

PRISCILLA BALBINOT

**EFEITO DA RADIOFREQUÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE
RATOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E
TENSIMÉTRICA**

CURITIBA

2015

PRISCILLA BALBINOT

EFEITO DA RADIOFREQUÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE RATOS:
ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E TENSIOMÉTRICA

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.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

CURITIBA

2015

Balbinot, Priscilla

Efeito da Radiofrequência na Cicatrização Cutânea de Ratos: Análise histológica, imunoistoquímica e tensiométrica / Priscilla Balbinot. Curitiba, 2015
135 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. 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
NÍVEIS MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 420ª dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente a aluna **PRISCILLA BALBINOT** com o título **EFEITO DA RADIOFREQUÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE RATOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E TENSIMÉTRICA** Área de Concentração Cicatrização e Medidas de Resistências do Tecidos tendo como orientador Professor Doutor Antonio Carlos L. Campos.

Às nove horas e trinta minutos do dia dezesseis de julho de dois mil e quinze, no auditório da CAD - sala 701 - 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos seguintes professores doutores Alfredo Benjamim Duarte da Silva, Anne Karoline Groth e Ruth Maria Graf sendo este último presidente da banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou a candidata a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pela candidata, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. A candidata foi considerada **APROVADA** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata por mim Regina Aparecida Sass Marques Secretária desta Pós-Graduação, que será assinada pelos seguintes membros.


Alfredo Benjamim Duarte da Silva


Anne Karoline Groth


Ruth Maria Graf

Aos meus pais, Paulo Fernando e Marinei, e ao meu irmão, Fernando,
pelo amor e incentivo que nos une.

Por muitas vezes abrirem mão de seus sonhos, para sonharem os meus.
Ao meu noivo Bruno, por me apresentar novos óculos para enxergar a vida,
e por compreender minhas ausências.

“O fogo terá sucesso quando outros métodos falharem”.

(Hipócrates, 460-370 AC)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela disponibilidade e contribuição em toda minha carreira.

À CAPES, que, pela concessão de suporte financeiro, permitiu a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, orientador deste trabalho, pelos ensinamentos, pelas horas dispensadas, pela dedicação. Por acreditar neste projeto, por orientar-me em todas as fases de sua realização, pela enorme contribuição para minha formação acadêmica e profissional, iniciada ainda no período de residência de Cirurgia Geral.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, pela oportunidade, seriedade e grande dedicação ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná.

À Profa. Dra. Ruth Maria Graf, por me incentivar na área de pesquisa, por mostrar a amplitude da Cirurgia Plástica, por orientações tanto profissionais como pessoais e pela constante inspiração.

Ao Prof. Dr. Renato da Silva Freitas e ao Prof. Dr. Gilvani Azor de Oliveira e Cruz, pela contribuição na minha formação médico-cirúrgica, pelas inúmeras oportunidades criadas, pela dedicação e pelo incentivo à carreira docente.

Ao Prof. Dr. Julio Uili Coelho, por todas as oportunidades e pelo auxílio na minha formação em Cirurgia na Universidade Federal do Paraná.

Aos médicos e residentes do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas / UFPR, pelas mais diversas contribuições e pelo apoio.

À secretária do Departamento de Pós-Graduação em Cirurgia da UFPR, Regina Aparecida Sass Marques, pelas orientações e ajuda quanto aos compromissos e normas de funcionamento do Programa.

Às amigas e alunas do programa de Pós-Graduação Ana Maria Cepeda e Gilian Fernanda Dias Erzinger, pelo auxílio, pela motivação e pela paciência em todos os momentos deste estudo. Por caminharmos juntas nesta jornada.

Ao biólogo e mestre César Rafael Costa e à Dra. Patrícia Stremel, pela valiosa contribuição para as análises histológicas e pela paciência em toda confecção e análise do material.

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

À amiga e colega de residência em Cirurgia Plástica Dra. Isis Juliane G. Nasser, por não se negar a me auxiliar quando precisei.

À minha prima Cinara Sabadin Dagneze, pelo auxílio nas correções e de texto, além do grande incentivo e pronta ajuda em inúmeras outras situações.

Ao meu noivo, Bruno de Melo Carvalho, por compreender as horas em frente ao computador, por me ajudar com as pedras no caminho e por ser meu companheiro nos momentos de dificuldades e de alegrias.

