wound that served as the control group. The clinically observed total healing time of the two lesions was practically the same (21 days with the membrane and 20 days without the membrane), and the membrane remained adhered to the exposed wound bed for a mean duration of six days. A comparison of the digitalized images likewise failed to show any statistically significant differences with regard to the area and mean diameter of the lesions at the times of evaluation (postoperative days 2, 7 and 14). The animals were sacrificed on the 7th, 14th, 21st and 40th days after surgery for the collection of the material from the wound and scars for histopathology and immunochemistry studies. Evaluations were made of the intensity of the polymorphonuclear and lymphonuclear inflammatory infiltrates, the fibrosis, the fibroplasia and the crust. Digital photographs were obtained from the histological preparations for determination of the thickness of the epithelium and the neoformed vessel count. No statistically significant differences were found between the parameters evaluated in the experimental and control groups, despite the lower intensity of the polymorphonuclear inflammatory infiltrate and fibroplasia, as well as the lower number of vessels in the scar tissue of the lesions to which the membranes were applied. It is concluded that the wounds to which the sugarcane membrane was applied, presented, on the histopathology and morphometric studies, features of a complete and stable healing process as compared with those which did not receive the membrane.

Key words: Biopolymers, membranes, wound healing, sugarcane, epithelial cells, rats.

INTRODUÇÃO

A pele é frequentemente exposta a traumatismos que podem provocar soluções de continuidade; quando a perda de tecido é extensa, ocorre um retardo na cicatrização decorrente do lento processo de reprodução celular epitelial¹.

A cicatrização tecidual é descrita como um evento sequencial, no qual os sinais de um tipo de célula iniciam a cascata de outros tipos celulares, avançando nas diversas fases de cicatrização. É, portanto, um processo interativo que envolve a liberação de mediadores solúveis, componentes da matrix extracelular, células residentes (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células nervosas) e subtipos de leucócitos que infiltram a ferida, participando nas diversas fases da cicatrização²⁻⁴.

Feridas lacerantes, úlceras, queimaduras, ressecções extensas de pele após tratamento de neoplasias e correções cirúrgicas de defeitos cutâneos exigem tratamento especializado para se obter retorno funcional e anatômico da região. Em extensas perdas cutâneas ocorre retardo ou até mesmo impossibilidade de aproximação das margens epiteliais da lesão, necessitando de confecção de retalhos para reparar a área desepitelizada ou aguardar a cicatrização por segunda intenção, que é um processo mais lento. Isto produz comumente cicatriz pronunciada, com retração e aumento de custo¹.

O desenvolvimento de um substituto de pele adequado poderia acarretar um impacto positivo no cuidado destes pacientes. O substituto adequado para a pele deve desempenhar imediatamente a função da derme e epiderme perdidas, porém, o substituto ideal ainda não foi desenvolvido⁵.

O biopolímero da cana-de-açúcar (BCA) é um exopolissacarídeo obtido pela síntese de bactérias Gram negativas do gênero *Zoogloea* pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, a partir do melaço da cana-de-açúcar. A estrutura química do biopolímero puro é constituída por diferentes monossacarídeos: glicose 87,57%, xilose 8,58%, ribose 1,68%, ácido glicurônico 0,83%, manose 0,82%, arabinose 0,37%, galactose 0,13%, ramnose 0,01% e fucose 0,01%^{6, 7}. O BCA em estado de pureza apresenta elasticidade, resistência à tração, flexibilidade e ainda pode ser modelado em diferentes formas, características físico-químicas fundamentais para a confecção de implantes biológicos⁸. Deve-se ressaltar ainda que este polímero é constituído apenas de polissacarídeos e de ácido glicurônico que, diferentemente de

outros polímeros biológicos, não contém em sua estrutura, componentes aminados, característica que não induz resposta antigênica. Além disso, tem demonstrado boa aderência ao leito da ferida, podendo ser utilizado por tempo prolongado e se adaptando aos contornos da lesão, sendo de baixo custo, fácil armazenamento e manuseio, durável, flexível e resistente ao estiramento.

A proposta de utilização da membrana do BCA no tratamento de feridas excisionais interessando a pele e o tecido celular subcutâneo no dorso de ratos, teve como objetivo avaliar a eficácia da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas excisionais induzidas, em ratos.

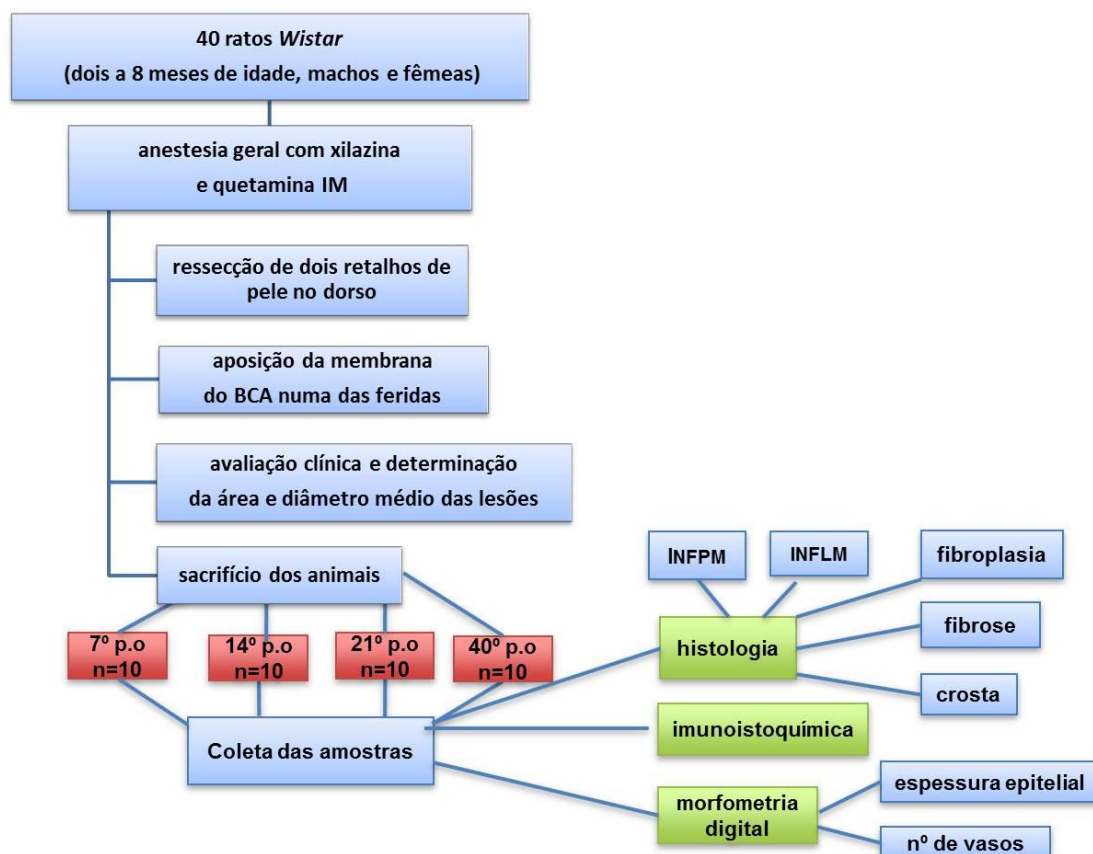
MATERIAL E MÉTODOS

Animais de Experimentação

Foram utilizados quarenta ratos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mamalia*), com idade variando de 2 a 8 meses e peso médio de 303g, de ambos os gêneros (19 machos), procedentes do Biotério José Paulino, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

Desenho do Estudo

O presente estudo enquadrou-se na tipologia de ensaio biológico ou dos estudos de intervenção ou experimentais, que constituem um tipo especial do estudo de coorte.



