

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA MARIA CARDOSO CEPEDA

EFEITOS DA RADIOFREQUÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS
EM RATOS: ANÁLISE POR PLANIGRAFIA DIGITAL E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

CURITIBA

2015

ANA MARIA CARDOSO CEPEDA

EFEITOS DA RADIOFREQUÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS
EM RATOS: ANÁLISE POR PLANIGRAFIA DIGITAL E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

CURITIBA

2015

Cepeda, Ana Maria Cardoso

Efeitos da Radiofrequência na cicatrização de feridas cutâneas em ratos: análise por planigrafia digital e avaliação histológica/ Ana Maria Cepeda. Curitiba, 2015.

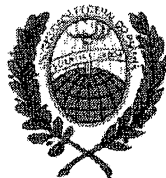
99 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Ondas de rádio. 2. Cicatrização. 3. Ratos. 4. Fibroblastos. I. Campos, Antônio Carlos Ligocki. II. Título.

NLM: WO 100



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluna **ANA MARIA CARDOSO CEPEDA**

Título da dissertação **EFEITOS DA RADIOFREQUÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS: ANÁLISE POR PLANIGRAFIA DIGITAL E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.**

CONCEITOS EMITIDOS

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
André Ricardo D. Tolazzi	A	9,0
Cleiton José Tremi	A	9,0
Antonio Carlos L. Campos	A	9,0

CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Conceito Final: _____ Equivalência: _____

Curitiba, 13 de julho de 2015.

MEMBROS	ASSINATURA
André Ricardo D. Tolazzi	
Cleiton José Tremi	
Antonio Carlos L. Campos	

À minha família, meus pais Jane e Renato e meus irmãos Fernanda e Renato Filho,
sem os quais eu não teria força e entusiasmo para ter realizado e concluído essa
etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que com sua colaboração me entusiasmaram e motivaram a iniciar e concluir esta nova fase de minha vida acadêmica, em especial:

A Deus, pela vida, benção e proteção.

À Universidade Federal do Paraná, pela disponibilidade.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos L. Campos, estimado orientador pela sua paciência e inestimável colaboração científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

À secretária do Departamento de Pós-graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná, Regina Sass, pelas orientações e ajuda quanto aos compromissos e normas de funcionamento do programa.

À amiga e doutoranda em clínica cirúrgica Gilian Fernanda Dias Erzinger pelo auxílio, motivação e paciência em todos os momentos deste estudo.

À amiga e médica de cirurgia plástica Priscila Balbinot pelo auxílio, motivação em todos os momentos deste estudo.

Ao meu namorado Heitor Rodolfo da Silva, pela paciência, carinho, entusiasmo e compreensão durante a realização deste estudo.

Aos funcionários Misael G. Barbosa e Álvaro R.G. Machado, pelo auxílio na fase experimental da pesquisa.

Aos patologistas Dr. Luiz Roberto Kotze e Cleber Rafael Vieira da Costa e ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas pela valiosa contribuição para as análises histológicas.

À todos, a palavra de gratidão.

RESUMO

Introdução: Tendo em vista o número de cirurgias plásticas no Brasil e a busca por melhores resultados estético-funcionais fazem-se necessárias pesquisas para encontrar meios para melhorar a cicatrização e as cicatrizes. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de três sessões de radiofrequência na cicatrização da pele de ratos no 7º e 14º dia de cicatrização. **Método:** Quarenta e oito ratos machos foram divididos em 4 grupos (GC7, GR7, GC14 e GR14) conforme ao grupo que pertenciam (GC: grupo controle; GR: grupo radiofrequência) e o dia do sacrifício (7: 7º dia P.O; 14: 14º dia P.O). Sob anestesia com ketamina 80 mg/kg e xilazina 8 mg/kg foi realizado a tricotomia e antissepsia com PVPI. Logo em seguida, foi feita a marcação da ferida excisional com tamanho de 2cm x 2cm (4cm²) e utilizado a lâmina 20 nas bordas laterais do quadrado. Foi feita a dissecação do segmento da pele. Também utilizou-se um *punch* metálico de 6mm com lâmina cortante na sua borda inferior para a realização de duas feridas excisionais de 0,6cm de diâmetro. Após 24h, foi realizada a aplicação da radiofrequência com o equipamento Spectra® na região dorsal, diretamente sobre as feridas por 7 minutos com temperatura de 38°C. Esse procedimento foi realizado por três vezes, em dias alternados. No grupo controle foi realizado o procedimento com o aparelho desligado. As feridas foram fotografadas em diferentes tempos pós-operatórios: dia da cirurgia, 1º dia P.O, no 7º dia P.O e no 14º dia P.O. As áreas cruentas foram calculadas utilizando programa específico de computador. No sacrifício (7º P.O ou 14º P.O), as feridas foram ressecadas e fixadas, para posterior análise histológica com HE. Os resultados foram analisados estatisticamente. **Resultados:** Foi encontrada área maior na ferida quadrado, no 3º dia pós cirurgia do grupo radiofrequência (GR7 3,3cm² ± 0,7cm² X GC7 2,4cm² ± 0,4cm², p=0,009). A diferença no dia da cirurgia para o dia da eutanásia do GR14 e GC14 foi uma ferida maior no dia da eutanásia no GR14 quando comparado ao GC14 (GR14 1,9cm² ± 0,5cm² X GC14 1,0cm² ± 0,3cm², p=0,001). No 7º e 14º dia de pós-operatório as feridas dos grupos controle e experimento de todos os animais exibiram aspectos diferentes entre si. Houve fechamento de 90% das feridas no GC14. No GR14, 60% dos ratos com feridas de *punch* foram reepitelizadas, enquanto 40% permaneceram ulceradas. No GC7, 70% das feridas de *punch* permaneceram ulcerados e 30% foram reepitelizadas. Já no GR7, 8% dos ratos, com feridas de *punch* foram reepitelizadas e 92% dos ratos permaneceram ulcerados. **Conclusão:** Pode-se afirmar que a radiofrequência tem influência sobre o processo inflamatório mostrando que, nos ratos que foram aplicados a radiofrequência, o quadrado permaneceu ulcerado. A radiofrequência reduz a contração cicatricial em feridas excisionais.

Palavras-chave: Ondas de Rádio. Cicatrização. Fibroblastos

ABSTRACT

Introduction: Considering the number of plastic surgeries in Brazil and the search for better aesthetic-functional results, researches are necessary to find ways to improve the healing process and scars **Objective:** The objective of this study was to evaluate the effects of 3 sessions of the radiofrequency device in the cicatrization process of rat skins at 7^o and 14^o days of healing. **Methods:** Forty-eight male rats were divided into 4 groups (GC7, GR7, GR14 and GC14), according to the group (CG: control group; GR: RF group) and the day of sacrifice (7: 7th post-operative day; 14: 14th post-operative day). Under anesthesia with ketamine 80mg/kg and xylazine 8mg/kg, the trichotomy and antisepsis with PVP-I was done on each animal before marking the 2cm x 2cm (4cm²) excisional wound, to finally initiate surgery with No.20 blades on the sides of the marked square, dissecting the skin segment. A 6mm metal *punch* with a cutting blade at its lower edge was used as well. After 24h, the radio-frequency with Spectra[®] equipment was applied on the dorsal region for 7 minutes with a temperature of 38 °C. This procedure was performed three times on alternate days. The control group went through the process with Spectra[®] turned off. The wounds were photographed at different post-operative stages: Surgery day, 1^o day PO, 7^o day PO and 14^o day PO the raw areas were calculated using specific computer program. We reevaluated histologically with HE. Results were statistically analyzed by non-parametric Mann-Whitney test, $p < 0,05$. **Results:** Larger area in the wound square was found, on the 3rd day after surgery in radiofrequency group (GR7 $3,3\text{cm}^2 \pm 0,7\text{cm}^2$ x GC7 $2,4\text{cm}^2 \pm 0,4\text{cm}^2$, $p=0,009$).The difference between surgery day to euthanasia of the GC14 and GR14 is a smaller wound on euthanasia day in C14 compared to R14, (GR14 $1,9\text{cm}^2 \pm 0,5\text{cm}^2$ x GC14 $1,0\text{cm}^2 \pm 0,3\text{cm}^2$, $p=0,001$).On 7th and 14th postoperative days, wounds of control and experimental groups of all animals exhibit different aspects. There was 90% closure of wounds in the GC14. 60% of the rats in the GR14 had epidermal regeneration while 40% remaining ulcerated. In GC7, 70% of *punch* wounds remained ulcerated and 30% was healed. The GR7 had 8% rats with *punch* wounds healed and 92% remained ulcerated. **Conclusion:** It can be said that the radio has influence on the inflammatory process, showing negative effects applying RF; the Q-square remained ulcerated. This, study have found harmful results about the application of radiofrequency in the initial PO. However, it is necessary to conduct more studies to elucidate the action mechanism of RF in skin wounds healing.

Keywords: Radio Waves. Cicatrization. Fibroblasts

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - RATOS WISTAR ALBINO UTILIZADOS NO EXPERIMENTO.....	27
FIGURA 2 - MOLDE PLÁSTICO UTILIZADO PARA MARCAÇÃO DA PELE DO RATO.....	28
FIGURA 3 - MARCAÇÃO COM CANETA PRETA NO DORSO MEDIAL E FERIDA EXCISIONAL, DEMARCADOS POR A E B AS REGIÕES A SER REALIZADA O PUNCH, E C A REGIÃO A SER FEITA O QUADRADO DE 4CM ² COM O BISTURI.....	29
FIGURA 4 - RETIRADA DE FRAGMENTOS COM PUNCH METÁLICO E FRAGMENTOS DE 0,6CM ² DE DIÂMETRO DEMARCADO POR A E B, E REALIZAÇÃO DA FERIDA DE 4CM ² E DISSECAÇÃO DO SEGMENTO DE PELE DEMOSTRADO COMO C.....	30
FIGURA 5 - AFERIÇÃO DA TEMPERATURA COM O TERMÔMETRO INFRAVERMELHO.....	32
FIGURA 6 - REALIZAÇÃO DA RADIOFREQUÊNCIA.....	32
FIGURA 7 - TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA. (A) FERIDA EXCISIONAL CONTENDO A ÁREA CRUENTA A SER ANALISADA. (B) UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA NO PROGRAMA COMPUTADORIZADO PARA ANALIZAR A ÁREA (C) RESULTADO DA ÁREA CRUENTA.....	34
QUADRO 1 - PARÂMETROS ANALISADOS PELO MÉTODO HE.....	36
QUADRO 2 - MÉTODO USADO PARA ANALISAR SE HOUE A REEPITELIZAÇÃO COMPLETA OU NÃO DAS LESÕES CAUSADAS PELO PUNCH.....	37
GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GR7 E GC7 EM RELAÇÃO ÀS AVALIAÇÕES PARA ÁREA NOS MOMENTOS CIRURGIA, 1 DIA , 3 DIA E EUTANÁSIA.....	38

GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GR14 E GC14 EM RELAÇÃO ÀS AVALIAÇÕES PARA ÁREA NOS MOMENTOS CIRURGIA, 1 DIA, 3 DIA E EUTANÁSIA.....	39
FIGURA 8 - EXEMPLO DE FERIDAS DE PUNCH E QUADRADO REPRESENTADO POR P (PUNCH) Q (QUADRADO) DO GC7 NO DIA DA CIRURGIA (1), 1º DIA P.O (2), 3º DIA P.O (3) E EUTANÁSIA 7º DIA P.O (4).....	41
FIGURA 9 - EXEMPLO DE FERIDAS DE PUNCH E QUADRADO REPRESENTADO POR P (PUNCH) Q (QUADRADO) DO GR7 DO DIA DA CIRURGIA (1), 1º DIA P.O (2), 3º DIA P.O (3) E EUTANÁSIA 7º DIA P.O (4).....	42
FIGURA 10 - EXEMPLO DE FERIDAS DE PUNCH E QUADRADO REPRESENTADO POR P (PUNCH) Q (QUADRADO) DO GC14 DO DIA DA CIRURGIA (1), 1º DIA P.O (2), 3º DIA P.O (3) E EUTANÁSIA 14º DIA P.O (4).....	43
FIGURA 11 - EXEMPLO DE FERIDAS DE PUNCH E QUADRADO REPRESENTADO POR P (PUNCH) Q (QUADRADO) DO GR14 DO DIA DA CIRURGIA (1), 1º DIA P.O (2), 3º DIA P.O (3) E EUTANÁSIA 14º DIA P.O (4).....	44
FIGURA 12 - NA FIGURA 1 OBSERVA-SE QUE NO GC14 OS PUNCHS APRESENTAM-SE FECHADOS ENQUANTO NA FIGURA 2, NO GR14 OS PUNCHS ESTÃO MAIS ABERTOS, TAMBÉM É VISÍVEL QUE NO GC14 O QUADRADO ESTÁ MAIOR QUANDO COMPARADO AO QUADRADO DO GC14.....	44
GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES FEITA PELO HE EM RELAÇÃO À INFLAMAÇÃO, INFLAMAÇÃO CRÔNICA, INFLAMAÇÃO AGUDA, PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA E REPARAÇÃO NOS GRUPOS CONTROLE GC E GRUPO RADIOFREQUÊNCIA GR NO 7º DIA DA EUTANÁSIA E NO 14º DIA DA EUTANÁSIA.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E RADIOFREQUÊNCIA NO 7º DIA EM RELAÇÃO À VARIÁVEL ULCERAÇÃO.....	40
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GC7 E GR7 EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DE HE, INFLAMAÇÃO, INFLAMAÇÃO CRÔNICA, INFLAMAÇÃO AGUDA, PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA.....	45
TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GC14 E GR14 EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DE HE, INFLAMAÇÃO, INFLAMAÇÃO CRÔNICA, INFLAMAÇÃO AGUDA, PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA.....	46

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

et al. – et alli (e outros)

GC – Grupo controle

GR – Grupo radiofrequência

HE – Hematoxilina-eosina

P – Punch

ρ – Nível de significância estatística

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

P.O. – Pós operatório

PUC-PR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

PVPI – Povidine- iodine

Q – Quadrado

RF – Radiofrequência

® – Marca registrada

UFPR – Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 REPARAÇÃO TECIDUAL	14
2.1.1 Fase inflamatória ou exsudativa	15
2.1.2 Fase proliferativa ou fibroblástica	17
2.1.3 Angiogênese	17
2.1.4 Fase de maturação ou remodelação	18
2.2 COLÁGENO	19
2.3 RADIOFREQUÊNCIA.....	20
2.3.1 História da radiofrequência	20
2.3.2 O que é a radiofrequência?	21
2.3.3 Efeitos fisiológicos causados pela radiofrequência.....	22
2.3.4 Utilização da radiofrequência na Fisioterapia	23
2.3.5 Ação da radiofrequência no colágeno.....	23
2.3.6 Indicações.....	24
2.3.8 Efeitos colaterais.....	25
2.3.9 Estudos realizados em humanos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA.....	26
3.2 AMBIENTE	26
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	26
3.4 ETAPAS EXPERIMENTAIS	27
3.4.1 Anestesia	28
3.4.2 Marcação da pele	28
3.4.3 Procedimento cirúrgico	30
3.4.4 Pós operatório	31
3.5 APLICAÇÃO DA RADIOFREQUÊNCIA	31

3.6 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL	33
3.7 CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS	35
3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	35
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4 RESULTADOS	38
4.1 COMPARAÇÕES DOS GRUPOS EM RELAÇÃO À AVALIAÇÃO DA ÁREA DA FERIDA.	38
4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	40
4.3 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GC E GR EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DE HE	45
4.4 COMPARAÇÃO DAS FERIDAS DO QUADRADO NOS DIAS DE AVALIAÇÃO, DENTRO DOS GRUPOS GC E GR, EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DE HE.	46
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização após cirurgia estética é de grande interesse, tendo em vista o número de cirurgias plásticas no Brasil e a busca por melhores resultados estético-funcionais. Faz-se necessária a investigação e aprimoramento em técnicas e soluções para uma reparação cutânea mais próxima da perfeição.