Em especial, à minha família, meu porto seguro, que soube entender a minha ausência e dedicação, desde meus pais, irmão, tios, primos e primas. Agradecimento especial aos meus pais, pelos ensinamentos e princípios transmitidos, por mostrarem que a vida apresenta dificuldades, mas que não devemos parar nunca, e por me ensinarem a sempre buscar o que me faz feliz.

RESUMO

Introdução: A radiofrequência é uma modalidade terapêutica que utiliza a emissão de correntes elétricas de alta frequência, formando um campo eletromagnético que gera calor quando em contato com os tecidos. É uma terapia não invasiva capaz de estimular mudanças na forma e disposição do colágeno e induzir a neocolagênese por meio da geração da diatermia, de forma controlada, em camadas profundas do tecido cutâneo e subcutâneo. A reparação de cicatrizes envolve principalmente a produção de fibras de colágeno tipo I e III, e a neoformação de vasos. Com a maior procura por cicatrizes estéticas e funcionais mais satisfatórias, tem-se buscado tratamentos que possam modular o processo cicatricial. A radiofrequência tem atraído atenção por ser cada vez mais utilizada clinicamente, apesar dos poucos estudos e protocolos estabelecidos. **Objetivo:** Avaliar o efeito da radiofrequência monopolar, no 7º e 14º dias de cicatrização de feridas incisionais em ratos, aplicada em três sessões. **Método:** Quarenta e oito ratos Wistar foram randomicamente divididos em quatro grupos: GC7 - ratos submetidos à eutanásia após o 7º dia de lesão e à radiofrequência com aparelho desligado; GR7 - ratos submetidos à eutanásia após o 7º dia de lesão e à radiofrequência; GC14 - ratos submetidos à eutanásia após o 14º dia de lesão e à radiofrequência com aparelho desligado; GR14 - ratos submetidos à eutanásia após o 14º dia de lesão e à radiofrequência. A radiofrequência foi realizada em dias alternados, após 24 horas da lesão incisa abdominal, no total de três vezes, com aparelho monopolar (equipamento Spectra® da Tonederm®) e amplitude de 1 kHz durante sete minutos, a 38°C. A cicatrização foi analisada em ferida incisa ventral e foram analisados os seguintes parâmetros: tensiometria, taxas de reepitelização, contagem de células do tecido de granulação, análise do colágeno e parâmetros de inflamação como VEGF, Ki-67, MMP 2 e 9. **Resultados:** Observou-se aumento da resposta inflamatória nos grupos tratados com radiofrequência, e esse efeito permaneceu na avaliação no 14º dia. No parâmetro de HE, não houve diferença estatística entre os grupos. A dosagem total de colágeno foi similar entre os grupos avaliados no 7º dia (GR7: $1094,3 \pm 24$ x GC7: 1032 ± 15 , $p > 0,05$) e maior no grupo submetido à radiofrequência quando a avaliação ocorreu no 14º dia (GR14: 1203 ± 21 x GC14: $993,2 \pm 19$, $p < 0,05$). A concentração de colágeno tipo III foi maior nas feridas dos dois grupos tratados, tanto nos tempos iniciais (7º dia) quanto no maior tempo de exposição nas feridas (14º dia) (GR7: $728,8 \pm 117$ x GC7: $323,9 \pm 64$; GR14: $987,3 \pm 185$ x GC14: $102,5 \pm 33$, $p < 0,0001$). A concentração de colágeno I mostrou-se menor no grupo submetido à radiofrequência nos dois tempos examinados (GR7:

414,7 ± 75 x GC7: 754,3 ± 99; GR14: 193,1 ± 62 x GC14: 889 ± 160, $p < 0,0001$). O processo de angiogênese avaliado por VEGF foi similar entre os grupos (GR7: 18,5 ± 7 x GC7: 12 ± 8, $p = 0,44$; GR14: 19,8 ± 5 x GC14: 15,7 ± 7, $p = 0,2443$). A proliferação celular (ki-67) foi maior no grupo tratado no 7.º e no 14.º dias (GR7 20,5 ± 4 x GC7 13,6 ± 6; GR14 33,4 ± 10 x GC14 20,2 ± 12, $p < 0,05$). A degradação celular e de MEC e a ativação do processo inflamatório também foram avaliadas pelas metaloproteinases, apresentando maior expressão no 14º dia para MMP-2 (GR14: 22 ± 4 x GC14: 9,8 ± 3, $p < 0,001$), e no 7º e no 14º dia para MMP-9 (GR7: 21,4 ± 6 x GC7: 9,9 ± 4; GR14: 50,3 ± 12 x GC14: 24,7 ± 9, $p < 0,05$). A avaliação no 7º dia para MMP-2 foi marginalmente significativa para as diferenças entre os dois grupos (GR7: 10,8 ± 3 x GC7: 7,78 ± 2, $p = 0,0649$). **Conclusões:** A aplicação de radiofrequência nessa dose resultou em maior tempo de processo inflamatório agudo, retardo no processo de maturação de colágeno, menor tensão das feridas, maior expressão de ki-67 e fatores de degradação de membrana celular.