Procedimento Cirúrgico

O preparo pré-operatório envolvia ingestão exclusiva de água. Cada animal foi submetido a anestesia com uma solução de cloridrato de cetamina na dose de 5mg/100g de peso e cloridrato de xilazina na dose de 2mg/100g de peso, aplicada por via intramuscular. Dez minutos antes da anestesia foi aplicado sulfato de atropina, por via intramuscular, na dose de 0,044mg/Kg⁹.

Os animais foram submetidos a duas excisões de retalho de pele e panículo carnoso subjacente, medindo 1,0 x 1,0cm. Para delinear o retalho, foi utilizado um molde metálico e caneta dermatográfica, a fim de uniformizar a demarcação e os limites da incisão. A ferida cranial foi realizada na linha média no dorso de cada animal, 3cm abaixo de uma linha imaginária que cruzava a borda inferior das orelhas, sendo a lesão caudal localizada a 2 cm de distância do limite inferior da ferida cranial. Após o procedimento cirúrgico, foi aplicada a membrana do BCA numa das feridas por sorteio, lavagem com soro fisiológico das duas lesões e curativo de proteção com gazes estéreis e esparadrapo, sendo a troca realizada a cada dois ou três dias (Figura 1).

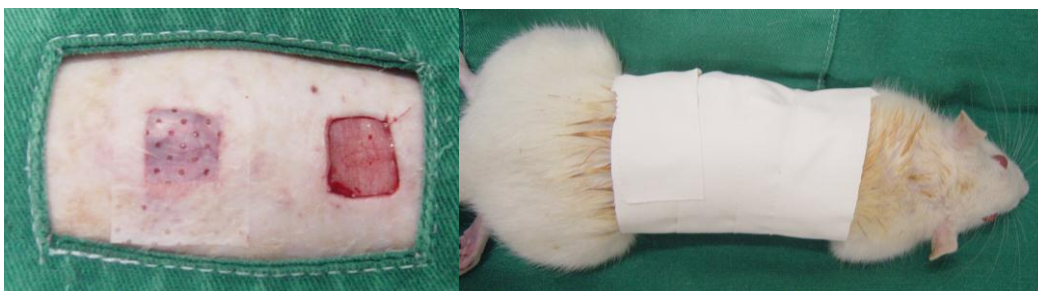


Figura 1. Aposição da membrana fenestrada do biopolímero da cana-de-açúcar numa das feridas no dorso do animal e curativo de proteção.

Após quatro momentos distintos do pós-operatório (7, 14, 21 e 40 dias), os animais foram sacrificados, por meio da administração intraperitoneal de doses letais de tiopental sódico, visando a coleta de material das feridas e cicatrizes para estudo histopatológico e imunoistoquímica.

Avaliação clínica

Os animais foram submetidos a exame clínico diário, observando-se comportamento, consumo de alimentos e, no sítio cirúrgico, presença de exsudatos e sinais flogísticos.

As feridas cirúrgicas foram fotografadas com uma câmera digital de 4,0 *megapixels* e *zoom* óptico de 3x (Sony® Cybershot DSC-P9, Japão) fixada a um suporte próprio, a 20cm da superfície da mesa, com uma distância focal de 8mm. As imagens foram transferidas para um computador com *software* de domínio público de análise de imagens digitais (Image Processing and Analysis in Java – ImageJ 1.46e, National Institute of Health, USA) para obtenção do diâmetro médio (média da soma dos diâmetros longitudinal e transversal) e da área cicatricial em *pixels* através do traçado de linhas (Figura 2).

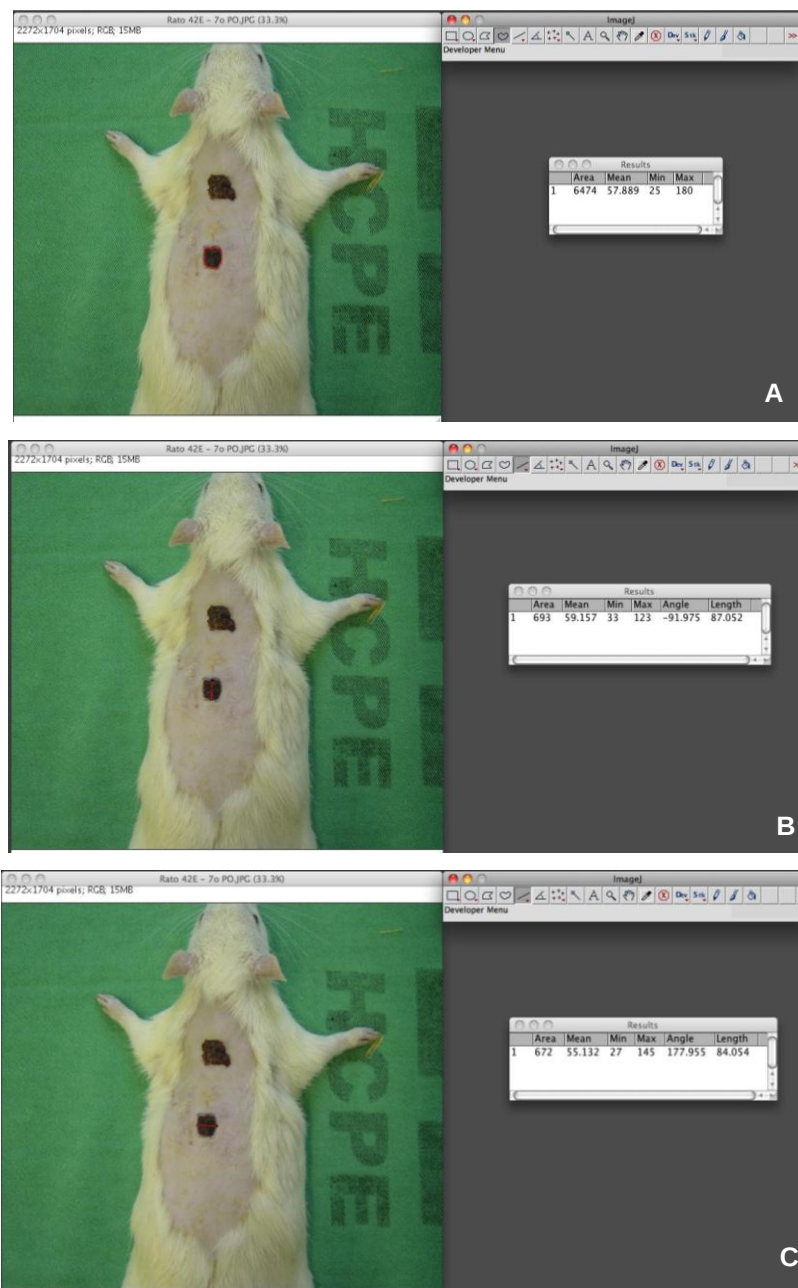


Figura 2. Determinação da área (A) e dos diâmetros longitudinal (B) e transversal (C) das feridas através do programa de análise digital de imagens - ImageJ.