As fibras de colágeno proporcionam a força tênsil na fase de cicatrização do reparo tecidual. O seu metabolismo consiste em equilíbrio entre biossíntese e degradação que são reabsorvidas durante o crescimento, remodelação, involução, inflamação e reparo de tecidos. A reabsorção é iniciada por collagenases específicas que podem digerir as moléculas de tropocolágenos da fibra (GUIRRO; GUIRRO, 2007).

O colágeno é a proteína estrutural mais importante nos humanos e mais abundante, equivalendo a cerca de 30% do total de proteínas presentes no corpo humano. Tem como função primária o suporte da matriz extracelular, ou seja, fornece resistência e integridade estrutural a diversos tecidos e órgãos entre eles a derme. Além disso, quando imaturo, o colágeno caracteriza-se por grande quantidade de fibroblastos jovens e fibras colágenas menos densas devido à grande quantidade de água que possui. Com o passar do tempo, o colágeno amadurece e, desta forma, torna-se menos celular e com menor quantidade de água. A partir daí, o tecido conjuntivo vai amadurecendo progressivamente com maior deposição de colágeno maduro (GUIRRO; GUIRRO, 2007).

A capacidade de contrair colágeno com a energia térmica não é novidade na medicina. A contração térmica induzida de colágeno foi obtida favoravelmente em medicina esportiva, alterando o alongamento dos ligamentos responsáveis pela instabilidade do ombro. Este conceito de contração com o mínimo ou nenhum dano epidérmico é extremamente interessante (ATIYEH, 2009).

A Fisioterapia Dermato-Funcional pode ter importante papel na facilitação da cicatrização, pois possui recursos terapêuticos capazes de influenciar este processo,

sendo a Radiofrequência (RF) a principal responsável por essa facilitação tendo em vista os efeitos de aquecer o tecido profundo enquanto a epiderme permanece protegida (CARVALHO, 2011).

Entretanto, o efeito da radiofrequência na cicatrização permanece desconhecido. Assim objetivou-se um estudo em animal de experimentação para avaliar o seu uso na cicatrização de feridas cutâneas em ratos por planigrafia computadorizada digital, com análise macroscópica e análise histológica e verificar se há um efeito para uma melhor cicatriz estética.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos de radiofrequência na cicatrização cutânea de ratos no 7º e 14º dia de cicatrização. Os objetivos específicos englobam:

- 1- Comparar a contração da ferida excisional analisando 7 e 14 dias após a lesão, com ou sem a aplicação de radiofrequência;
- 2- Avaliar o efeito da radiofrequência no padrão histológico das cicatrizes mediante coloração de hematoxilina-eosina (HE).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção, serão abordados os aspectos histológicos, bioquímicos e fisiológicos relacionados ao processo de cicatrização, inflamação e reparação tecidual. Na seqüência, serão relacionados aspectos teóricos sobre a radiofrequência.

2.1 REPARAÇÃO TECIDUAL

De maneira inevitável, a reparação cutânea resulta em uma cicatriz. As feridas com cicatrização retardada, com processos cicatriciais desregulados, como cicatrizes hipertróficas, queloides, contraturas cutâneas e contraturas capsulares de implantes mamários ou expansores de tecido são um problema para cirurgiões e cientistas (TOLAZZI, 2007).

Os organismos vivos tem uma importante capacidade auto regenerativa. A reparação tecidual é um processo dinâmico com alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas, desencadeadas por lesão tecidual. São eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a restauração do tecido que sofreu determinado tipo de dano (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; RISPOLI, 2006; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O principal objetivo no tratamento das feridas cutâneas é promover rápida restauração da lesão, com cicatrizes satisfatórias do ponto de vista funcional e estético. No processo de reparação das feridas cirúrgicas, o colágeno é essencial na união das bordas da ferida cirúrgica. Também é o principal responsável pela resistência mecânica da cicatriz. A síntese de proteína fibrosa constitui a essência da cicatrização (CLARK, 1999; NARESSE et al, 1993).

O processo de reparação tecidual é dividido em três fases distintas: exsudativa ou inflamatória, proliferativa ou fibroblástica e de maturação ou remodelagem. O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações

anabólicas e catabólicas, que têm os macrófagos como um de seus mais importantes protagonistas. Essas células, além de suas conhecidas atividades imunes, estão envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e também, com as reações anabólicas de formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento responsáveis pela recomposição da celularidade regional ou restabelecimento da sua homeostasia pela formação da cicatriz (HUPP, 2000; RISPOLI, 2006; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; VALENTE, 2014).

O reparo de ferida cutânea mais simples é uma incisão cirúrgica limpa não infectada, aproximada por suturas cirúrgicas. Esse tipo de cicatrização é conhecido como cura por união primária ou por primeira intenção. As feridas com excisões, que criam grande perda de tecidos e células, são mais difíceis e apresentam reações inflamatórias mais intensas, formação de abundante tecido de granulação e extensa deposição de colágeno que leva à formação de cicatriz substancial que geralmente se contrai (ROBBINS; COTRAN, 2010).

A seguir são descritas, sucintamente, as principais características de cada fase da cicatrização.

2.1.1 Fase inflamatória ou exsudativa

A fase inflamatória ocorre desde o momento da lesão até o quarto ou quinto dia de evolução caracterizando pela participação ativa de inúmeras células e fatores do sistema imunológico. Ocorre o aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de células oriundas da circulação para o local do sangramento que ocorre imediatamente após a lesão tecidual e pela liberação local de citocinas, os quais são fatores de crescimento, além da liberação de mediadores químicos (CAMARGO, 2007; KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o local da ferida, através do fator de necrose tumoral (TNF), atuam na fagocitose de microrganismos presentes na ferida e o desbridamento do tecido lesado pela liberação de enzimas proteolíticas. Na continuidade do processo, os linfócitos são as próximas células a

serem atraídas para o local da lesão, liberando mediadores químicos denominados linfocinas, que têm seu papel na quimiotaxia dos fibroblastos (WAHL; MC CARTHY, 1978; ORGILL; DEMLING, 1988 apud CAMARGO 2007). De acordo com os estudos de Folkman (1982 apud CAMARGO, 2007), os linfócitos também liberam fatores que estimulam a angiogênese nos tecidos em cicatrização. Na sequência, ocorre a atração e ativação de macrófagos, os quais são considerados as células regulatórias mais importantes do processo cicatricial (CLARK 1976 apud CAMARGO 2007; CAETANO, 2012).

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória tem a glicoproteína, fibronectina com função de adesão, sendo sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. A fibronectina proporciona a adesão da fibrina ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz. Além de formar essa base para a matriz celular, a fibronectina tem propriedades quimiotáticas e promove a fagocitose de corpos estranhos e bactérias (MANDELBAUM, DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; RISPOLI, 2006).

Os fatores de crescimento também são potentes e fundamentais no processo de reparo tecidual. O PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) é um importante fator de crescimento, agindo principalmente no início da fase inflamatória como fator quimiotático para macrófagos, neutrófilos e como fator mitogênico para fibroblastos e células musculares lisas. Muitos fatores de crescimento, secretados por macrófagos, influenciam a proliferação celular, angiogênese e síntese da matriz extracelular. O TGF- α (Fator de crescimento transformador) exerce forte influência na migração de queratinócitos e reepitelização. O TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 promovem forte estímulo na migração de fibroblastos e células endoteliais, assim como na deposição da matriz extracelular pelos fibroblastos durante a formação do tecido de granulação (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; CAETANO, 2012).

2.1.2 Fase proliferativa ou fibroblástica

Três dias após a lesão tem início a fase proliferativa que caracteriza-se por intensa migração e proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, os quais contribuem para a formação do tecido de granulação e “fechamento” da lesão ao redor do quarto dia (PHILIPS, 2000) e persistindo até o 14º dia. É caracterizado por três processos: angiogênese, proliferação fibroblástica e reepitelização (ORGILL; DEMLING, 1988; HERTIG, 1935 apud CAMARGO, 2007; LANGE, 2014).

O processo de reepitelização da ferida se inicia imediatamente após a lesão, onde o epitélio tenta restabelecer sua integridade por meio da migração dos queratinócitos e de um processo conhecido como “inibição de contato” (HUPP, 2000; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; RISPOLI, 2006).

Nesta fase, macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos estão presentes no tecido de granulação ao mesmo tempo. Logo após a lesão, os fibroblastos das margens da ferida começam a se proliferar atingindo o pico de proliferação no 7º dia pós-trauma. Logo após ativados, os fibroblastos sofrem alterações fenotípicas e potencializam a produção de proteínas. Em torno do 4º dia, migram para a matriz provisória e iniciam a síntese proteica, transformando-a em matriz rica em colágenos, proteoglicanos e elastina. Alguns fibroblastos adquirem características fenotípicas de miofibroblastos e participam do processo de contração cicatricial. Os miofibroblastos foram definidos como células altamente diferenciadas que apresentam organelas especializadas e apresentam características comuns a fibras musculares e fibroblastos (SCHURCH; SEEMAYER; GABBIANI, 1998; CAMARGO, 2007).

2.1.3 Angiogênese

Nessa fase, acontece a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos adjacentes à ferida, a fim de prover nutrientes e oxigênio ao tecido cicatricial, além da migração de células inflamatórias para a ferida. As pontas desses novos vasos

são permeáveis e permitem a infiltração de proteínas e glóbulos vermelhos para o espaço intersticial, explicando a persistência do edema após a fase aguda. As células endoteliais da microcirculação iniciam o processo angiogênico, o qual consiste na ativação destas células, degradação da sua membrana basal, proliferação celular, formação da estrutura capilar tubular e reconstituição da membrana basal (SINGER; CLARK, 1999; ROBBINS; COTRAN, 2010; CAETANO, 2012; LANGE, 2014).

Os neovasos correspondem a 60% do tecido de reparo, por isso o nome de tecido de granulação, que deriva da proeminência dos vasos na lesão em cicatrização (RISPOLI, 2006).

2.1.4 Fase de maturação ou remodelação

A fase de maturação é a última e mais longa fase do processo de cicatrização. Sua duração depende de variáveis como idade, estado nutricional do indivíduo, local da ferida, raça, idade, tipo de lesão e duração do processo inflamatório e proliferativo. Por volta do décimo dia, a ferida está preenchida pelo tecido de granulação com uma rede capilar atravessando-o e a rede linfática em regeneração. O tecido de granulação vai sendo abastecido com mais fibras de colágeno e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz. Ocorre a substituição gradual do colágeno imaturo (tipo III), da matriz extracelular, por colágeno maduro (tipo I) e a redução do número de células inflamatórias e de vasos sanguíneos neoformados (ROBBINS, 2001; SIMÕES, 2007; RIBEIRO, 2014).

Este processo é lento, durando muitos meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal. Clinicamente, é a fase mais importante, pois a quantidade e a qualidade do colágeno determinarão a força mecânica do tecido remodelado (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; RISPOLI, 2006; CAMARGO, 2007).

2.2 COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante do organismo e constitui 30% de todas as proteínas do corpo humano (SINNO, 2012). É uma escleroproteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo e proporciona um arcabouço extracelular para todos os organismos pluricelulares, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas.

O termo colágeno é genérico e pode significar diferentes tipos de formação em cadeia compostas basicamente por glicoproteínas. Existem cerca de 20 tipos de cadeias alfa, que são capazes de originar até 1000 tipos diferentes de colágeno, dos quais 11 tipos já foram identificados, sendo que os mais conhecidos são tipo I, II e III. O tipo I é o principal constituinte da pele, é sintetizado por fibroblastos, células do músculo liso e osteoblastos. As células do músculo liso produzem colágeno do tipo III também, o tipo II é produzido pelos condrócitos. Nas feridas, os tipos e quantidades de colágeno são modificados dependendo do estágio do processo de reparo. Os colágenos fibrilares, colágeno tipo I, formam a principal porção do tecido conjuntivo nos locais de reparo e são essenciais para a força tênsil nas feridas em cicatrização (KITCHEN, 2003; BRASILEIRO, 2000; GUIRRO, 2002; ROBBINS; COTRAN, 2010).

Os colágenos do tipo I e III são os mais importantes colágenos fibrilares produzidos pelo tecido de granulação durante a cicatrização de feridas. Há uma variedade nos diferentes tecidos e durante as fases da formação do tecido de granulação (ROCHA, 2004; RISPOLI, 2006; SINNO, 2012; RIBEIRO, 2014).

Inicialmente o colágeno tipo III deposita-se no tecido de cicatrização, e caracteriza-se por ser proteína imatura. Depois com a remodelação, surge o tipo I, com características maduras. Na fase final da cicatrização ocorre a maturação do tecido de reparação, que avança gradualmente de estado celular e vascularizado até a formação da cicatriz, com poucas células e vasos sanguíneos e com o resultado final de um tecido resistente e com fibras colágenas com alto grau de orientação (CAMARGO, 2007; CAETANO, 2012).

O colágeno proveniente do tecido de granulação é diferente do colágeno do tecido ileso, pois apresenta maior hidroxilação e glicosilação, o que atribui àquele diâmetro maior (FORREST, 1983; CAETANO, 2012).

A deposição do colágeno do tipo III na ferida atinge seu pico em torno do 3º dia e reduz-se progressivamente até o 7º dia. A presença de colágeno do tipo I aumenta progressivamente após o 2º dia por pelo menos quatro a cinco semanas (EHRlich; KRUMMEL, 1996; VALENTE, 2014).

2.3 RADIOFREQUÊNCIA

2.3.1 História da radiofrequência

O fisiologista francês Jaques Arsène D'Arsonval, promoveu uma revolução nas correntes medicinais. Foi o inventor do galvômetro, em 1891, quando descobriu que o corpo humano suportava correntes com frequências superiores a 10.000Hz (10KHZ) sem muitos efeitos secundários. Em 1893, experimentou uma corrente de radiofrequência (500kHz) a qual circulava por um circuito constituído por dois voluntários humanos e uma lâmpada elétrica de 100watts de potência, e essa brilhou intensamente, enquanto os voluntários alegaram ter sentido somente uma sensação de aquecimento (GEDDES; SILVA; DEWITT, 1977).

O uso terapêutico da RF iniciou em 1920, quando o eletrocautério foi introduzido por Bovie e Gusting. Em 1950, neurocirurgiões utilizaram-na para causar lesões específicas no sistema nervoso central, durante um ato operatório. Em 1960, a RF nodal ablativa foi considerada eficaz e segura para tratamento de arritmias cardíacas. A RF ablativa é também reconhecidamente útil para tratamento de pequenas lesões cutâneas (MATTOS *et al*, 2009).

A terapia por radiofrequência utiliza corrente elétrica de média intensidade. A potência liberada aumenta a temperatura tecidual a níveis que favoreçam respostas fisiológicas controláveis. Quando utilizada com potências mais elevadas e com

eletrodos específicos, são usadas para fazer incisões, destruir ou remover tecidos orgânico, conhecida como radiofrequência ablativa, de uso médico (AGNE, 2013).

A radiofrequência existe há mais de um século, mas nos últimos anos ganhou importância em diversos procedimentos, especialmente na conhecida eletrocirurgia e nos estímulos térmicos teciduais com fins terapêuticos. Atualmente surgiu o interesse na RF não ablativa e se tem dado especialmente no aspecto estético. Porém somente em 2008 que surgiu no Brasil o primeiro equipamento nacional, *Spectra®ToneDerm®* (AGNE, 2009).