ABSTRACT

Background: Radiofrequency is a noninvasive therapeutic modality, which uses the emission of high frequency electrical currents forming an electromagnetic field, which generates heat when in contact with tissue. Radiofrequency is able to induce synthesis and to stimulate changes in the shape and arrangement of the collagen and inducing neocollagenesis by means of generating diathermia, in a controlled manner, in deep layers of cutaneous and subcutaneous tissue. Wound healing is a dynamic process, which involves a complex network of extracellular interactions, chemical mediators and local inflammatory cells. Collagen type III and I, and angiogenesis are involved in scar formation and they are modified by this therapeutic modality. Radiofrequency has attracted attention for being increasingly used clinically, despite the few studies and protocols established. **Aim:** Evaluate monopolar radiofrequency effects, on the 7th and 14th day in healing process in rats, applied in three sessions. **Method:** Forty-eight male rats were randomly divided into four groups: GC7 - rats were submitted to radiofrequency with appliance disconnected and were killed after seven days from skin lesion and, GR7 -rats were submitted to radiofrequency and were killed after seven days from skin lesion, GC14 - rats were submitted to radiofrequency with appliance disconnected and were killed after fourteen days from skin lesion and, GR14 - rats were submitted to radiofrequency and were killed after fourteen days from skin lesion. Monopolar radiofrequency (Spectra Tonederm[®]) was applied every other day, 24 hours after abdominal incision injury (1,3 and 5 days), with 1 kHz of amplitude and 38°C for seven minutes. The healing was analyzed in a ventral cut wound and the following parameters were analyzed: incisional wounds tensiometer, reepithelialization rates, counting of cells of the granulation tissue, analysis of the collagen and inflammation parameters as VEGF, Ki-67, MMP 2 and 9. **Results:** Increased inflammatory response in radiofrequency-treated groups was noted, and this effect lasted until 14th day. In the HE parameter, there was no statistical difference between the groups. The total dosage of collagen was similar to both groups on the 7th day (GR7: 1094,3 ± 24 x GC7: 1032 ± 15, $p > 0,05$) and greater in the group submitted to radiofrequency when the evaluation occurred on the 14th day (GR14: 1203 ± 21 x GC14: 993,2 ± 19, $p < 0,05$). Collagen type III has increased in both treated groups (GR7 and GR14) (GR7: 728,8 ± 117 x GC7: 323,9 ± 64; GR14: 987,3 ± 185 x GC14: 102,5 ± 33, $p < 0,0001$). The concentration of collagen I was less in the group submitted to radiofrequency in the two times examined (GR7: 414,7 ± 75 x GC7: 754,3 ± 99; GR14: 193,1 ± 62 x GC14: 889 ±

160, $p < 0,0001$). The process of angiogenesis evaluated by VEGF was similar between the groups (GR7: $18,5 \pm 7$ x GC7: 12 ± 8 , $p = 0,44$; GR14: $19,8 \pm 5$ x GC14: $15,7 \pm 7$, $p = 0,2443$). Cell proliferation (Ki-67) was greater in treated groups on the 7th and 14th days (GR7 $20,5 \pm 4$ x GC7 $13,6 \pm 6$; GR14 $33,4 \pm 10$ x GC14 $20,2 \pm 12$, $p < 0,05$). Cellular and ECM degradation and activation of the inflammatory process were also evaluated by metalloproteinases, being greater on the 14th day for MMP-2 (GR14: 22 ± 4 x GC14: $9,8 \pm 3$, $p < 0,001$), and on the 7th and 14th days for MMP-9 (GR7: $21,4 \pm 6$ x GC7: $9,9 \pm 4$; GR14: $50,3 \pm 12$ x GC14: $24,7 \pm 9$, $p < 0,05$). The evaluation on the 7th day for MMP-2 was marginally significant for the differences between the two groups (GR7: $10,8 \pm 3$ x GC7: $7,78 \pm 2$, $p = 0,0649$). **Conclusions:** Application of radiofrequency in this dose resulted in prolonged acute inflammatory process, less tension of the wounds, delay in collagen maturation process, increased expression of membrane cell degradation factors and ki-67 expression.