Avaliação histológica

As amostras foram obtidas através da excisão de toda a extensão da área cicatricial, com uma margem de aproximadamente 1cm de pele íntegra após o sacrifício dos animais, nos períodos de observação pré-estabelecidos. As peças cirúrgicas foram montadas em papelão e fixadas em formol tamponado a 10%. Cada área cicatricial foi fotografada utilizando uma câmera digital e mensurado o maior

diâmetro, em milímetros, com o auxílio de um paquímetro digital (Lee Tools, China). Após inclusão em parafina, foram realizados cortes de 5µm com a utilização do micrótomo, na direção perpendicular em relação à superfície da pele no centro da amostra. As lâminas foram confeccionadas e coradas pela técnica da hematoxilina-eosina.

Através da microscopia óptica, foram analisadas as intensidades dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da fibrose, da fibroplasia, além da presença e intensidade da crosta. Utilizou-se, para avaliação semiquantitativa dos aspectos analisados, o escore representado no quadro 1:

Quadro 1 - Categorização das variáveis relacionadas a cicatrização cutânea

Nome da variável	Categorização
Variáveis relacionadas a cicatrização cutânea	
Infiltrado inflamatório linfomononuclear	Área ocupada por células inflamatórias
	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Leve: <10% Escore 2 - Moderado: 11-50% Escore 3 - Intenso: >50%
Infiltrado inflamatório polimorfonuclear	Área ocupada por células inflamatórias
	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Leve: <10% Escore 2 - Moderado: 11-50% Escore 3 - Intenso: >50%
Fibrose	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Leve: Discreta, raras fibras em até 10% da área Escore 2 - Moderada: fibras dispersas, jovens, não modeladas, entre 10% e 75% da área Escore 3 - Intensa: fibras maduras, modeladas, entre 75 a 100% da área
Fibroplasia	Da área ocupada por fibroblastos ativados
	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Leve: < 10% Escore 2 - Moderada: 11-50% Escore 3 - Intensa: > 50%
Crosta	Escore 0 – Ausente Escore 1 - Intensidade discreta Escore 2 - Intensidade moderada Escore 3 - Intensidade acentuada

Foram feitas fotografias digitais de três a cinco campos, aleatoriamente selecionados, das preparações histológicas, com o auxílio de uma câmera (Moticam 1000 de 1,3 Mega Pixel) acoplada a um microscópio óptico (Motic BA 200), com as

objetivas de 10x e 40x, utilizando-se o *software Motic Images Plus 2.0ML* instalado em um computador. As imagens assim obtidas foram estudadas com o auxílio do *software* de análise de imagens digitais - ImageJ 1.46e, para determinação da espessura do epitélio e contagem dos vasos neoformados nas áreas cicatriciais. Foram realizadas, em média, 25 mensurações, para determinação da espessura epitelial, utilizando a objetiva de 10x, com cinco avaliações em cada campo. A contagem dos vasos neoformados foi feita com o aumento de 40x, avaliando-se em torno de cinco campos. Calculou-se a média aritmética para cada amostra (Figura 3).

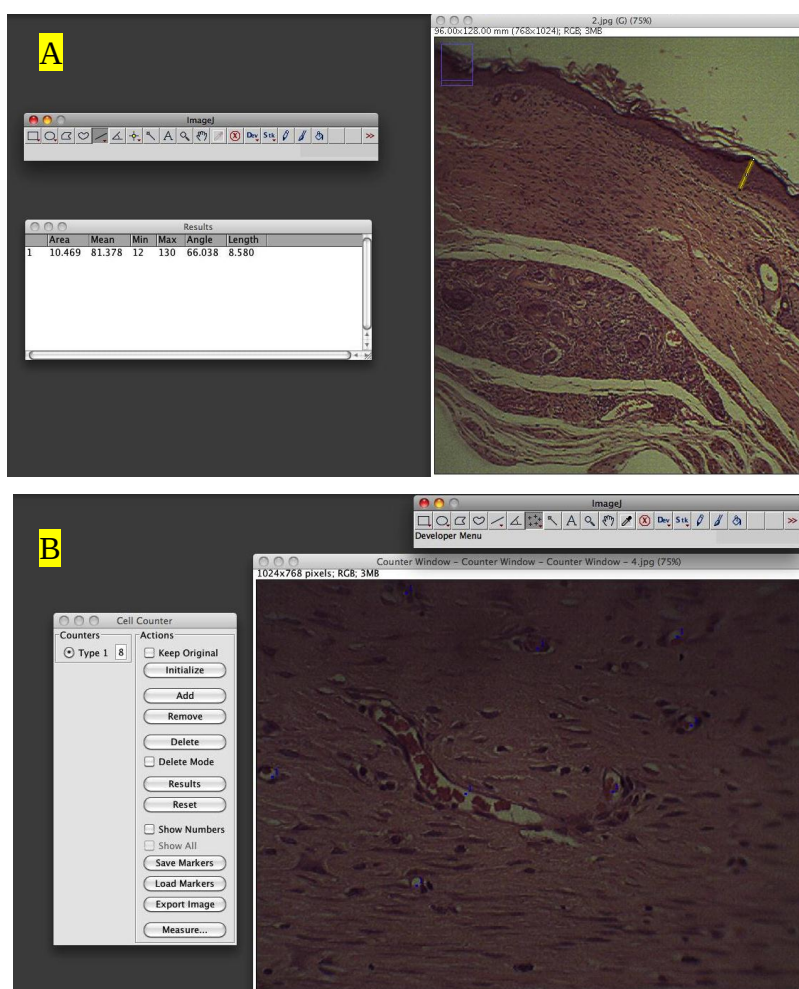


Figura 3. Determinação da espessura epitelial(A) e contagem dos vasos(B) na área cicatricial utilizando o programa de análise digital de imagens ImageJ (aumento de 100x e 400x respectivamente, coloração HE).

Metodologia da Imunoistoquímica.

Cortes histológicos com 5µm de espessura, foram obtidos a partir dos blocos de parafina dos espécimes teciduais. Utilizaram-se anticorpos monoclonais IgG1 de camundongos contra citoqueratinas 5/8 e 14 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA/USA). Um *steamer* foi empregado para recuperação antigênica por calor úmido. Para revelação, foi empregado o método da estreptoavidina-biotina-peroxidase¹⁰. A coloração foi realizada com 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB).