2.3.2 O que é a radiofrequência?

A RF é uma forma de corrente elétrica alternada, cuja frequência varia de 30.000 Hz a 3.000 MHz. O mecanismo de ação da RF se baseia no aquecimento volumétrico controlado da derme profunda, enquanto a epiderme é preservada através de sistemas de resfriamento. A desnaturação imediata das fibras de colágeno induzida pelo calor seria o mecanismo responsável pela retração imediata tecidual, enquanto a neocolagenose subsequente é responsável pelo efeito clínico mais tardio (NASCIMENTO et al, 2008; COSTA, 2009).

A RF produz correntes eletromagnéticas utilizando a radiação. Quando empregada como terapia monopolar, deve ser aplicada entre dois eletrodos. Um deles, chamado eletrodo ativo, o qual libera energia, provocando fenômenos térmicos localizados no tecido, estimulação tecidual como a retração dos septos fibrosos e a produção de colágeno. O outro eletrodo, chamado de eletrodo de dispersão ou contato é geralmente uma placa condutiva de grande área de contato. A existência de um eletrodo dispersivo não é regra geral para o modo monopolar, pois dependerá das configurações de cada aparelho. Sua função é estabelecer um circuito de circulação de corrente, ao mesmo tempo em que faz com que a energia retorne do paciente através de uma grande área. Porém, ao ser aplicada no tecido, a corrente encontra resistência devido à impedância do tecido. Essa resistência à passagem da corrente elétrica produz calor, pela conversão em energia térmica. O calor é gerado em função da resistência natural do tecido para o movimento de elétrons dentro de um campo de RF (Lei de Ohm). Esta resistência, chamada de impedância, gera calor em relação à quantidade de corrente e tempo. O calor é

produzido quando essa resistência inerente do tecido converte a corrente elétrica em energia térmica (AGNE, 2009; ATIYEH 2009; AGNE, 2013; BRAVO, 2013).

2.3.3 Efeitos fisiológicos causados pela radiofrequência.

A passagem da RF pelo tecido produz normalmente uma série de eventos que derivam do aumento de temperatura. São três os principais eventos: 1) vibração iônica: os íons estão presentes em todos os tecidos, ao serem submetidos a uma radiofrequência vibram à frequência da mesma, assim gera fricção e colisão nos tecidos adjacentes gerando aumento de temperatura; 2) rotação das moléculas dipolares: as moléculas de água do organismo apesar de serem neutras, atraem cargas opostas que convertem em um dipolo, assim ocasionando colisão entre os tecidos adjacentes; 3) distorção molecular: sucede nas moléculas e átomos eletricamente neutros e seus movimentos serão nulos, pelo fato de não possuírem carga elétrica (BOCK, 2013).

Os efeitos biológicos da radiofrequência são atérmicos e térmicos, sendo esse último o de maior importância. O aumento da temperatura diminui a distensibilidade do colágeno e aumenta sua densidade, provocando a desnaturação do colágeno, promovendo imediata e efetiva contração de suas fibras. Esta injúria térmica ativa o processo inflamatório e a síntese de colágeno pelos fibroblastos, ocorrendo a neocolagenização alterada em diâmetro, espessura e periodicidade, levando à reorganização das fibras colágenas e o subsequente remodelamento do tecido. Também produz uma inflamação controlada dos tecidos, com aumento imediato do interleucina 1-Beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e metaloproteinase de matriz 13 (MMP-13) sendo esta última marcadora de desagregação da matriz extracelular, enquanto os níveis de metaloproteinase de matriz 1 (MMP-1), proteína de choque térmico 47 e 72 (HSP47 e HSP72) e fator beta de crescimento transformador (TGF- β) mantêm-se elevados por dois dias. Juntamente à tropoelastina, a fibrilina e o procolágeno I e III são estimulados por 28 dias após o tratamento. Esses danos térmicos estimulam a cicatrização de feridas, a remodelação dérmica e novo colágeno, elastina e a formação de ácido hialurônico (BORGES, 2010; BRADLEY, 2011; CARVALHO, 2011; BRAVO, 2013).

2.3.4 Utilização da radiofrequência na Fisioterapia

Segundo Mattos (2009) a RF não ablativa foi recentemente introduzida para o tratamento da flacidez facial e corporal, gordura localizada, lipodistrofia ginóide e cicatrizes hipertróficas e queloideanas, por meio do aquecimento volumétrico na derme profunda e no tecido subcutâneo. O primeiro aparelho que chegou à dermatologia produziu radiofrequência monopolar. Aquece volumetricamente o tecido profundo, enquanto a epiderme permanece protegida, por meio de contração imediata do colágeno, com quebra das pontes de hidrogênio de sua molécula. O dano térmico causa então, reação inflamatória, subepidérmica, estimulando nova síntese de colágeno, que confere maior firmeza à pele. Atiyeh (2009) refere que a contração imediata do colágeno pode ser utilizada na estética para rejuvenescimento, tratamento de flacidez de pele ou outros sinais de envelhecimento no rosto ou no corpo (ATIYEH, 2000; AGNE, 2013).

2.3.5 Ação da radiofrequência no colágeno.

As fibras de colágeno são compostas de cadeia tripla hélice de proteína. Quando aquecidas à temperatura correta contraem-se devido à ruptura de ligações de hidrogênio intra-moleculares e podem gerar imediata contração do tecido. Exceder o limite de calor faz com que as fibras de colágeno se desnaturem completamente. No entanto, pouco calor não vai gerar efeito nenhum. Já muito calor pode causar a morte das células e desnaturação de proteínas generalizadas. O aparelho de RF, para ser usado na estética, não necessita produzir temperaturas extremas, pois em torno de 5°C acima dos níveis normais nos tecidos já é possível estimular a produção de novo colágeno e a retração das fibras flácidas. A temperatura tecidual entre 39 e 45°C não causa nenhum dano significativo, apenas retração dos tecidos, especialmente dos septos fibrosos. Os danos começam a ser irreversíveis acima de 50°C (desnaturação do tecido), uma vez que muitas vezes é citada a temperatura de 57 a 61°C como a temperatura de encolhimento do colágeno. Próximo de 70°C acontece à coagulação. Entre 90°C e 100°C o tecido é completamente desidratado. Acima de 100°C acontece à transição para vapor da água intra e extracelular. E acima de 150°C acontece à carbonização ou queimadura patológica de terceiro grau. No entanto para cada decréscimo de 5°C de

temperatura, um aumento de 10 vezes no tempo é necessário para alcançar uma quantidade similar de contração do colágeno. Em função dessas respostas teciduais frente à RF, observa-se que não existe uma única temperatura de encolhimento. A intensidade da contração é determinada por uma combinação de tempo e temperatura. Portanto, é conveniente que se controle a temperatura constantemente e para isso se faz necessário o uso de termômetro especial, geralmente por infravermelho, cuja avaliação térmica seja imediata e contínua (AGNE, 2009; ATIYEH, 2009; CEPEDA, 2012; AGNE, 2013).

2.3.6 Indicações

Resultados esperados na RF são as contrações das fibras colágenas, ocorrendo aumento da tonicidade da pele. As principais indicações de RF não ablativa são: flacidez da pele facial e corporal, fibroses recentes e tardias, cicatrizes e aderências, FEG (Fibroedema gelóide), adiposidade localizada, edema, contratura muscular, fibromialgia, liberação miofascial, dor muscular. A radiofrequência tem indicação nos processos degenerativos que provoquem redução ou retardo do metabolismo, irrigação e nutrição, sendo indicada geralmente em doenças crônicas, de estimular e por provocar aumento da vasodilatação e irrigação abaixo da zona tratada, além da oxigenação e nutrição dos tecidos (MATTOS et al, 2009; CARVALHO, 2011; AGNE, 2013).

2.3.7 Contra indicações.

É contra indicado o uso da radiofrequência em indivíduos com transtorno de sensibilidade, com o uso de metais intra orgânicos, osteossínteses, implantes elétricos, marca-passo, sobre glândulas que provoquem aumento de hormônio, grávidas, em focos infecciosos, pacientes que estejam ingerindo vasodilatadores ou anticoagulante, hemofílicos e em indivíduos com processos febris (CARVALHO, 2011).

2.3.8 Efeitos colaterais

Eritema temporário é o efeito colateral mais comum. Podem surgir bolhas principalmente nas áreas sobre proeminências ósseas. As bolhas podem evoluir para cicatrizes. Dor e parestesia não são comuns, mas podem ocorrer (MATTOS et al, 2009).

2.3.9 Estudos realizados em humanos

Harth (2010) realizou estudo clínico em 30 pacientes, usando a RF para melhorar o envelhecimento facial e obteve alta eficácia, pois 86,7% dos pacientes tiveram bons resultados e melhores resultados depois de 3 meses, com diminuição de 2 ou mais graus na escala de rugas de Fitzpatrick.

Segundo o estudo clínico de Fitzpatrick (2003), citado por Abraham (2007), no qual foi realizado uma única sessão na área periorbital em um estudo multicêntrico de 86 indivíduos, foi relatada elevação mensurável do supercílio em 62% dos casos e melhora clínica de 83% nas rugas. Ainda nesse sentido também por Abraham (2007) o estudo de Nahm no qual foram tratados dez pacientes apenas de um lado do rosto com RF e houve redução de 22,6% de rugas em comparação com o lado não tratado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

O estudo caracterizou-se como pesquisa quantitativa experimental controlada e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR- Pontificia Universidade Católica do Paraná, sob o registro nº 684 no dia 28 de fevereiro de 2013 (Anexo 1).

3.2 AMBIENTE

Os procedimentos experimentais foram realizados nos laboratórios da PUC-PR, Curitiba-PR. O estudo anátomo-patológico foi desenvolvido no laboratório do Hospital São Lucas, na mesma cidade. Para delineamento deste estudo experimental foi realizado, em conjunto com os projetos das alunas Gilian Fernanda Dias Erzinger e Priscilla Balbinott, um estudo piloto no biotério da PUC-PR, em 2012.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram incluídos quarenta e oito ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, nome vulgar ratos Wistar albino, pesando entre 300g e 350g, com idade de ± 3 meses, procedentes do Biotério Central da PUC-PR, onde foi realizada a pesquisa. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura controlada através do ar condicionado estável de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/ escuro de 12h mantido artificialmente através do *timer* digital *foxlux*[®] com lâmpadas fluorescentes, ração sólida comercial (Nuvital[®] Cr1) e água ad libitum durante todo o período experimental, totalizando 15 dias (FIGURA 1).

Os animais foram pesados e, randomicamente, divididos em 4 grupos de 12 animais, identificados por número e pelo grupo: GC- grupo controle e realizado a radiofrequência desligada e GR- grupo radiofrequência, realizado com a radiofrequência ligada. E ainda, classificados quanto ao dia que foi realizada a eutanásia 7º ou 14º dia P.O

- GC7- grupo controle 7.
- GR7 - grupo radiofrequência 7.
- GC14 - grupo controle 14.
- GR14 - grupo radiofrequência 14.



FIGURA 1- RATOS WISTAR ALBINO UTILIZADOS NO EXPERIMENTO.

3.4 ETAPAS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos foram realizados respeitando-se a Lei Federal nº 11794-08 e o documento normativo do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Anexo 2).

3.4.1 Anestesia

Primeiramente foi realizada a anestesia com ketamina 80 mg/kg e xilazina 8 mg/kg em cada animal, sendo aplicados via intramuscular, cada anestésico em uma coxa.

3.4.2 Marcação da pele

Após anestesia foi realizada tricotomia e antissepsia com povidine-iodine (PVPI). A seguir, o animal foi posicionado em decúbito ventral com os quatros membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco. A marcação com caneta preta foi realizada utilizando molde plástico de 2cm x 2cm (4cm²) confeccionado pela autora (FIGURA 2).

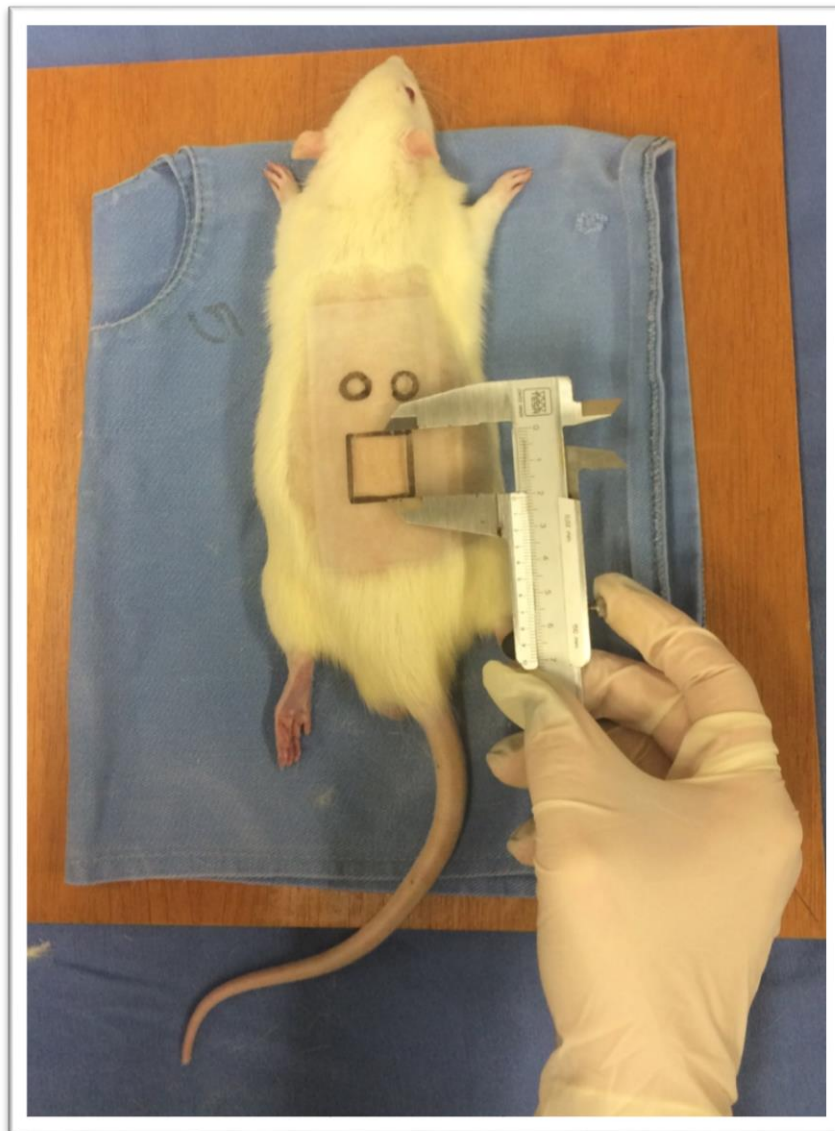


FIGURA 2- MOLDE PLÁSTICO UTILIZADO PARA MARCAÇÃO DA PELE DO RAT0

As demarcações realizadas no dorso do rato foram confeccionadas para realizar a ferida excisional e os *punch* (FIGURA 3).