Análise estatística

As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e de dispersão. Foi aplicado o teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*, confirmando-se que as amostras apresentavam distribuição normal. Utilizou-se o teste t de *Student* pareado para comparação das variáveis numéricas – diâmetro médio, área, maior diâmetro após fixação e tempo de cicatrização – entre os grupos. Para as variáveis categóricas – infiltrado inflamatório polimorfonuclear e linfomononuclear, fibroplasia, fibrose e crosta – foram aplicados o teste do Qui-Quadrado e o teste Exato de Fisher. O nível de significância p, utilizado para se rejeitar a hipótese de nulidade, foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Observação clínica pós-operatória

Durante o período de estudo, dois ratos morreram no pós-operatório (1º e 2º dia do p.o.), resultando numa mortalidade de 5%. Os outros 38 animais apresentaram boa vitalidade após o procedimento cirúrgico, aceitando bem a dieta e mantendo a média de peso. As feridas em geral se encontravam secas e com presença de tecido de granulação, sendo mais evidente nas lesões onde não foi aplicada a membrana. Quatro animais apresentaram exsudação no leito da ferida, observada em duas lesões que receberam a membrana. A permanência média da membrana nos locais de implante foi de seis dias, variando de dois a 12 dias.

As médias das áreas e diâmetros médios, o maior diâmetro das áreas cicatriciais após fixação em formol e o tempo de cicatrização das feridas em que foi aplicada ou não a membrana, estão representados nos gráficos. (NUMERAR)

Gráfico 1 - Áreas das feridas nos grupos controle e experimental

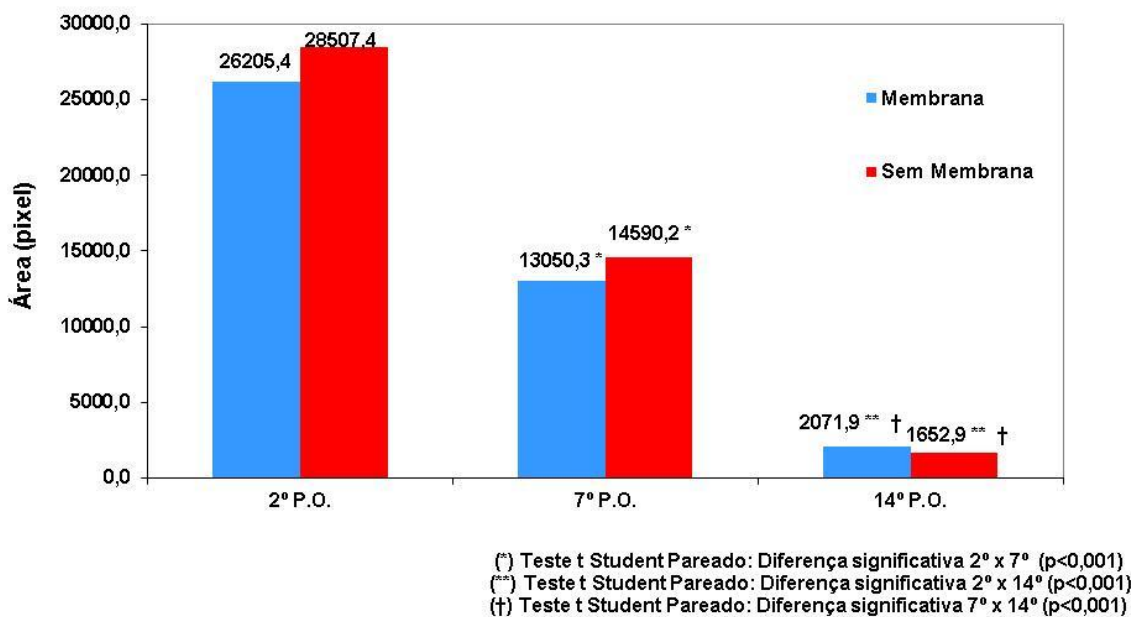


Gráfico 2 - Diâmetros médios das feridas nos grupos controle e experimental

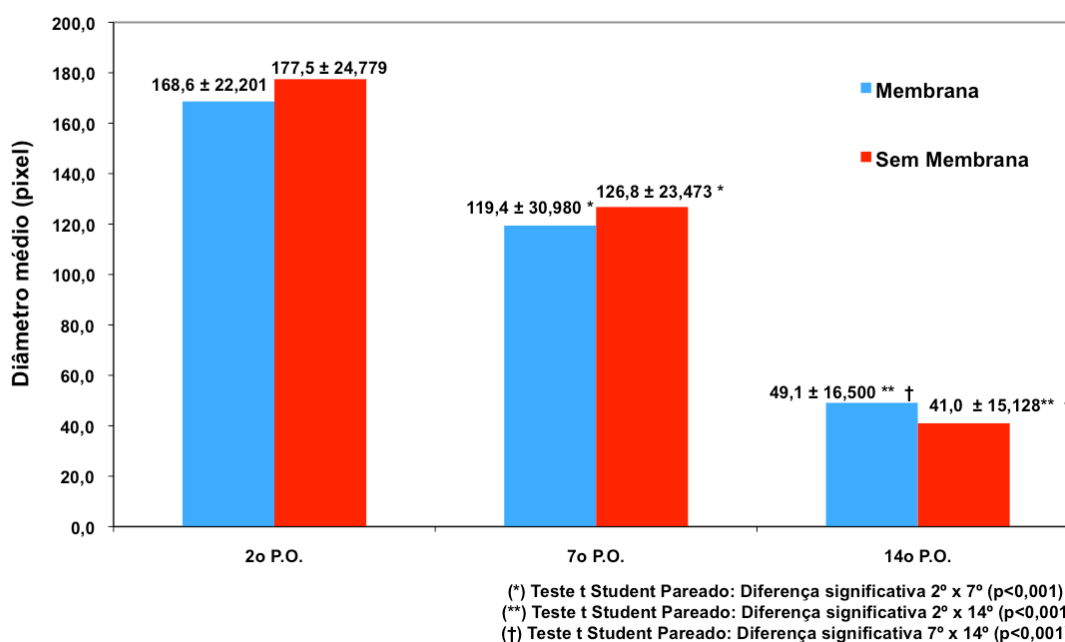


Gráfico 3 - Maiores diâmetros das feridas nos grupos controle e experimental

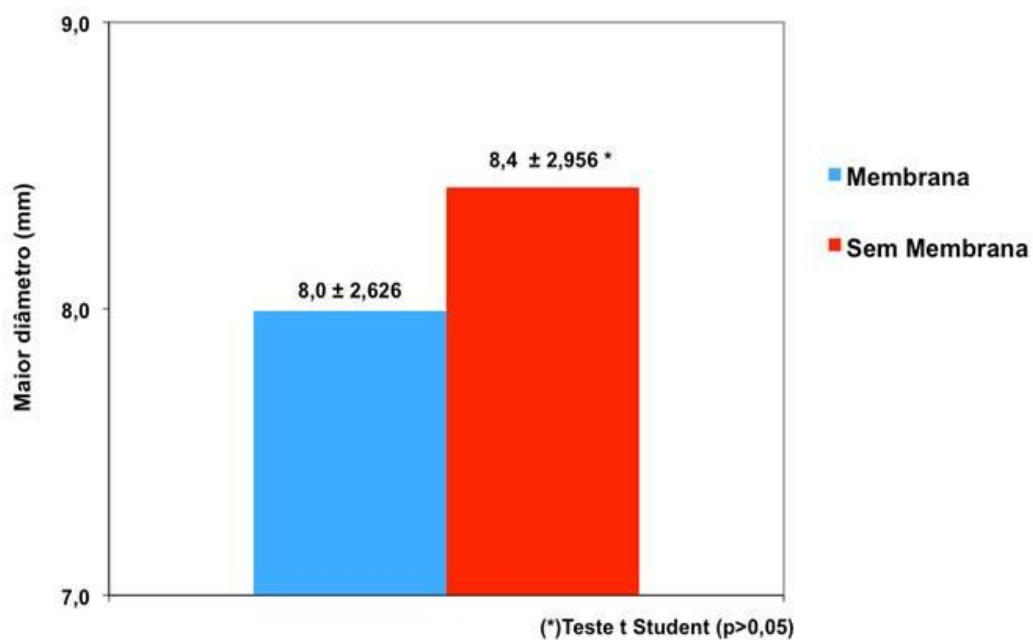
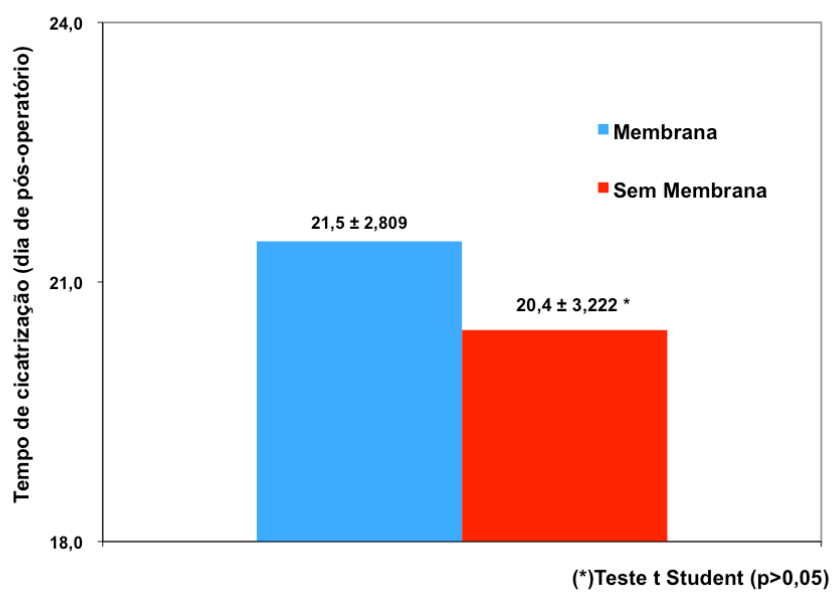


Gráfico 4 - Tempo de cicatrização das feridas nos grupos controle e experimental



Avaliação microscópica

O tempo médio de cicatrização completa de todas as feridas observadas clinicamente, foi de 21 dias, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as lesões que receberam a membrana (21dias) e aquelas que não receberam (20 dias).

As comparações dos diâmetros médios e das áreas das feridas, nos períodos pós-operatórios avaliados (2º, 7º e 14º p.o.), não demonstrou diferenças entre os grupos, embora tenha sido observado que, nas feridas onde se aplicou a membrana, tanto o diâmetro médio quanto a área foram menores no 2º e 7º p.o., ao contrário do observado no 14º p.o., quando o grupo que utilizou a membrana apresentou valores mais elevados desses parâmetros. Não foram realizadas as determinações da área e diâmetro médio nos animais sacrificados no 21º e 40º p.o., pois, nesses momentos, todas as feridas estavam completamente fechadas.

As comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os quatro momentos estudados no pós-operatório (7º, 14º, 21º e 40º p.o.) estão demonstradas nas tabelas 1 a 4. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes das variáveis histopatológicas avaliadas entre os grupos. No entanto, em todas as feridas onde se aplicou a membrana do BCA, exceto naquelas em que o sacrifício ocorreu no 21º p.o., chamou a atenção a presença de um infiltrado inflamatório polimorfonuclear menos intenso, além de uma vascularização menos acentuada.

Tabela 1 – Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais sacrificados no 7º p.o.

Variáveis	Áreas Cicatriciais				p-valor
	Com Membrana		Sem Membrana		
	n	%	n	%	
INFLM					
1	10	100,0	10	100,0	¥
INFPM					
0	1	10,0	0	0,0	0,370 *
1	6	60,0	4	40,0	
2	3	30,0	6	60,0	
Crosta					
1	0	0,0	1	10,0	0,582 *
2	3	30,0	1	10,0	
3	7	70,0	8	80,0	
Fibrose					
1	9	90,0	5	50,0	0,141 *
2	1	10,0	5	50,0	
Fibroplasia					
3	10	100,0	10	100,0	¥

(¥) Teste não aplicável (*) Teste Exato de Fisher

INFLM – infiltrado inflamatório linfomononuclear; INFPM - infiltrado inflamatório polimorfonuclear; p.o. – pós-operatório; os números abaixo de cada variável se referem aos valores dos escores.

Tabela 2 – Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais sacrificados no 14º p.o.

Variáveis	Áreas Cicatriciais				p-valor
	Com Membrana		Sem Membrana		
	n	%	n	%	
INFLM					
1	8	80,0	9	90,0	1,000 *
2	2	20,0	1	10,0	
INFPM					
0	2	20,0	1	10,0	0,068 *
1	7	70,0	3	30,0	
2	1	10,0	6	60,0	
Crosta					
1	4	40,0	4	40,0	1,000 *
2	3	30,0	4	40,0	
3	2	20,0	2	20,0	
Fibrose					
1	2	20,0	2	20,0	1,000 *
2	7	70,0	6	60,0	
3	1	10,0	2	20,0	
Fibroplasia					
1	4	40,0	1	10,0	0,303 *
2	6	60,0	9	90,0	

(*) teste exato de fisher

inflm – infiltrado inflamatório linfomononuclear; infpm - infiltrado inflamatório polimorfonuclear; p.o. – pós-operatório; os números abaixo de cada variável se referem aos valores dos escores.

Tabela 3 – Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais sacrificados no 21º p.o.

Variáveis	Áreas Cicatriciais				p-valor
	Com Membrana		Sem Membrana		
	n	%	n	%	
INFLM					
0	1	10,0	1	10,0	1,000 *
1	8	80,0	9	90,0	
2	1	10,0	0	0,0	
INFPN					
0	4	40,0	6	60,0	0,656 *
1	6	60,0	4	40,0	
Crosta					
0	3	30,0	4	40,0	1,000 *
1	5	50,0	4	40,0	
2	2	20,0	2	20,0	
Fibrose					
2	10	100,0	10	100,0	¥
Fibroplasia					
1	9	90,0	5	50,0	0,141 *
2	1	10,0	5	50,0	

(¥) Teste não aplicável (*) Teste Exato de Fisher

INFLM – infiltrado inflamatório linfomononuclear; INFPN - infiltrado inflamatório polimorfonuclear; p.o. – pós-operatório; os números abaixo de cada variável se referem aos valores dos escores.