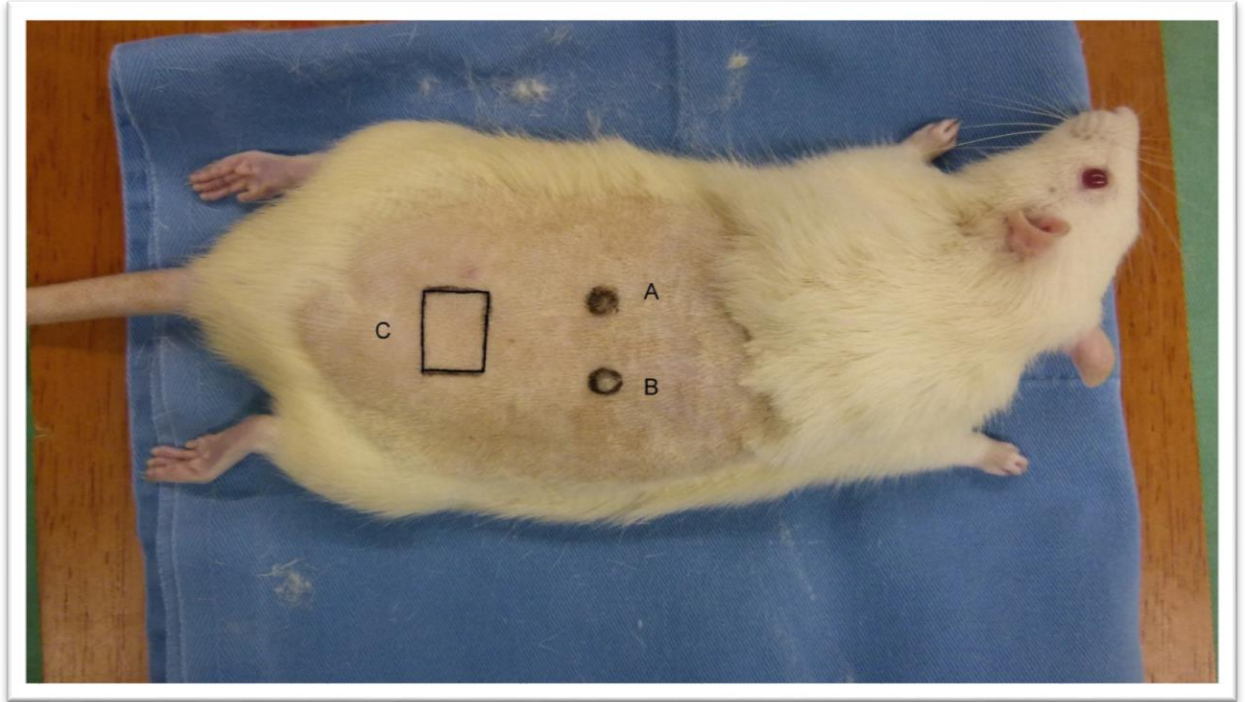


FIGURA 3- MARCAÇÃO COM CANETA PRETA NO DORSO MEDIAL E FERIDA EXCISIONAL, DEMARCADOS POR (A) E (B) AS REGIÕES A SER REALIZADA O PUNCH, E (C) A REGIÃO A SER FEITA O QUADRADO DE 4cm² COM O BISTURI.

3.4.3 Procedimento cirúrgico

Foi realizada incisão com bisturi de lâmina 20 nas bordas laterais do quadrado demarcado, com dissecação do segmento da pele. Adicionalmente, foram realizadas 2 feridas excisionais circulares. Para tanto, utilizou-se um *punch* metálico de 6mm com lâmina cortante na sua borda inferior. Seguiu-se a retirada de dois fragmentos cutâneos, até a exposição da fáscia muscular dorsal (FIGURA 4).

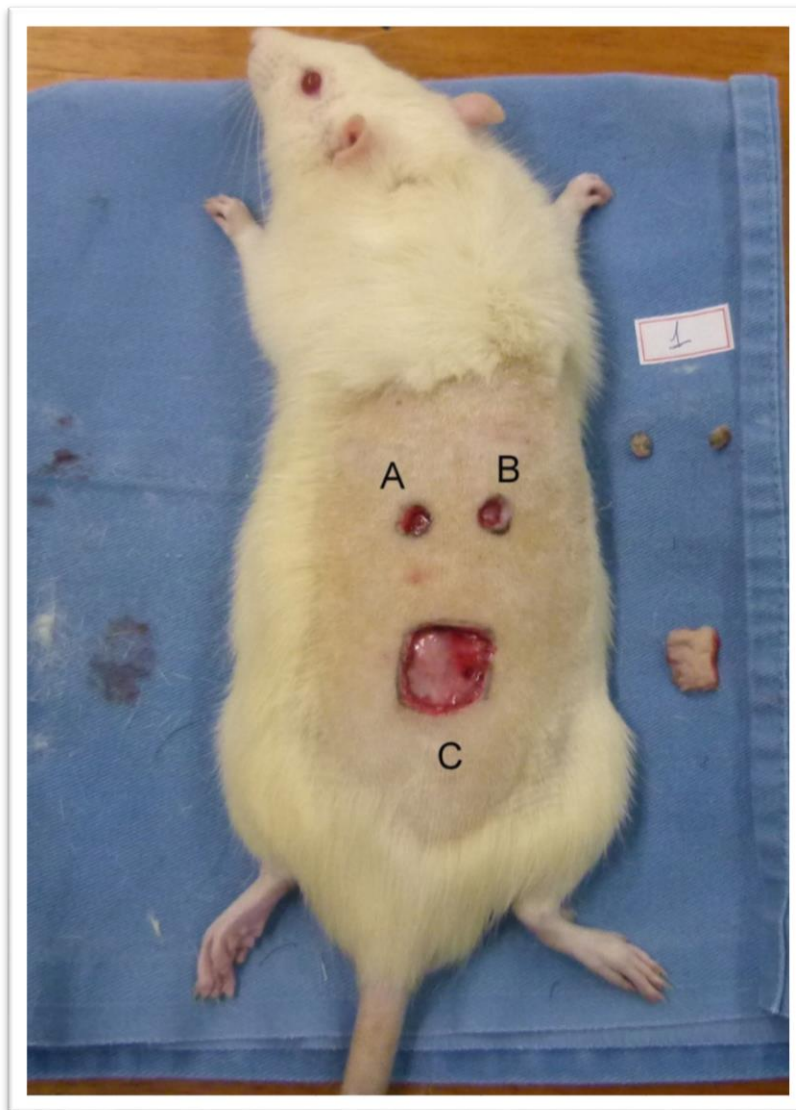


FIGURA 4- RETIRADA DE FRAGMENTOS COM PUNCH METÁLICO E FRAGMENTOS DE 0,6cm DE DIÂMETRO DEMARCADO POR (A) E (B), E REALIZAÇÃO DA FERIDA DE 4cm² E DISSECAÇÃO DO SEGMENTO DE PELE DEMOSTRADO COMO (C).

3.4.4 Pós operatório

Durante os 5 dias subsequentes foi ministrado, por via intramuscular, duas vezes ao dia, 5mg/kg do analgésico dipirona para minimizar a dor ou desconforto que o animal pudesse estar sentindo.

3.5 APLICAÇÃO DA RADIOFREQUÊNCIA

Após 24 h das lesões, foi repetida a mesma anestesia citada, para que durante a aplicação da radiofrequência com o equipamento Spectra® da Tonederm® o rato permanecesse parado. O eletrodo de dispersão de 10 x 5 cm de tamanho foi colocado na região abdominal para aplicação da radiofrequência na região dorsal. O eletrodo ativo foi aplicado durante 7 minutos, 5 minutos sobre a região dorsal, e os outros 2 minutos foram necessários para atingir a temperatura ideal de 38°C. Esse procedimento foi repetido por três vezes em dias alternados, sempre com os ratos sob efeito da anestesia. Utilizou-se equipamento de radiofrequência com amplitude de 100% e com gel neutro para facilitar o deslizamento. A manopla (eletrodo ativo) foi posicionada sobre a pele tricotomizada do dorso do rato em 90° de inclinação e foram realizados movimentos retilíneos e circulares lentos por cima da ferida e pele circunjacente (FIGURA 5). Para isso, a temperatura foi conferida através do termômetro infravermelho que acompanha o aparelho, cuja aferição é precisa e em tempo real. O termômetro foi mantido a distância de 10cm e posicionado a 90° em relação à pele. Em todos os grupos foi realizado o mesmo procedimento com a diferença que no grupo controle o equipamento foi mantido desligado (FIGURA 6).



FIGURA 5- AFERIÇÃO DA TEMPERATURA COM O TERMÔMETRO INFRAVERMELHO.

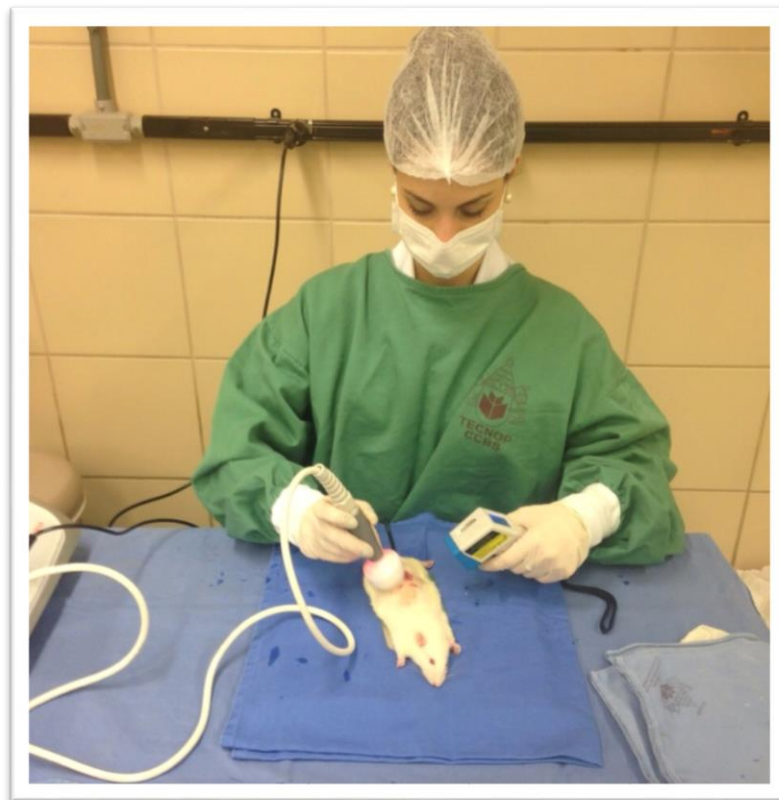


FIGURA 6- REALIZAÇÃO DA RADIOFREQUÊNCIA NO DORSO DO RATO.

3.6 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL

A contração cicatricial da ferida do dorso dos ratos foi comparada mediante análise computadorizada de fotos digitais padronizadas que foram tiradas a 15 cm, com o tripé, da superfície do animal devidamente sedado e posicionado.

A documentação fotográfica foi realizada no dia da cirurgia, 1º dia P.O., no 7º dia P.O. e no 14º dia P.O.

A análise computadorizada foi realizada utilizando o programa computadorizado específico para edição e formatação de imagens, ImageJ® (*National Institutes of Health, EUA*) (FIGURA 7).

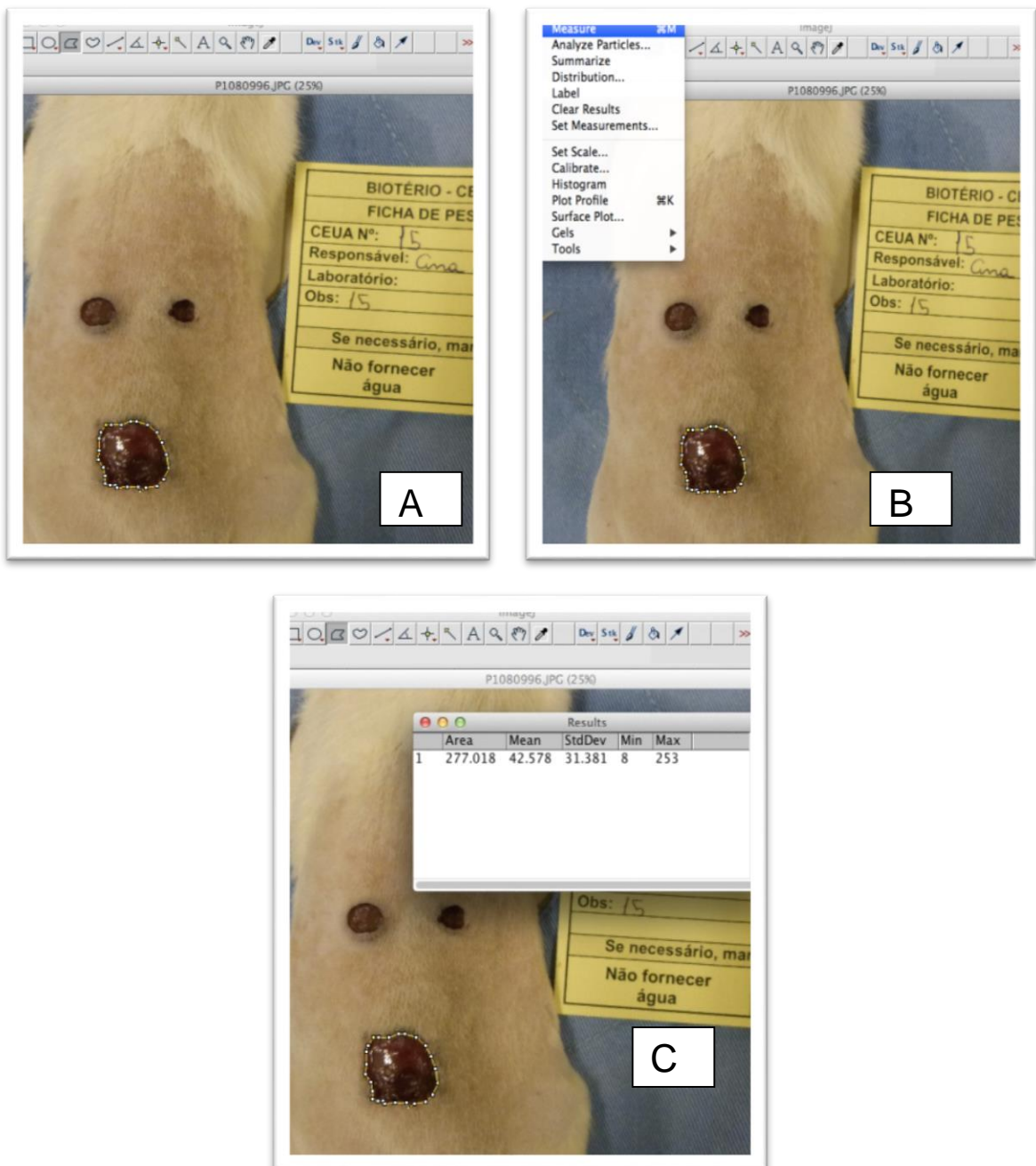


FIGURA 7- TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA. (A) FERIDA EXCISIONAL CONTENDO A ÁREA CRUENTA A SER ANALISADA. (B) UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA NO PROGRAMA COMPUTADORIZADO PARA ANALIZAR A ÁREA (C) RESULTADO DA ÁREA CRUENTA.

3.7 CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS

Para retirada das amostras, realizada no 7^o dia nos grupos GC7 e GR7, e após 14 dias nos grupos GC14 e GR14, os ratos receberam novamente a anestesia intramuscular e as amostras de pele da região foram retiradas cirurgicamente e armazenada em frascos com solução de formaldeído 10%. Após este procedimento os animais foram submetidos à eutanásia na câmara com saturação de CO₂ 70%.

As amostras teciduais imersas em formaldeído 10% foram encaminhadas para confecção das lâminas no laboratório da PUC e realização da análise histológica.

3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras fixadas foram clivadas, acondicionadas em cassetes histológicos e submetidas a processamento em autotécnico para inclusão em parafina. As amostras foram emblocadas, cortadas em micrótomo a 3µm, coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) e montadas.

A análise microscópica em microscópio óptico Olympus modelo CX31[®], foi realizada por médico patologista, sem saber a que grupo pertencia o rato. Isso permitiu avaliar de forma semi-quantitativa o componente inflamatório celular, os elementos celulares da inflamação crônica e aguda, reparação e proliferação fibroblástica, os quais foram quantificados conforme descrito no QUADRO 1. A reepitelização dos *punchs* foi analisada conforme QUADRO 2.