Tabela 4 – Comparações dos escores de intensidade dos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e linfomononuclear, da crosta, da fibrose e da fibroplasia das áreas cicatriciais entre os animais sacrificados no 40º p.o.

Variáveis	Áreas Cicatriciais				p-valor
	Com Membrana		Sem Membrana		
	n	%	n	%	
INFLM					
0	5	50,0	1	10,0	0,141 *
1	5	50,0	9	90,0	
INFPM					
0	7	70,0	4	40,0	0,475 *
1	2	20,0	5	50,0	
2	1	10,0	1	10,0	
Crosta					
0	8	80,0	4	40,0	0,141 *
1	1	10,0	5	50,0	
2	1	10,0	1	10,0	
Fibrose					
2	4	40,0	4	40,0	1,000 *
3	6	60,0	6	60,0	
Fibroplasia					
0	0	0,0	2	20,0	0,474 *
1	9	90,0	8	80,0	
2	1	10,0	0	0,0	

(*) Teste Exato de Fisher

INFLM – infiltrado inflamatório linfomononuclear; INFPN - infiltrado inflamatório polimorfonuclear; p.o. – pós-operatório; p.o. – pós-operatório; os números abaixo de cada variável se referem aos valores dos escores.

Na avaliação histopatológica foi observada também a presença de reação histiocítica gigantomcelular do tipo corpo estranho, mais frequentemente encontrada nas lesões que receberam a membrana (14 lesões com membrana x 07 lesões sem membrana).

A presença do epitélio recém-formado foi confirmada através da imunoistoquímica, sendo a marcação mais intensa quando se utilizou os anticorpos contra as citoqueratinas 14 (figuras 4 e 5).

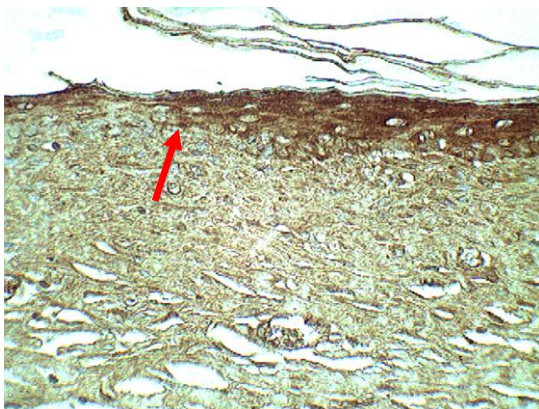


Figura 4. Imunoistoquímica com anticorpos contra citoqueratina 14 evidenciando área de re-epitelização em animal sacrificado no 21º dia de pós-operatório de implante da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar. A seta vermelha mostra a transição entre a superfície epitelizada e a não epitelizada (aumento de 400x).

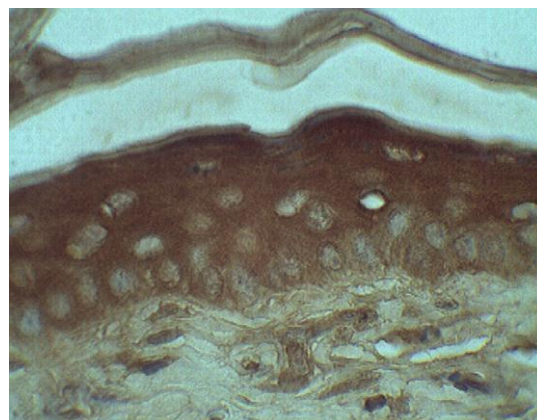


Figura 5. Queratinócitos marcados por imunoistoquímica utilizando anticorpos contra citoqueratina 14 em área de re-epitelização em animal sacrificado no 21º dia de pós-operatório de implante da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar (aumento de 1000x).

Na tabela 5 são mostrados os valores relativos às médias da espessura epitelial e do número de vasos das áreas cicatriciais dos grupos com e sem membrana.

Tabela 5 – Comparação dos valores relativos às médias da espessura epitelial e do número de vasos das áreas cicatriciais nos momentos de sacrifício no pós-operatório das feridas com e sem membrana.

Grupo	Áreas cicatriciais		p-valor *
	Com membrana Média ± DP	Sem membrana Média ± DP	
Grupo Total			
Espessura epitelial	5,67 ± 1,85	5,58 ± 1,91	0,829 *
Nº de vasos	8,64 ± 4,41	9,81 ± 4,71	0,254 *
Sacrifício no 7º p.o.			
Espessura epitelial	7,44 ± 1,94	6,67 ± 2,68	0,174 **
Nº de vasos	12,66 ± 4,17	14,18 ± 6,07	0,791 **
Sacrifício no 14º p.o.			
Espessura epitelial	6,04 ± 0,86	6,58 ± 0,97	0,131 **
Nº de vasos	9,69 ± 3,99	9,74 ± 3,67	0,880 **
Sacrifício no 21º p.o.			
Espessura epitelial	4,99 ± 1,64	4,80 ± 1,22	0,940 **
Nº de vasos	6,16 ± 3,25	6,82 ± 2,39	0,650 **
Sacrifício no 40º p.o.			
Espessura epitelial	4,21 ± 1,05	4,27 ± 1,11	0,940 **
Nº de vasos	6,05 ± 2,59	8,51 ± 2,69	0,075 **

(*) Teste t Student (**) Teste de Mann-Whitney
p.o. – pós-operatório.

Não foi demonstrado diferenças estatisticamente significantes em relação às médias da espessura epitelial e do número de vasos neoformados entre os grupos com e sem membrana, em todos os momentos analisados, embora tenhamos observado, uma menor quantidade de vasos nas feridas que receberam a membrana do BCA (figura 6).

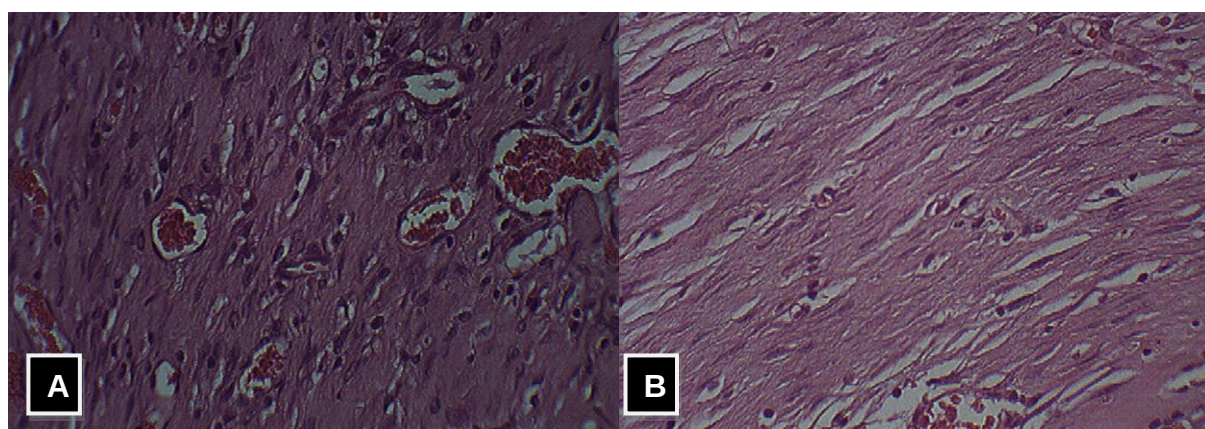


Figura 6. Achados histopatológicos das áreas cicatriciais em animal sacrificado no 14º pós-operatório, em A, ferida que não recebeu a membrana, em B, ferida em que a membrana foi aplicada no mesmo animal. Nota-se em B: vascularização menos acentuada, raros polimorfonucleares e linfomononucleares, além de menor fibroplasia. (coloração H.E., 400x)

DISCUSSÃO

Embora não existam modelos de cicatrização de feridas em roedores que reproduzam fielmente os mecanismos de cicatrização cutânea em seres humanos, estes animais, principalmente os ratos, são utilizados, em virtude da facilidade de obtenção, manuseio e acomodação, resistência à manipulação, trauma cirúrgico e processos infecciosos. Além disso, os modelos de cicatrização cutânea em roedores têm a vantagem de apresentarem uma aceleração no seu processo, tornando possível a obtenção de resultados das investigações em menor período de tempo¹¹⁻¹⁵. Assim, optou-se pela utilização do rato como modelo animal.

Entretanto, algumas considerações devem ser feitas quando se compara o processo de cicatrização cutânea no rato e nos seres humanos, relacionadas principalmente às diferenças morfológicas e funcionais da pele entre essas duas espécies. A principal desvantagem decorre do fato da cicatrização cutânea no rato ocorrer principalmente às custas da propriedade mecânica de contração das lesões, ao contrário do homem, que tem a epitelização como o fenômeno mais importante no processo de cicatrização. A maior contração da ferida observada no rato é consequência da presença de um músculo no panículo carnoso subcutâneo, ausente na espécie humana¹⁶.

Tem sido demonstrado que os períodos mais adequados para o estudo do processo cicatricial cutâneo são o 7º, 14º e 21º p.o.¹⁷; no presente estudo, além desses dias, incluiu-se também a avaliação no 40º p.o., para estudar os eventos tardios.

Nos últimos 40 anos, o estudo dos cuidados das feridas cutâneas tem avançado consideravelmente. À medida que o conhecimento científico progride, faz-se necessário a utilização de ferramentas confiáveis para mensuração do processo de cicatrização, a fim de se avaliar os diferentes tratamentos empregados. As mensurações macroscópicas da área e do diâmetro médio das regiões cicatriciais, além da contagem do número de vasos e avaliação da espessura epitelial das preparações histológicas por meio de imagens digitais utilizando recursos de informática, como o programa de análise de imagens digitais (Image Processing and Analysis in Java – ImageJ) utilizado nesse e em outros estudos¹⁸⁻²⁰, é um método confiável que fornece uma avaliação objetiva e reproduzível, além de não ter custos por ser de domínio público. A utilização de ferramentas de avaliação quantitativa

teve como objetivo a obtenção de dados numéricos do processo cicatricial, evitando-se a subjetividade de uma análise histológica meramente qualitativa.

Os biomateriais devem ser submetidos a testes de biocompatibilidade para avaliar como eles e seus extratos interagem com os diversos sistemas orgânicos. Um material, para ser considerado biocompatível, não deve causar reações adversas após implantação, tais como: irritação, inflamação, reação imunológica e desprender componentes. De acordo com as normas do *Food and Drug Administration* (FDA), os dispositivos médicos implantáveis e seus constituintes não devem produzir reações adversas locais ou sistêmicas, não ser carcinogênico, não afetar o sistema reprodutivo e o desenvolvimento^{21, 22}. A citotoxicidade da membrana de biopolímero foi testada *in vitro* por meio da produção de óxido nítrico, do índice de adesão e da viabilidade celular de macrófagos alveolares. O BCA apresentou baixa citotoxicidade e alta biocompatibilidade frente aos três ensaios de citotoxicidade²³.

Em estudos realizados em cães, a utilização da membrana do BCA *in natura*, ainda com açúcares residuais, na cicatrização de feridas cutâneas, resultou em crescimento acelerado do tecido de granulação na fase inicial da re-epitelização com um tempo cicatricial menor, comparando-se com a terapêutica convencional à base de antissépticos e pomadas^{24, 25}. No presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao tempo em que ocorreu a epitelização completa das lesões, embora tenha sido evidenciado, à microscopia óptica, uma extensão epitelial menor nas feridas que receberam a membrana, sem diferença estatisticamente significativa, com exceção dos animais sacrificados no 7º p.o..

Foi demonstrada a presença de tecido de granulação em menor intensidade nas feridas onde se aplicou a membrana do BCA, confirmado pelos achados histopatológicos de menor quantidade de vasos neoformados, associadamente a um menor infiltrado inflamatório polimorfonuclear na ferida onde se utilizou a membrana do BCA. Esses achados podem indicar um processo de cicatrização mais avançado nos locais onde se aplicou a membrana do BCA, demonstrado pela observação de uma menor vascularização, possivelmente decorrente da desintegração dos vasos neoformados através da apoptose, o que estaria ocorrendo num momento mais precoce nas feridas onde a membrana do BCA foi utilizada²⁶. Considera-se que uma das características da última fase do processo de reparação tecidual (fase de

maturação) é a regressão endotelial²⁷.

Ocorreu redução da intensidade da fibroplasia com o decorrer do tempo, sendo mais acentuada essa redução nas feridas onde se aplicou a membrana do BCA, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa em comparação com as feridas sem a membrana. Observação que denota um processo de substituição do tecido de granulação rico em fibroblastos ativados por um tecido cicatricial relativamente acelular, através da apoptose, desencadeada por mecanismos de sinalização ainda não totalmente esclarecidos, como tem sido evidenciado em um estudo experimental de cicatrização cutânea por segunda intenção, que avaliou a fragmentação do DNA *in situ* e através da análise morfométrica com o uso da microscopia eletrônica²⁸. Além dos fibroblastos, as células inflamatórias e a maioria dos vasos sanguíneos desapareceram do local da ferida com o decorrer do processo de maturação e remodelagem, como foi demonstrado também no presente estudo. Esse mecanismo é importante porque, caso persista a celularidade no local, pode ocorrer a formação de cicatrizes hipertróficas ou queloidianas²⁹.

Considera-se que ocorreu um processo cicatricial em fases mais adiantadas nas feridas onde se utilizou a membrana do BCA, conforme demonstrado histopatologicamente pela observação de menor celularidade, embora sem constatação de diferença estatisticamente significativa.