QUADRO 1- PARÂMETROS ANALIZADOS PELO MÉTODO HE

FONTE: JUNQUEIRA (2004)

G R A U	Componente inflamatório celular	Elementos celulares da inflamação crônica: linfócitos	Elementos celulares da inflamação aguda: neutrófilos	Reparação: macrófagos, granulomas	Proliferação fibroblástica
0	Ausência de elementos celulares	Ausência de linfócitos ou plasmócitos	Ausência de neutrófilos, congestão capilar	Não há indícios da reparação	Fibroblastos jovens não são observados
1	Células inflamatórias em pequeno número(junto a vasos)	Pequeno número de linfócitos e/ou plasmócitos	Pequeno número de neutrófilos da derme	Macrófagos em pequeno número	Fibroblastos são observados em áreas de colágeno frouxo
2	Células inflamatória em número moderado, esparsas	Moderado número de linfócitos e/ou plasmócitos	Moderado número de neutrófilos	Macrófagos em moderada quantidade	Fibroblastos são facilmente observados, matriz colágena visível
3	Células inflamatória em número moderado, agrupamentos	Numerosos linfócitos/ plasmócitos	Exsudato neutrófilico	Macrófagos em núm.mod, sem arranjo específico.	Fibroblastos facilmente observados, matriz colágena e proliferação capilar
4	Numerosas células inflamatórias	Numerosos linfócitos, nódulos, linfóides, coroas linfocitárias	Exsudato neutrófilico, abscessos	Macrófagos arranjados em granulomas	Fibroblastos são numerosos, matriz colágena presente, proliferação capilar

Sendo os parâmetros utilizados na avaliação por HE subjetivos, foi denominado graus de 0, menor número encontrado de células, até 4 contendo numerosas células, afim de transformar esses dados em valores numéricos e permitir análise estatística.

QUADRO 2 - MÉTODO USADO PARA ANALISAR A REEPITELIZAÇÃO DAS LESÕES CAUSADAS PELO PUNCH.

	Reepitelização
+	Epiderme íntegra
-	Solução de continuidade epidérmica associada a inflamação e/ou crostas (ulceração)

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram tabulados em planilha no programa *Microsoft Office Excel*® e os resultados obtidos das variáveis quantitativas foram descritos por média e desvio padrão. Para comparação de dois grupos em relação à área na avaliação no momento da cirurgia, foi utilizado o teste *t de Student* para amostras independentes. Esta comparação para as avaliações de área no 1º dia, no 3º dia e no dia da eutanásia e para as diferenças de área em relação ao momento da cirurgia, foi feita usando-se o modelo de análise de covariância (ANCOVA) incluindo-se a área na cirurgia como co-variável. Para a comparação dos quatro momentos de avaliação em relação à área, foi considerado o modelo de análise da variância com medidas repetidas (ANOVA) e o teste LSD (*least significant difference*) para as comparações múltiplas. Nas comparações de dois grupos em relação às variáveis de HE foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Em relação à variável ulceração, os grupos foram comparados considerando-se a análise (1-way ANOVA) com pós teste de Turkey. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional *IBM SPSS v.20* e *Graph pad prism 5.0*.

4 RESULTADOS

Durante a coleta de dados, o número de ratos diminuiu de 48 para 43, 5 ratos morreram durante os procedimentos com a radiofrequência e foram retirados da pesquisa.

4.1 COMPARAÇÕES DOS GRUPOS EM RELAÇÃO À AVALIAÇÃO DA ÁREA DA FERIDA.

A evolução da redução da área de lesão em cada um dos tempos do experimento, analisadas pela planigrafia digital, esta apresentada nos gráficos, abaixo (GRÁFICO 1,2).

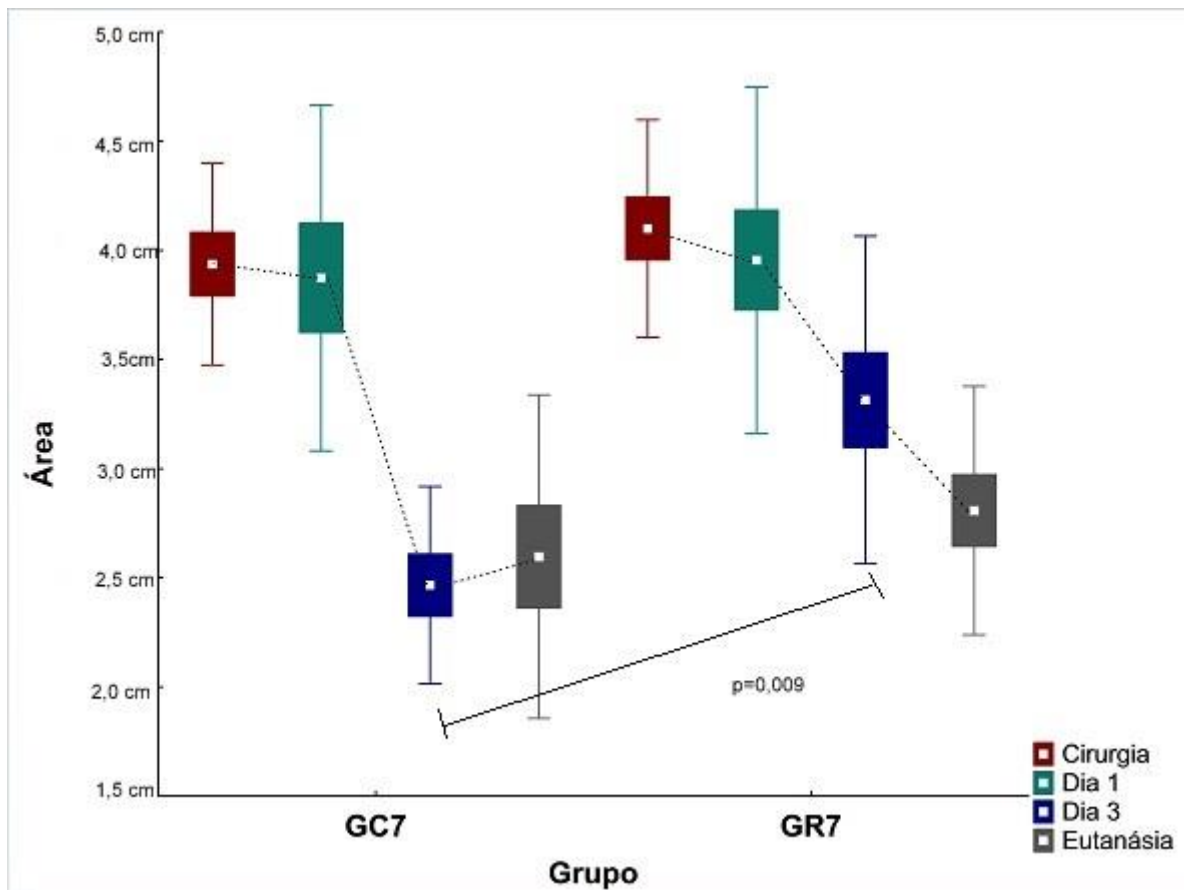


GRÁFICO 1- COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GR7 E GC7 EM RELAÇÃO ÀS AVALIAÇÕES PARA ÁREA NOS MOMENTOS CIRURGIA, 1 DIA , 3 DIA E EUTANÁSIA.

Observa-se que a média da área no dia 3 do grupo GR7 é maior que a área no grupo GC7 (GR7 $3,3\text{cm}^2 \pm 0,7\text{cm}^2$ X GC7 $2,4\text{cm}^2 \pm 0,4\text{cm}^2$, $p=0,009$). No gráfico acima é possível observar que no grupo GR7 a área diminui gradativamente ao longo do tempo. Já no grupo GC7 há diminuição expressiva do 1º para o 3º dia.

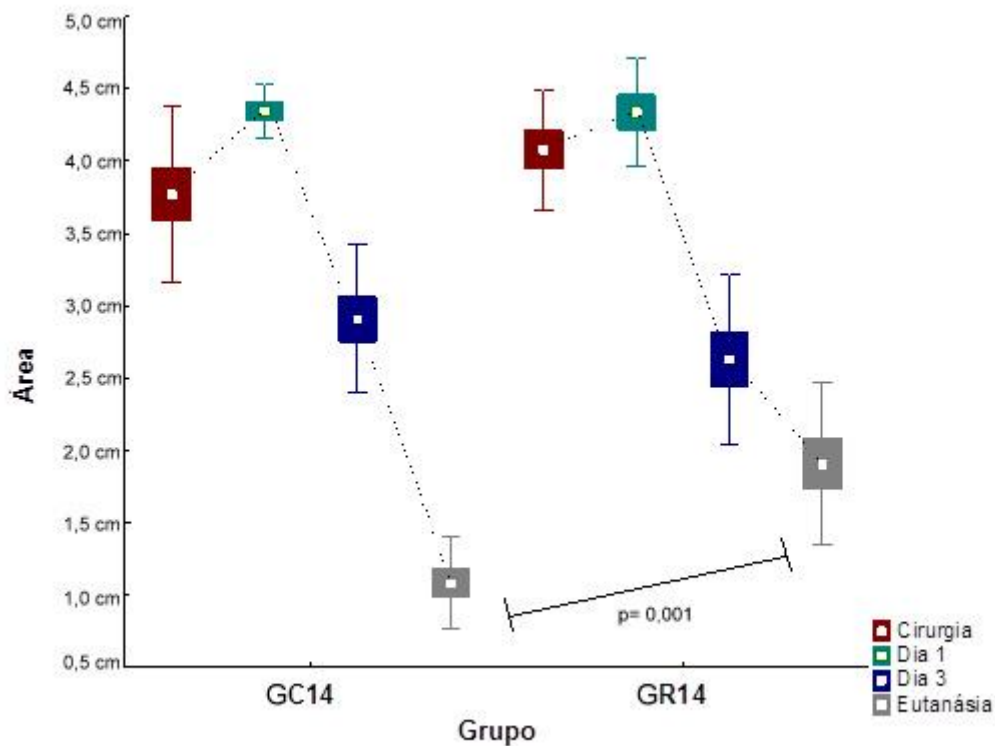


GRÁFICO 2- COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GR14 E GC14 EM RELAÇÃO ÀS AVALIAÇÕES PARA ÁREA NOS MOMENTOS CIRURGIA, 1 DIA, 3 DIA E EUTANÁSIA.

No GR14 foi encontrada área maior do que no GC14 no dia da eutanásia com diferença significativa entre os grupos (GR14 $1,9\text{cm}^2 \pm 0,5\text{cm}^2$ X GC14 $1,0\text{cm}^2 \pm 0,3\text{cm}^2$, $p=0,001$). Observa-se no gráfico acima que ambos os grupos apresentam um declínio da área no 3º dia, entretanto no grupo GR14 há diminuição menor da área da ferida no dia da eutanásia do que no grupo GC14.

4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA

No 7^o e 14^o dia de pós-operatório as feridas dos grupos controle e experimento de todos os animais exibiram aspectos diferentes entre si. Houve fechamento de 90% das feridas no GC14 enquanto 10% mantiveram-se ulceradas. No GR14, 60% dos ratos com feridas de *punch* foram reepitelizadas enquanto 40% permaneceram ulceradas. Mostrando uma diferença significativa entre GR14 e GC14 com o $p=0,018$. No GC7, 70% das feridas de *punch* permaneceram ulceradas e 30% foram reepitelizadas. Já no GR7, 8% dos ratos, com feridas de *punch* foram reepitelizadas e 92% dos ratos permaneceram ulcerados (TABELA 1).

TABELA 1- COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E RADIOFREQUÊNCIA NO 7^o e 14^o DIA EM RELAÇÃO À VARIÁVEL ULCERAÇÃO.

ULCERAÇÃO	GC7	GR7	GC14	GR14
n	10	12	11	10
PRESENTE(%)	70	92	10	40
AUSENTE(%)	30	8 *	90	60**
* $p=0,500$				
** $p=0,018$				

Teste estatístico:1-way ANOVA com pós teste de Turkey

Nas figuras 8 e 9, pode-se observar um exemplo da evolução em detalhes das feridas de *punch* e quadrado, nos dias de cirurgia, 1^o dia P.O., 3^o dia P.O. e eutanásia no 7^o dia P.O. do GC7.

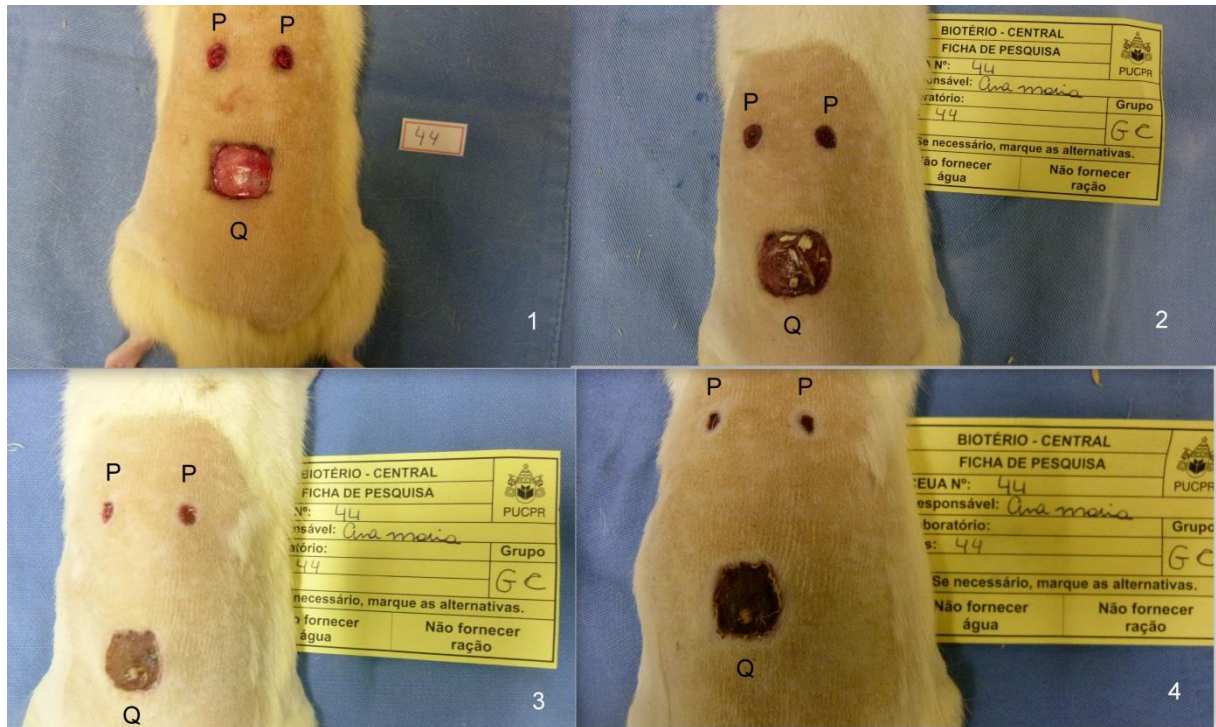


FIGURA 8: EXEMPLO DE FERIDAS DE PUNCH E QUADRADO REPRESENTADO POR P (PUNCH) Q (QUADRADO) DO GC7 NO DIA DA CIRURGIA (1), 1º DIA P.O (2), 3º DIA P.O (3) E EUTANÁSIA 7º DIA P.O (4).



FIGURA 9: EXEMPLO DE FERIDAS DE PUNCH E QUADRADO REPRESENTADO POR P (PUNCH) Q (QUADRADO) DO GR7 DO DIA DA CIRURGIA (1), 1º DIA P.O (2), 3º DIA P.O (3) E EUTANÁSIA 7º DIA P.O (4).

Exemplo na figura 10 e 11, nas feridas de *punch* e quadrado do GC14 realizadas do dia da cirurgia, 1º dia P.O, 3º dia P.O e eutanásia 14º dia P.O.



FIGURA 10: EXEMPLO DE FERIDAS DE PUNCH E QUADRADO REPRESENTADO POR P (PUNCH) Q (QUADRADO) DO GC14 DO DIA DA CIRURGIA (1), 1º DIA P.O (2), 3º DIA P.O (3) E EUTANÁSIA 14º DIA P.O (4).

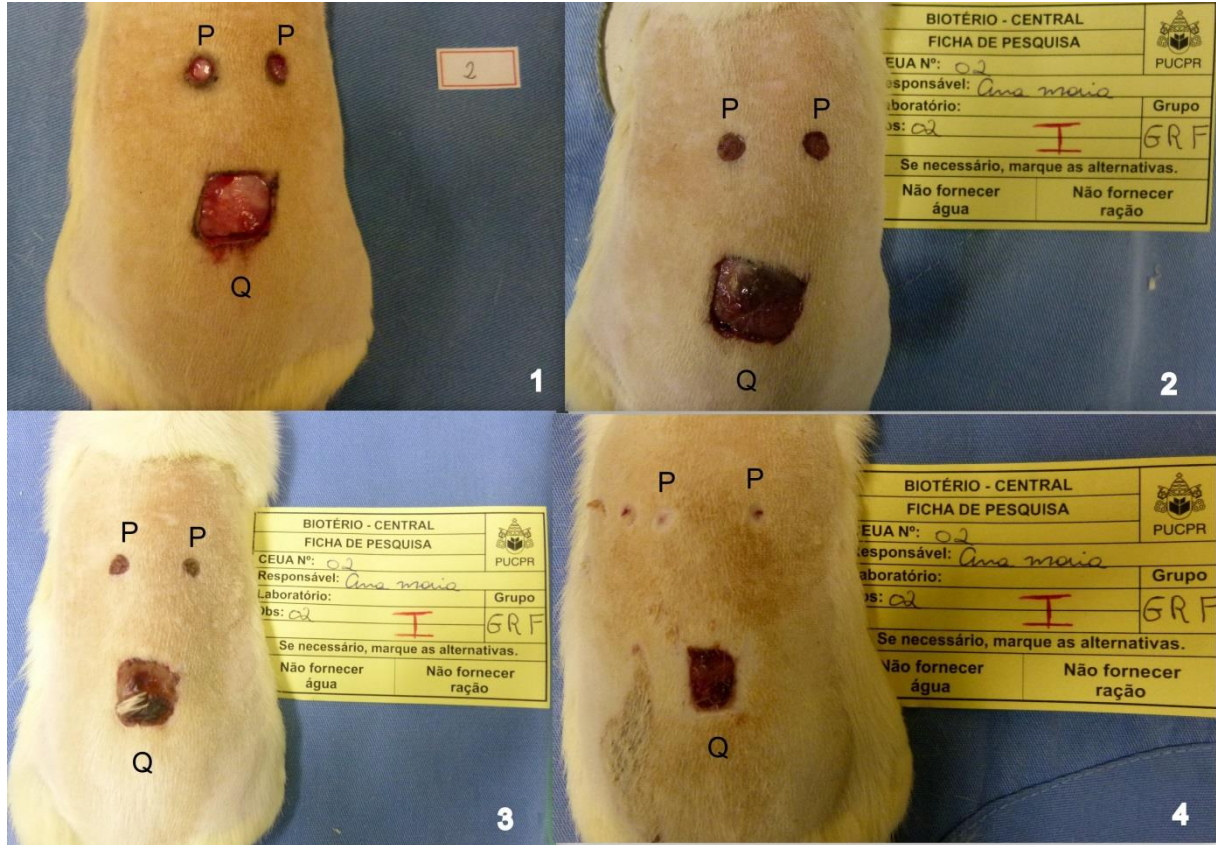


FIGURA 11: EXEMPLO DE FERIDAS DE PUNCH E QUADRADO REPRESENTADO POR P (PUNCH) Q (QUADRADO) DO GR14 DO DIA DA CIRURGIA (1), 1º DIA P.O (2), 3º DIA P.O (3) E EUTANÁSIA 14º DIA P.O (4).

No detalhe da figura 12, observam-se importantes alterações macroscópicas.



FIGURA 12: NA FIGURA 1, OBSERVA-SE QUE NO GC14 OS PUNCHS APRESENTAM-SE FECHADOS ENQUANTO NA FIGURA, 2 NO GR14 OS PUNCHS ESTÃO MAIS ABERTOS, TAMBÉM É VISÍVEL QUE NO GR14 O QUADRADO ESTÁ MAIOR QUANDO COMPARADO AO QUADRADO DO GC14.

4.3 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GC E GR EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DE HE

Somente no GR7, na avaliação das células de inflamação crônica houve diferença entre os grupos (GR7 $1,9 \pm 0,7$ X GC7 $2,5 \pm 0,5$, $p= 0,05$) (TABELA 2).

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GC7 E GR7 EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DE HE, INFLAMAÇÃO, INFLAMAÇÃO CRÔNICA, INFLAMAÇÃO AGUDA, PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA.

QUADRADO-Q – 7 dias

Variável	Grupo	N	Media± dp	Valor de p* (GC x GR)
Q-Inflamação	GC7	10	2,8±0,4	0,381
	GR7	12	2,6±0,5	
Q-Inflamação crônica	GC7	10	2,5±0,5	0,050
	GR7	12	1,9±0,7	
Q-Inflamação aguda	GC7	10	2,0±0,5	0,539
	GR7	12	2,5±1,1	
Q-Proliferação Fibroblástica	GC7	10	2,9±0,3	0,381
	GR7	12	2,7±0,5	
Q-Reparação	GC7	10	1,5±0,7	0,872
	GR7	12	1,6±1,0	

*teste estatístico t de Student; $p < 0,05$

No GR14 observou-se um aumento de células de inflamação aguda (GR14 $3,2 \pm 0,9$ x GC14 $1,5 \pm 0,9$, $p=0,001$) e para a variável inflamação o GR14 também apresentou um número de células maiores (GR14 $3,2 \pm 0,6$ x GC14 $2,4 \pm 0,5$, $p=0,01$) (TABELA 3).

TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS GC14 E GR14 EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DE HE, INFLAMAÇÃO, INFLAMAÇÃO CRÔNICA, INFLAMAÇÃO AGUDA, PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA.

QUADRADO-Q – 14 dias

Variável	Grupo	N	Media $\pm dp$	Valor de p* (GC x GR)
Q-Inflamação	GC14	11	2,4 \pm 0,5	0,010
	GR14	10	3,2 \pm 0,6	
Q-Inflamação crônica	GC14	11	2,2 \pm 0,4	0,349
	GR14	10	1,9 \pm 0,6	
Q-Inflamação aguda	GC14	11	1,5 \pm 0,9	0,001
	GR14	10	3,2 \pm 0,9	
Q-Proliferação fibroblástica	GC14	11	2,5 \pm 0,5	0,918
	GR14	10	2,4 \pm 0,8	
Q-Reparação	GC14	11	2,4 \pm 1,3	0,061
	GR14	10	1,3 \pm 0,7	

*teste estatístico t de Student; $p < 0,05$

4.4 COMPARAÇÃO DAS FERIDAS DO QUADRADO NOS DIAS DE AVALIAÇÃO, DENTRO DOS GRUPOS GC E GR, EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DE HE.

A média da inflamação foi similar nos GR7 e GC7 (GR7 $2,6 \pm 0,5$ X GC7 $2,8 \pm 0,4$, $p=0,3$) o que demonstra células inflamatórias em número moderado e esparsas. A média maior no GR14 em relação ao GC14 (GR14 $3,2 \pm 0,6$ X GC14 $2,4 \pm 0,5$, $p=0,01$) mostrou células inflamatória em número moderado e agrupamentos de células. (GRÁFICO 3)

A inflamação crônica se manteve igual nos GR7 e GR14 (GR7 $1,9 \pm 0,7$ X GR14 $1,9 \pm 6$, $p=0,82$) demonstrando pequeno número de linfócitos e/ou plasmócitos nos diferentes dias de eutanásia, enquanto no GC7 e GC14 esses elementos celulares da inflamação crônica, mostraram moderado número de linfócitos e/ou plasmócitos, (GC7 $2,5 \pm 0,5$ X GC14 $2,2 \pm 0,4$, $p=0,22$).

Na análise dos elementos celulares da inflamação aguda, o GR7 teve número similar de células em relação ao GC7 (GR7 $2,5 \pm 1,1$ X GC7 $2,0 \pm 0,5$, $p=0,53$) e maior número de neutrófilos (inflamação aguda) no GR14 x GC14 (GR14 $3,2 \pm 0,9$ X GC14 $1,5 \pm 0,9$, $p=0,001$).

Na proliferação fibroblástica observou-se similaridade entre os grupos GR7 e GC7 (GR7 $2,7 \pm 0,5$ X GC7 $2,9 \pm 0,3$, $p=0,38$) com fibroblastos facilmente observados, matriz colágena e proliferação capilar. O GR14 e GC14 também foram similares, com fibroblastos facilmente observados e matriz colágena visível. (GR14 $2,4 \pm 0,8$ X GC14 $2,5 \pm 0,5$, $p=0,91$).

A reparação apresentou macrófagos em pequeno número e foi similar nos grupos GR7 e GC7 (GR7 $1,6 \pm 1,0$ X GC7 $1,5 \pm 0,7$, $p=0,87$), porém o GR14 mostrou tendência a menos quantidade de macrófagos em relação ao GC14, com presença de macrófagos em pequeno número, enquanto no GC14 a presença de macrófagos foi moderada, (GR14 $1,3 \pm 0,7$ X GC14 $2,4 \pm 1,3$, $p=0,06$).

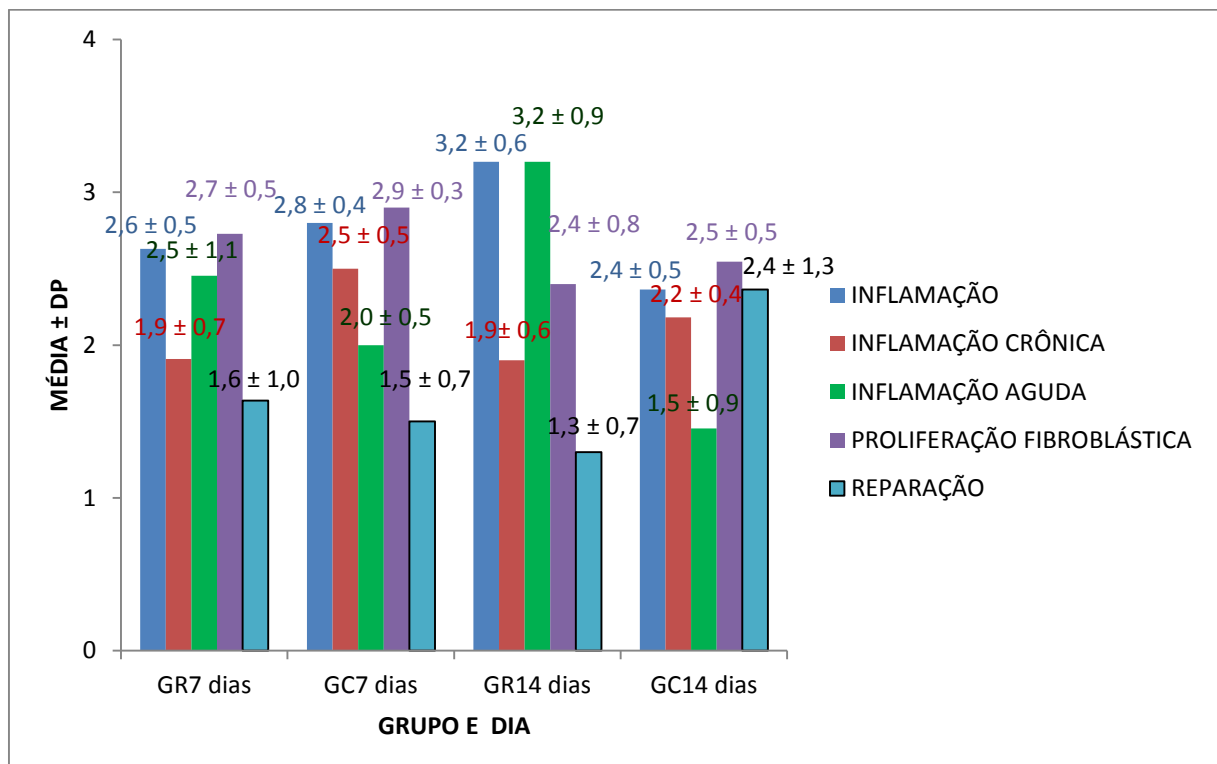


GRÁFICO 3- COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES FEITA PELO HE EM RELAÇÃO À INFLAMAÇÃO, INFLAMAÇÃO CRÔNICA, INFLAMAÇÃO AGUDA, PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA E REPARAÇÃO NOS GRUPOS CONTROLE GC E GRUPO RADIOFREQUÊNCIA GR NO 7º DIA DA EUTÂNASIA E NO 14º DIA DA EUTÂNASIA.

5 DISCUSSÃO

Comumente utiliza-se o rato Wistar como modelo experimental do estudo da cicatrização, por ser um animal de pequeno porte, resistente a infecções, de fácil aquisição e padronização em relação à idade, peso, sexo, alimentação, alojamento e podem ser usados em amostras significativas.

Apesar de muitas espécies mamíferas simularem a cicatrização humana, nenhuma realmente se iguala. Na pele de rato não há definição entre derme papilar e derme reticular. Este animal não forma cicatrizes hipertróficas ou quelóides, possui a derme mais espessa e não apresenta tecido gorduroso subcutâneo nem tela muscular subcutânea. Os vasos sanguíneos são subdérmicos e apresentam as mesmas modificações de perfusão de macro e microvascularização (SANTOS, 2006; BETTES, 2003).

No presente estudo, a radiofrequência monopolar foi escolhida por ter resultados positivos no tratamento de flacidez de pele, aumento de fibroblastos e colágeno, os quais tem grande influência na cicatrização.

Entretanto o aparelho de radiofrequência foi desenvolvido para ser utilizado em humanos, o tamanho da sua manopla de aplicação e principalmente o tamanho da placa condutora de corrente, são fatores relevantes que podem ter influenciado nos resultados. O fato da manopla não ficar totalmente em contato com a pele do rato e alguns animais terem urinado durante a aplicação da radiofrequência enquanto anestesiados foi determinante para o episódio de queimaduras na pele do rato, o que sugere que nos próximos estudos encontre-se alguma maneira de esvaziar a bexiga destes animais antes do procedimento.

Na comparação dos grupos GC7 e GR7 em relação às avaliações da contração da ferida nos momentos cirurgia, 1º dia, 3º dia e eutanásia, foi encontrada no dia 3 área significativamente menor do GC7 em relação ao GR7 ($p=0,009$). Quando comparada a área no dia da eutanásia do GC14 e GR14, foi encontrado área menor no CG14 em relação ao GR14 apresentando diferença significativa de ($p=0,001$), mostrando que macroscopicamente na cicatrização de feridas cutâneas,

a radiofrequência prolongou o processo inflamatório reduzindo a contração das feridas nos grupos em que a radiofrequência foi aplicada.

Na análise macroscópica do *punch* na qual foi observada se houve ou não reepitelização da ferida, no GC7, 30% foram reepitelizadas enquanto somente 8,34% fecharam no GR7, 90,91% das feridas no GC14 fecharam, enquanto 60% fecharam no GR14, mostrando a possível influência que a radiofrequência teve sobre a reepitelização das feridas.