A imunoistoquímica foi utilizada para confirmar a presença de queratinócitos nas áreas cicatriciais. Foi empregado anticorpos monoclonais contra as citoqueratinas 5 e 14, pois, estas citoqueratinas estariam presentes em todos os queratinócitos, sendo expressas principalmente nas células da camada basal³⁰. No estudo ficou comprovada a presença de queratinócitos, confirmada pela boa marcação com a utilização desses anticorpos, principalmente quando se usou anticorpos contra a citoqueratina 14, que evidenciou uma marcação mais acentuada. A marcação através dos anticorpos anti-citoqueratina 5 e 14, no presente estudo, ao contrário do referido em outro trabalho³⁰, não ocorreu predominantemente nas células da camada basal, mas, indiferentemente, em toda a espessura da epiderme, conforme se pode observar nas figuras 4 e 5.

Os curativos devem possuir certas características para ser considerados adequados³¹. A membrana do BCA apresenta algumas dessas características, o que torna interessante seu emprego, especialmente nas feridas abertas; serve como

barreira mecânica de proteção contra traumas e presença de materiais estranhos, mantém um ambiente ocluído úmido e aquecido, favorecendo a epitelização e minimizando a dor pela proteção aos terminais nervosos expostos, promovendo a compressão do leito cruento diminuindo o edema e obliterando o espaço-morto. A ocorrência de uma menor intensidade da vascularização e do tecido de granulação, assim como um menor infiltrado inflamatório polimorfonuclear na área cicatricial das feridas onde se aplicou a membrana do BCA, embora sem significância estatística ao se comparar com as feridas controle, denota uma menor resposta inflamatória provavelmente em consequência da maior proteção oferecida pela membrana, que minimizaria os efeitos dos repetidos traumas sobre a ferida, principalmente durante as trocas do curativo.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as feridas onde foram aplicadas a membrana do BCA apresentaram características de um processo cicatricial completo e estável em comparação com aquelas que não receberam a membrana, sendo demonstrado, por histomorfometria e histopatologia, evidências de uma área cicatricial em estágio mais avançado no processo de cicatrização.

REFERÊNCIAS

1. Coelho COM, Rezende CMF, Tenório APM. Contração de ferida após cobertura com substitutos temporários de pele. *Ciênc Rural* 1999; 29(2): 297-303.
2. Sweitzer SM, Fann SA, Borg TK, Baynes JW, Yost MJ. What is the future of diabetic wound care? *Diabetes Educ* 2006; 32; 197–210.
3. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 1999; 341: 738–46.
4. Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: Clark RAF, editor. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. 2nd ed. New York, London, Plenum, 1996. p 1–50.
5. Kuikui Hu, Yucheng Dai, Qionghua Hu, et al. An experimental study on the repair of full skin loss of nude mice with composite graft of epidermal stem cells. *Burns* 2006; 32: 416-22.
6. Melo FAD. Contribuição ao Estudo Cinético da Produção de Polissacarídeo Extracelulares por *Zoogloea* sp em Melaço de Cana-de-Açúcar, [Tese de Doutorado], Recife 2003.
7. Peterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros VA. Cellulosic expolissacaride produced from sugarcane molasses by a *Zoogloae* sp. *Carbohydr Polym* 2000; 42: 375-83.
8. Lima FR, Lima JRA, Hirakawa P, et al. Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 2005; 50(1): 37-40
9. Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol* 1990; 136(6): 1235-46.
10. Sternberger LA. Immunocytochemistry. John Wiley & Sons Co., Inc. New York. N.Y., USA, 2^a ed., 1979.
11. Galiano RD, Michaels J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen* 2004, 12(4): 485-92.
12. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB , Torres OJM, Agulham MA et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir Bras* 2006, 21 (sup. 3): –

55-65.

13. Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2004; 12: 591–9.
14. Mogford JE, Mustoe TA. Experimental models of wound healing. In: Falanga V, editor. *Cutaneous wound healing*. London: Martin Dunitz, 2001. p 109–22.
15. Cross SE, Naylor IL, Coleman RA, Teo TC. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg* 1995; 48:189–97.
16. Gottrup F, Agren MS, Karlsmark T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen* 2000;8:83–96.
17. Simões MJ, Cabral ACV, Boyaciyan K, Kulay Jr I, Sasso WS. Aspectos ultraestruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. *Rev Paul Med* 1986; 104(3): 132-5.
18. Wendelken ME, Berg WT, Lichtenstein P, Markowitz L, Comfort C, Alvarez OM. Wounds measured from digital photographs using photodigital planimetry software: validation and rater reliability. *Wounds* 2011; 23(9): 267-75.
19. Langemo DK, Melland H, Olson B, et al. Comparison of two wound volume measurement methods. *Adv Skin Wound Care* 2001; 14(4): 190–6.
20. Richard JL, Daures JP, Parer-Richard C, Vannereau D. Of mice and wounds: reproducibility and accuracy of a novel planimetry program for measuring wound area. *Wounds* 2000; 12(6): 148–54.
21. US Food and Drug Administration. Electronic and information technology accessibility standards economic assessment. [serial Internet]. Nov 2000. [citado em 2007 Out 11]. Available from: www.fda.gov/accessibility.html.
22. Lucena RG. Utilização do biopolímero da cana-de-açúcar como novo material para sling pubo vaginal: análise estereológica. [Tese de Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Cirurgia; 2007.
23. Castro CMMB, Aguiar JLA, Melo FAD, Silva WTF, Marques E, Silva DB. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 2004; 39(2): 119-23.

24. Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota RA, Tenório Filho, F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras* 2002; 17(Suppl 1): 11-3.
25. Melo FAD, Coelho MCOC, Ferreira VM, Monteiro VL, Carrazone PG. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. Anais 7º Congresso STAB, 25 a 28 de outubro. Londrina, Paraná, Brasil 1999. p 251-5.
26. Ilan N, Mahooti S, Madri JA. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci* 1998; 111: 3621-31.
27. Modolin M, Bevilacqua RG, Ruy G. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. *Rev Bras Clin Terap* 1985; 14(6): 208-13.
28. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146: 56-66.
29. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther* 1991; 52: 407-22.
30. Nelson WG, Sun TT. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J. Cell Biol* 1983; 97: 244-51.
31. Lionelli GT, Lawrence WT. Wound dressings. *Surg Clin North America* 2003; 83: 617-38.



ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências Biológicas Av. Prof. Nelson Chaves, s/n 50670-420 / Recife - PE - Brasil fones: (55 81) 2126 8840 2126 8351 fax: (55 81) 2126 8350 www.ccb.ufpe.br	
--	--

Recife, 22 de dezembro de 2011

Ofício 407/2011
Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para.: **Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar**
Departamento: Cirurgia / UFPE
Processo nº 23076.007905/2007-15

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: ***“Aplicação da Membrana de biopolímero de cana – de - açúcar como condutor de células epiteliais no tratamento de feridas cutâneas em ratos.”***

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Prof. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEAA

Observação: Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE; Animais: Ratos, Linhagem: Wistar; Sexo: Machos e Fêmeas ; Idade: 90 dias; Nº de Animais previsto no projeto: (40) animais.