A avaliação histológica do processo cicatricial foi realizada pela coloração de Hematoxilina-Eosina por ser uma técnica simples e adequada para quantificar e identificar os elementos celulares nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento do processo cicatricial. A reação inflamatória é importante para a cicatrização, mas é um fator nocivo se for intensa, pelo comprometimento da microcirculação local e da proliferação de fibroblastos (GOMES, 2006).

Correlacionando a contração da ferida com o HE, observou-se que a ferida não cicatrizou completamente e se manteve ulcerada após radiofrequência no GR14. No 14º P.O apresentou número maior de células de componente inflamatório celular e elementos celulares da inflamação aguda: neutrófilo sem relação ao grupo controle.

No GR7 as células de inflamação crônica mostraram-se em número reduzido, supostamente devido ao agente agressor, possivelmente a radiofrequência, mostrando que a influência do calor faz com que haja tentativas de cura pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo (ROBBINS; COTRAN, 2010).

Na comparação dos grupos GC e GR, em relação à variáveis de HE (inflamação, inflamação aguda, inflamação crônica, inflamação fibroblástica e reparação). Os achados sugerem que no GR14 o fato da radiofrequência aumentar a vasodilatação, o calor e o edema aumentaram o processo inflamatório por mais tempo.

A inflamação apresenta-se similar nos GC7 e GR7 que é o esperado pelo tempo de reparo. Já no GC14 observa-se atenuação da inflamação no 14º P.O, enquanto no GR14 houve persistência do processo inflamatório. Esses achados

sugerem que a radiofrequência aumenta a vasodilatação, o calor e o edema aumentando assim o processo inflamatório por mais tempo e prejudicando na reparação. Os autores Borges (2010) e Carvalho (2011), afirmam que por ação do agentes quimiotáxicos a fase inflamatória termina após sete dias, entretanto o aumento de vasos é notado na região.

A inflamação crônica esteve presente no GC14 e GR14, similar à literatura, tendo em vista que a inflamação crônica tem duração prolongada e pode durar semanas ou meses (ROBBINS; COTRAN 2010).

Nos resultados foi encontrado no GR14, na análise de HE aumento de células de inflamação aguda que segundo Robbins & Cotran (2010), não deveria ocorrer nessa fase, pois a inflamação aguda é uma resposta que serve para levar leucócitos e proteínas do plasma para o local injuriado. Visto que a inflamação só tem seu fim quando o agente agressor é eliminado, esses achados sugerem que a influência da radiofrequência nesse grupo foi prolongar o processo inflamatório. A resposta inflamatória é ligada ao processo de reparo, ao mesmo tempo que ela destrói, dilui e retira os agentes injuriantes, ela tenta reparar o tecido danificado. O reparo tem início durante a inflamação, mas termina usualmente depois que a influência injuriante que no caso pode ter sido causada pela radiofrequência, tenha sido cessada.

No estudo de Choi *et al* (2012) no qual foram realizadas sessões de radiofrequência em coelhos, foram encontradas, na análise histológica, reações inflamatórias mais proeminentes com crescimento celular inflamatório intenso, associada com inflamação aguda quando comparado com o grupo controle. Esse efeito mostrou mais destaque com a evolução, mostrando mudanças nanoestruturais em fibrilas de colágeno dérmico.

De acordo com os resultados do estudo de Carvalho *et al* (2011), que analisou os efeitos da aplicação de 3 sessões de radiofrequência em dias alternados na pele de 20 ratos, sete dias após as aplicações o colágeno sofreu alterações, tornando-se mais denso, com presença de neocolagênese. Após quinze dias não ocorreram mais formação neocolágena importante, porém a neoelastogênese esteve presente no 15º e 21º dia. Foi observado um processo inflamatório intenso com a presença de desgarramento epitelial e áreas edematosas após 24 horas da

aplicação de RF, resultados semelhantes aos de Brown e Almeida (2005), sugerindo que a RF gera inflamação no tecido em que foi aplicado, com a formação de edema, aumento da vascularização do fluxo sanguíneo, podendo gerar hemorragias e a estimulação de fibroblastos. Achados similares também foram encontrados nesse trabalho.

Nos estudos de Carvalho *et al* (2011) foi possível concluir em relação aos efeitos da radiofrequência no tecido colágeno, que três aplicações utilizando temperatura de 37 graus por dois minutos no dorso de ratos Wistar, resultaram na neocolagênese nas análises que correspondiam aos sacrifícios em 24 horas e 7 dias após a última aplicação. Nos grupos com sacrifício em 15 e 21 dias não foi possível encontrar mudanças no tecido colágeno, nem presença de neocolagênese. Entretanto, após investigação de possíveis alterações em fibras elásticas, evidenciou-se a neoelastogênese.

Foram encontrados na literatura estudos semelhantes, porém com a utilização de outros equipamentos como a influência cicatricial do laser na cicatrização de ratos. O calor pode alterar o processo cicatricial que por muitas vezes é complexo e imprevisível, e não raramente o pode apresentar cicatrizes hipertróficas ou quelóides. No estudo de Mordon (2010) o laser foi aplicado imediatamente após suturada a incisão na mama, com uma fluência de 110J/ cm². Este estudo mostrou diminuição acentuada do colágeno tipo I e fibronectina em cicatrizes tratadas por laser, bem como houve decréscimo do colágeno tipo III, tendo em vista que o processo de cicatrização patológica é associada a alta taxa de colágeno tipo I e tipo III, enquanto que um valor baixo conduz um processo de cicatrização.

Segundo Brown e Almeida (2005), a radiofrequência causa uma série de eventos inflamatórios no tecido, destacando-se aumento da vascularização, do fluxo sanguíneo e edema, podendo causar hemorragias e a estimulação de fibroblastos. Corroborando com a afirmação de Del Pino (2006), a radiofrequência aumenta a temperatura nas camadas mais profundas da derme, originando alterações morfológicas como aumento de fibroblastos e da vascularização.

Abercrombie, Flint e James (1954 apud Yaguishita 2006) estudaram a contração e a colagenização fisiológica, de lesões no dorso lombar de forma

quadrangular em ratos, essas são os mecanismos de maior importância de reparação tecidual nesses animais. A contração iniciava no 5º PO e terminava 10 dias depois, enquanto a fibrose tinha seu início no 5º dia e continuava após a contração ter terminado e as fibras de colágeno apareciam depois de 25 dias do experimento.

Por conseguinte, os efeitos da radiofrequência no processo de contração e cicatrização, num aspecto geral mostraram-se ruins para a utilização no período inicial de pós operatório, encoraja novas pesquisas que avaliem a formação e quantidade de colágeno. Perspectivas apontam para uma aplicação da radiofrequência mais tardia no pós operatório de cicatrização cutânea afim de observar os resultados em outra fase da cicatrização concorrobando com Agne (2009) mostrou que os efeitos da radiofrequência permanecem por 1 a 4 meses após a aplicação. Outra observação é para a redução da dose da radiofrequência.

Novos estudos com outros tipos de animais que tenham maior semelhança com o tecido cutâneo humano devem ser realizados, avaliando diferenças na dosimetria da radiofrequência, temperatura utilizada, número de sessões e a contagem do número de células de colágeno.

6 CONCLUSÃO

Em relação aos efeitos da radiofrequência, pode-se concluir que após três aplicações de radiofrequência em dias alternados utilizado temperatura de 38° no dorso de ratos Wistar, as feridas tratadas com radiofrequência mostram:

- 1- Retardo da contração das feridas excisionais.
- 2- Prolongamento do tempo do processo inflamatório agudo, o qual é mantido por maior tempo que o fisiológico provavelmente por influência da radiofrequência, mantendo a ferida ulcerada.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. T.; MASHKEVICH, G. Monopolar Radiofrequency SkinTightening. **Facial Plast Surg Clin N Am**, v. 15. p 169–177, 2007.
- AGNE, J.E. **Eu sei eletroterapia**. Santa Maria-RS: Editora Pallotti, 2009.
- AGNE, J.E. **Eletrotermofototerapia**. 1. ed. Santa Maria, RS: O Autor, 2013.
- BROWN, A.; ALMEIDA, G. Novel radiofrequency device for cellulite & body reshaping therapy. **Alma Laser**, São Paulo. 2005. Disponível em: <http://www.almalasers.com/int/>. Acesso em: 30/08/2014.
- ATIYEH, B.S.; DIBO, S.A. Nonsurgical nonablative treatment of aging skin: radiofrequency technologies between aggressive marketing and evidence-based efficacy. **Aesthetic Plast Surg**, v. 33, n.3, p. 283-94. Maio 2009.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 27-51, jan./mar. 2005.
- BETTES, P.S.L. **Análise comparativa histológica etensiométrica entre a cicatrização deferidas cutâneas tratadas com o adesivoocil-2-cianoacrilato e com sutura intradérmica em ratos**. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- BOCK, V.; NORONHA, A.F. Estimulação da neocolagênese através da radiofrequência, **Rev eletrônica Saúde e Ciência**. Dianópolis, v. 3, n. 2, p.7-17, 2013.
- BORGES, F. S.; SCORZA, F. A.; JAHARA, R. S. **Modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas**. SãoPaulo: Phortes, 2010.

BLOOM, B.S.; EMER, J.; GOLDBERG, D.J. Assessment of safety and efficacy of a bipolar fractionated radiofrequency device in the treatment of photo damaged skin. **J Cosmet Laser Ther**. New York, v.14, n. 5, p. 208-11, 2012.

BRASILEIRO FILHO, G.; BOGLIOLO, L. **Patologia geral básica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRAVO, B.S.F.; ISSA, M.C.A.; MUNIZ, R.L.S.; TORRADO, C.M. Tratamento da lipodistrofia ginóide com radiofrequência unipolar: avaliação clínica laboratorial e ultrassonográfica. **Surg Cosmet Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 138-144, 2013.

CAETANO, G. F. **Biomembrana de quitosana- alginato na cicatrização de úlceras cutâneas de ratos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CAMARGO, P.A. **Estudo imunoistoquímico da angiogênese e da fibrogênese na prega vocal de suínos após exérese de fragmento de mucosa utilizando instrumental a frio e laser co2**. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CARVALHO, G.F.; SILVA, R.M.V.; MESQUITA, J.J.T.F.; MEYER, P.F.; RONZIO, O.A.; MEDEIROS, J.O, et al. Avaliação dos efeitos da radiofrequência no tecido conjuntivo. **Especial Dermatologia**, Natal, RN, v. 68, 2011.

CLARK, R.A.F.; ADAM, J.; SINGER, M.D.; RICHARD, A.F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, 1999.

CEPEDA, A.M.C.; ERZINGER, G.F.D. Efeitos da radiofrequência da gordura abdominal. **Revista Inspirar Movimento & Saúde**, v. 4, n.1, p.15-21, jan./fev. 2012.

COSTA, E.M.; MEYER, P.F.; FURTADO, F.N.B.; MEDEIROS, M.L.; DANTAS, J.S.C.; RONZIO, O.A. Avaliação dos efeitos do uso da tecaterapia na adiposidade abdominal. **K**, 2009.

CHOI, S.; CHEONG, Y.; SHIN, J.H.; LEE, H.J.; LEE, G.J.; CHOI, S.K.; JIN, K.H.; PARK, H.K. Short-term nanostructural effects of high radiofrequency treatment on the skin tissues of rabbits. **Lasers Med Sci**, Korea, v. 27, n.5, p. 923-33. Set 2012.

DEL PINO, E. et al. Effect of controlled volumetric tissue heating with radiofrequency on cellulite and the subcutaneous tissue of the buttocks and thighs. **J of Drugs in Dermatol**, México, v. 5, set 2006.

EHRlich, H. P.; KRUMMEL, T. M. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. **Wound Repair Regen.**, v. 4, p. 203-6, 1996.

FITZPATRICK, R.; GERONEMUS, R.; GOLDBERG, D.; KAMINER, M.; KILMER, S.; RUIZ-ESPARZA, J. Multicenter study of noninvasive radiofrequency for periorbital tissue tightening. **Lasers Surg Med**, v. 33, n. 4, p. 232-42, 2003. Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14571447>. Acesso em : 23/04/14

FORREST, L. Current concepts in soft connective tissue wound healing (review). **Br. J. Surg**, Guildford, v. 70, p.133-42, 1983.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermatofuncional**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2002.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-Funcional: fundamentos recursos e patologias**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2007.

GEDDES, L.A.; SILVA L.F.; DEWITT, D.P.; PEARCE, J.A. What's new in electrosurgical instrumentation ?. **Med Instrum**. v. 11, n. 6, p. 355-61, 1977. Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/340856>
Acesso em 25/5/2014.

GOMES, C.S.; CAMPOS, A.C.L.; TORRES, O.J.M.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, A.T.R.; TENÓRIO, S.B.; et al. **Efeito do extrato de *passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico.** Acta Cirúrgica Brasileira. 2006; v 21 (2).

HARTH, Y.; LISCHINSKY, D. A novel method for real-time skin impedance measurement during radiofrequency skin tightening treatments. **Journal of Cosmetic Dermatology**, New York, v. 10, p. 24–29, 2011.

HUPP, J.R.; PETTERSON, L.J.; ELLIS III, E. ; HUPP, J.R.; TUCKER, M.R. **Reparação de feridas.** Ed Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LANGE, A. **Fisioterapia Dermato Funcional aplicada à Cirurgia Plástica.** Curitiba: Vitória Gráfica & Editor, 2014.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia prática baseada em evidências.** 11. ed. São Paulo: Manole, 2003.

MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.D.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 393-410, 2003.

MATTOS, R.; FILIPPO, A.; TOREZAN, L. CAMPOS, V. Fontes de energia não laser no rejuvenescimento: parte II. **Surgical e Cosmetic Dermatologi**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, abril./junho. 2009.

MORDON, S.; CAPON, A.; FOURNIER, N.; IARMARCOVAI, G. Lasers thermiques et cicatrization cutanée. **Medecine/Sciences**, França, v. 26. p. 89-94. 2010.

MOREIRA, J. A. R; GIUSTI, H. H. K.D. A fisioterapia Dermato – funcional no tratamento de estrias: revisão de literatura. **Revista Científica da Uniararas**, São Paulo, v. 1, n.2, 2013.

NASCIMENTO, D.S., NIWA, A. B. M. ;OSÓRIO, N. **Radiofrequência e infravermelho-2008**.Indexado na Lilacs Virtual sob nº LLXP: S0034-72642008000900004.

NARESSE, L.E.et al. Efeito da peritonite fecal na cicatrização do cólon distal no rato: avaliação anatomopatológica, estudo da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual. **Acta Cir Bras**, v. 8, n. 2, p. 48-53.1993.

RIBEIRO, C.T. D. **Efeitos do tratamento com hidrogel na cicatrização de úlceras venosas de membros inferiores: revisão sistemática**. 2014. Dissertação (Mestrado em Movimento e Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

RISPOLI, D.Z. **Corticóide Intracordal: efeito na cicatrização da prega vocal após exérese de fragmento de mucosa com laser de CO² em suínos**. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirurgia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ROBBINS, F. R. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROBBINS, I.; COTRAN, R. **Patologia. Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ROCHA, J.C.T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. **Ver Bras Pesq Sau**, Ceará, v. 17, n. 1, p. 44-8, 2004.

SANTOS, M. F. S.; CZECZKO, N. G.; NASSIF, P.A.N.; FILHO, J.M.R.; ALENCAR, B.L.F.; MALAFAIA, O, et al. Avaliação do uso do extrato bruto DE *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. 3, p. 2-7, 2006. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>

SINNO, H.; MALHOTRA, M.; LUTFY J.et al. The effects of topical collagen treatment on wound breaking strength and scar cosmesis in rats. **Can J Plast Surg**, Canadá, v. 20, n. 3, p. 181-185. 2012.

SIMÕES, N.P. **Estudo comparativo entre laser He-Ne e a estimulação elétrica no processo de cicatrização de pele de ratos**. Dissertação

(Mestrado em Tecnologia em Saúde) Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2007.

SCHURCH, W.; SEEMAYER, T.; GABBIANI, G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 22, n. 2, p. 141-7, 1998.

TOLAZZI, A.R.D. **Efeito do Inibidor de Leucotrieno Montelukaste na cicatrização cutânea em ratos: avaliação tensiométrica, da contração cicatricial e da deposição de colágeno.** Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

Disponível em:

<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/13848/EFEITO%20DO%20MONTELUCASTE%20NA%20CICATRIZA%c3%87%c3%83O%20CUT%c3%82NEA%20EM%20RATOS.pdf?sequence=1>. Acesso em 02/11/2013.

VALENTE, F. S. **Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

YAGUISHITA, N.; **Cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa (membracel) em dorso de ratos.** Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 28 de fevereiro de 2013.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 684 – 3ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos da radiofrequência analisados por planigrafia e histologia na cicatrização de feridas cutâneas em ratos

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Maria Cardoso Cepeda

EQUIPE DE PESQUISA:

Ana Maria Cardoso Cepeda

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Mestrado em clínica cirúrgica

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos Wistar	Machos	3 meses / 300-350g	C	48

O colegiado do CEUA em reunião no dia 28/02/2013, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Prof.^a Graziela Maria D Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais



ANEXO 2



Presidência da República
Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos

LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008.

Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

CAPÍTULO I

DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

§ 1º A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I – estabelecimentos de ensino superior;

II – estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 2º O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo **Chordata**, subfilo **Vertebrata**, observada a legislação ambiental.

Art. 3º Para as finalidades desta Lei entende-se por:

I – filo **Chordata**: animais que possuem, como características exclusivas, ao menos na fase embrionária, a presença de notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único;

II – subfilo **Vertebrata**: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral;

III – experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas;

IV – morte por meios humanitários: a morte de um animal em condições que envolvam, segundo as espécies, um mínimo de sofrimento físico ou mental.

Parágrafo único. Não se considera experimento:

I – a profilaxia e o tratamento veterinário do animal que deles necessite;

II – o anilhamento, a tatuagem, a marcação ou a aplicação de outro método com finalidade de identificação do animal, desde que cause apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro;

III – as intervenções não-experimentais relacionadas às práticas agropecuárias.

CAPÍTULO II

DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA

Art. 4º Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Art. 5º Compete ao CONCEA:

I – formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II – credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;

III – monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;

IV – estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V – estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI – estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8º desta Lei;

VIII – apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;

IX – elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

X – assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Art. 6º O CONCEA é constituído por:

I – Plenário;

II – Câmaras Permanentes e Temporárias;

III – Secretaria-Executiva.

§ 1º As Câmaras Permanentes e Temporárias do CONCEA serão definidas no regimento interno.

§ 2º A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia.

§ 3º O CONCEA poderá valer-se de consultores **ad hoc** de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 7º O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por:

I – 1 (um) representante de cada órgão e entidade a seguir indicados:

- a) Ministério da Ciência e Tecnologia;
- b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- c) Ministério da Educação;
- d) Ministério do Meio Ambiente;
- e) Ministério da Saúde;
- f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
- g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil – CRUB;
- h) Academia Brasileira de Ciências;
- i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;
- j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental;
- l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
- m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica;

II – 2 (dois) representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

§ 1º Nos seus impedimentos, o Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia será substituído, na Presidência do CONCEA, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério.

§ 2º O Presidente do CONCEA terá o voto de qualidade.

§ 3º Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público.

CAPÍTULO III

DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUAs

Art. 8º É condição indispensável para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs.

Art. 9º As CEUAs são integradas por:

I – médicos veterinários e biólogos;

II – docentes e pesquisadores na área específica;

III – 1 (um) representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País, na forma do Regulamento.

Art. 10. Compete às CEUAs:

I – cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II – examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV – manter cadastro dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa, enviando cópia ao CONCEA;

V – expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros;

VI – notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras.

§ 1º Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições desta Lei na execução de atividade de ensino e pesquisa, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

§ 2º Quando se configurar a hipótese prevista no § 1º deste artigo, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 e 20 desta Lei.

§ 3º Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 4º Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento.

§ 5º Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

CAPÍTULO IV

DAS CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E USO DE ANIMAIS PARA ENSINO E
PESQUISA CIENTÍFICA

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei.

§ 1º [\(VETADO\)](#)

§ 2º [\(VETADO\)](#)

§ 3º [\(VETADO\)](#)

Art. 12. A criação ou a utilização de animais para pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas no CONCEA.

Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento no CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA.

§ 1º A critério da instituição e mediante autorização do CONCEA, é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição.

§ 2º Na hipótese prevista no § 1º deste artigo, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e centros de criação sob seu controle.

Art. 14. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º O animal será submetido a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento.

§ 2º Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos a eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios vigentes de segurança, desde que destinados a pessoas idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 5º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.

§ 6º Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA.

§ 7º É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares ou de relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.

§ 8º É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º Em programa de ensino, sempre que forem empregados procedimentos traumáticos, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10. Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula.

Art. 15. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão.

Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

CAPÍTULO V

DAS PENALIDADES

Art. 17. As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão às suas disposições e ao seu regulamento, às penalidades administrativas de:

I – advertência;

II – multa de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R\$ 20.000,00 (vinte mil reais);

III – interdição temporária;

IV – suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;

V – interdição definitiva.

Parágrafo único. A interdição por prazo superior a 30 (trinta) dias somente poderá ser determinada em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, ouvido o CONCEA.

Art. 18. Qualquer pessoa que execute de forma indevida atividades reguladas por esta Lei ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA será passível das seguintes penalidades administrativas:

I – advertência;

II – multa de R\$ 1.000,00 (mil reais) a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais);

III – suspensão temporária;

IV – interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta Lei.

Art. 19. As penalidades previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas de acordo com a gravidade da infração, os danos que dela provierem, as circunstâncias agravantes ou atenuantes e os antecedentes do infrator.

Art. 20. As sanções previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo de correspondente responsabilidade penal.

Art. 21. A fiscalização das atividades reguladas por esta Lei fica a cargo dos órgãos dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde, da Educação, da Ciência e Tecnologia e do Meio Ambiente, nas respectivas áreas de competência.

CAPÍTULO VI

DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 22. As instituições que criem ou utilizem animais para ensino ou pesquisa existentes no País antes da data de vigência desta Lei deverão:

I – criar a CEUA, no prazo máximo de 90 (noventa) dias, após a regulamentação referida no art. 25 desta Lei;

II – compatibilizar suas instalações físicas, no prazo máximo de 5 (cinco) anos, a partir da entrada em vigor das normas estabelecidas pelo CONCEA, com base no inciso V do **caput** do art. 5º desta Lei.

Art. 23. O CONCEA, mediante resolução, recomendará às agências de amparo e fomento à pesquisa científica o indeferimento de projetos por qualquer dos seguintes motivos:

I – que estejam sendo realizados sem a aprovação da CEUA;

II – cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 24. Os recursos orçamentários necessários ao funcionamento do CONCEA serão previstos nas dotações do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 25. Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 (cento e oitenta) dias.

Art. 26. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 27. Revoga-se a [Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979](#).

Brasília, 8 de outubro de 2008; 187º da Independência e 120º da República.

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA

Tarso Genro

Reinhold Stephanes

José Gomes Temporão

Miguel Jorge

Luiz Antonio Rodrigues Elias

Carlos Minc

ANEXO 3

Análise do HE

CASO	INFLAMAÇÃO	INFLAMAÇÃO CRÔNICA	INFLAMAÇÃO AGUDA	PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA	REPARAÇÃO	REEPITELIZAÇÃO	OBS
1Q7	3	2	4	3	2	-	
2Q14	3	3	2	3	1	-	
2P14	2	2	0	2	1	+	
4P14	3	2	3	2	1	-	
4Q14	4	2	4	2	3	-	
10P14	2	1	1	3	1	-	
10Q14	4	2	4	3	1	-	
11P14	1	2	0	2	4	+	
11Q14	3	2	3	3	1	-	
13Q14C	3	2	1	3	4	-	
13P14C	2	2	0	2	3	+	
15P7C	3	3	1	3	4	-	
16P14C	1	1	0	2	1	+	
16Q14C	2	2	1	3	1	-	
17P14C	1	1	0	2	2	+	
17Q14C	3	2	3	2	2	-	
18P7C	2	2	2	2	1	-	
18Q7C	3	3	2	3	1	-	
19P14C	1	1	0	2	1	+	
19Q14C	2	2	2	3	1	-	
20P14C	1	1	0	2	1	+	
24P7C	2	2	1	2	1	-	
24Q7C	3	2	2	3	1	-	
27Q7	3	3	2	3	1	-	
29P14	1	1	0	2	1	+	
29Q14	2	1	4	1	1	-	
31P14	1	1	0	2	1	+	
31Q14	3	1	4	1	1	-	NECROSE
32P14	1	1	0	2	2	+	
32Q14	3	2	2	3	1	-	
33P14	2	2	1	2	3	-	
33Q14	4	2	4	2	1	-	NECROSE
36P14	2	2	1	2	1	-	
36Q14	3	2	3	3	2	-	
37P14C	1	1	0	2	2	+	
37Q14C	3	2	1	3	4	-	
38P7C	2	2	2	2	3	+	
38Q7C	3	2	3	3	2	-	
39Q7C	2	3	2	3	2	-	
39P7C	2	1	2	2	1	-	
43Q14C	2	3	0	2	4	+	
43P14C	2	2	1	2	4	-	
41P7C	2	2	1	3	1	-	
41Q7C	3	3	2	3	1	-	
42Q7C	3	2	2	2	1	-	
42P7C	1	1	0	2	1	-	
44Q7C	2	2	1	3	3	-	
44P7C	1	1	0	2	1	+	

45P7C	2	2	1	2	1 -
45Q7C	3	2	2	3	1 -
46Q14C	2	2	0	2	3 -
46P14C	2	2	3	2	3 +
50P14	1	1	0	2	1 +
50Q14	3	2	2	3	1 -
61P7	1	1	0	3	3 +
70Q7	2	1	2	3	1 -
20Q14C	2	2	2	3	1 -
21P14C	1	1	0	2	2 +
21Q14C	2	2	2	2	1 -
22P14C	1	1	0	2	3 +
22Q14C	3	3	2	2	2 -
23P14C	1	1	0	2	1 +
23Q14C	2	2	2	3	3 -
47P7	2	2	1	3	1 -
57Q7	3	2	3	3	1 -
1P7	2	2	1	3	3 -
15Q7C	3	3	2	3	1 -
27P7	2	2	1	3	1 -
57P7	2	2	1	3	3 -
14P7C	2	2	1	3	1 -
5Q7	3	1	4	2	1 -
28P7	3	3	1	2	2 +
14Q7C	3	3	2	3	2 -
28Q7	2	2	1	3	1 -
70P7	2	2	1	3	1 -
40P7	2	2	2	2	3 +
40Q7	3	2	3	3	2 -
47Q7	3	3	3	2	4 -
8P7	2	2	1	3	1 -
26Q7	3	2	4	3	1 -
61Q7	2	1	1	2	3 -
26P7	1	1	1	2	2 -
8Q7	2	2	1	3	1 -
5P7	1	1	1	2	2 -
35Q7	3	2	3	3	1 -
35P7	1	1	1	3	3 -

	componente inflamatório celular		
0	ausencia de elementos celulares		
1	células inflamatórias em pequeno número (junto a vasos)		
2	células inflamatórias em número moderado, esparsas		
3	células inflamatórias em número moderado, agrupamentos		
4	numerosas células inflamatórias		

	elementos celulares da inf. Crônica: linfócitos		
0	ausencia de linfócitos ou plasmócitos		
1	pequeno número de linfócitos e/ou plasmócitos		
2	moderado número de linfócitos e/ou plasmócitos		
3	numerosos linfócitos/ plasmócitos		
4	numerosos linfócitos, nódulos linfóides, coroas linfocitárias		

	elementos celulares da inf. aguda: neutrófilos		
0	ausencia de neutrófilos, congestão capilar		
1	pequeno número de neutrófilos na derme		
2	moderado número de neutrófilos		
3	exsudato neutrofílico		
4	exsudato neutrofílico, abscessos		

reparação: macrófagos, granulomas	
0	não há indícios da reparação
1	macrófagos em pequeno número
2	macrófagos em moderada quantidade
3	macrófagos em núm.mod, sem arranjo específico
4	macrófagos arranjados em granulomas.

Proliferação fibroblástica	
0	fibroblastos jovens não são observados
1	fibroblastos são observados em áreas de colágeno frouxo
2	fibroblastos são facilmente observados, matriz colágena visível
3	fibroblastos facilmente observados, matriz colágena e proliferação capilar
4	fibroblastos são numerosos, matriz colágena presente, proliferação capilar

ANEXO 4

Análise das áreas feitas através do software ImageJ® software (National Institutes of Health, EUA) de todos os ratos dos dois grupos no dia da cirurgia, 1º dia, 3º dia e eutanásia.

GRUPOS	Nº DO RATO	ÁREA CX	ÁREA 1 DIA	ÁREA 3 DIA	ÁREA EUTANASIA
GC 7	18	384.354	291.295	248.765	170.135
GC7	44	390.050	487.126	287.690	384.423
GC7	39	447.074	412.123	306.257	357.284
GC7	38	394.309	429.873	259.673	290.603
GC7	41	383.169	448.402	245.320	309.332
GC7	24	397.937	337.133	206.530	199.925
GC7	45	407.727	431.329	213.048	235.412
GC7	42	331.481	331.820	279.531	243.668
GC7	14	477.429	455.257	266.256	235.165
GC7	15	322.965	249.442	153.308	170.797
GR7	47	487.685	430.757	388.228	317.102
GR7	57	433.498	429.820	331.874	285.544
GR7	61	404.821	547.225	367.169	309.830
GR7	70	402.963	362.593	278.615	302.720
GR7	1	470.396	352.437	442.181	307.608
GR7	5	387.932	440.246	476.960	310.339
GR7	8	445.451	450.866	258.799	301.565
GR7	27	330.784	262.618	272.434	214.387
GR7	26	328.848	313.340	303.296	190.806
GR7	28	397.254	400.957	343.601	358.184
GR7	35	381.821	304.990	241.638	171.035
GR7	40	448.096	450.264	272.708	301.012
GC14	20	395.047	410.396	269.143	73.665
GC14	22	400.986	438.712	264.472	144.418
CG14	21	367.512	412.984	206.550	135.394
CG14	16	386.435	420.756	267.213	91.385
CG14	19	411.606	411.941	263.830	93.256
CG14	13	337.188	458.432	260.079	144.028
CG14	23	361.536	454.209	383.423	107.213
CG14	46	402.958	428.568	285.548	69.871
CG14	43	357.830	433.001	299.164	64.623
CG14	17	238.193	460.712	337.449	150.093
CG14	37	487.466	451.053	361.272	111.447
CR14	36	371.475	357.311	207.401	110.425
CR14	4	425.112	404.792	205.058	145.919

CR14	50	424.869	454.536	307.507	258.531
CR14	11	429.083	453.742	297.971	252.903
CR14	29	347.619	459.123	224.778	248.604
CR14	10	368.849	463.684	191.025	175.698
CR14	31	366.122	385.769	222.215	237.706
CR14	32	438.844	446.620	303.406	125.732
CR14	2	475.721	464.059	364.723	155.986
CR14	33	432.614	449.231	302.856	193.806