Keyword: radiofrequency; wound healing; scar.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FASES DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	28
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DE FERIDA CUTÂNEA TRÊS DIAS APÓS LESÃO	30
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DE FERIDA CUTÂNEA CINCO DIAS APÓS LESÃO	31
FIGURA 4 - RATOS WISTAR ALBINO UTILIZADOS NO EXPERIMENTO ...	52
FIGURA 5 – PESAGEM DO ANIMAL ANTES DA DISTRIBUIÇÃO ALEATÓRIA EM GRUPOS	54
FIGURA 6 - MARCAÇÃO DA FERIDA INCISIONAL COM CANETA PRETA NA PORÇÃO VENTRAL	56
FIGURA 7 – FERIDA INCISIONAL	57
FIGURA 8 – EQUIPAMENTO MONOPOLAR DE RADIOFREQUÊNCIA SPECTRA® DA TONEDERM®	59
FIGURA 9 – AFERIÇÃO DA TEMPERATURA COM O TERMÔMETRO INFRAVERMELHO	60
FIGURA 10 – ANIMAL DO GRUPO CONTROLE SENDO SUBMETIDO À COLOCAÇÃO DO APARELHO DE RADIOFREQUÊNCIA DESLIGADO	60
FIGURA 11 – APARELHO DE TENSIOMETRIA	62
FIGURA 12 – TESTE TENSIO MÉTRICO DA FERIDA CUTÂNEA INCISIONAL. TRAÇÃO PROGRESSIVA ATÉ RUPTURA COMPLETA DA LINHA CICATRICIAL	63
FIGURA 13 – EXEMPLO DE GRÁFICO OBTIDO POR PROGRAMA DE COMPUTADOR ACOMPLADO AO SISTEMA	64
FIGURA 14 – BLOCOS DE PARAFINA COM PEÇAS HISTOLÓGICAS	65

FIGURA 15 – COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA (MAGNIFICAÇÃO 100X)	66
FIGURA 16 – COLORAÇÃO PICROSSIRIUS (MAGNIFICAÇÃO 100X)	69
FIGURA 17 – AVALIAÇÃO DA COLORAÇÃO PICROSSIRIUS PELO IMAGEJ	71
FIGURA 18 – AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PELO VEGF	73
FIGURA 19 – AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PELO Ki-67.....	74
FIGURA 20 – AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE METALOPROTEINASES	75
FIGURA 21 – EXEMPLO DE COLORAÇÃO POR HE E A DIFERENÇA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO ENTRE OS GRUPOS APÓS 7 DIAS	81
FIGURA 22 – EXEMPLO DE COLORAÇÃO POR HE E A DIFERENÇA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO ENTRE OS GRUPOS APÓS 14 DIAS	82
FIGURA 23 – EXEMPLO DE COLORAÇÃO POR PICROSSIRIUS E A DIFERENÇA DE FIBRAS DE COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS APÓS 7 DIAS	86
FIGURA 24 – EXEMPLO DE COLORAÇÃO POR PICROSSIRIUS PICROSSIRIUS E A DIFERENÇA DE FIBRAS DE COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS APÓS 14 DIAS	87
FIGURA 25 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUIMICA COM MARCAÇÃO DE VEGF APÓS 7 DIAS	89
FIGURA 26 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUIMICA COM MARCAÇÃO DE VEGF APÓS 14 DIAS	90
FIGURA 27 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUIMICA COM MARCAÇÃO DE KI-6 APÓS 7 DIAS	92
FIGURA 28 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUIMICA COM MARCAÇÃO DE KI-67 APÓS 14 DIAS	93

FIGURA 29 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUIMICA COM MARCAÇÃO DE MMP-2 APÓS 7 DIAS	96
FIGURA 30 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUIMICA COM MARCAÇÃO DE MMP-2 APÓS 14 DIAS	97
FIGURA 31 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUIMICA COM MARCAÇÃO DE MMP-9 APÓS 7 DIAS	99
FIGURA 32 - EXEMPLO DE IMUNOISTOQUIMICA COM MARCAÇÃO DE MMP-9 APÓS 14 DIAS	100

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE TENSIOMETRIA ENTRE OS GRUPOS	77
GRÁFICO 2 – RESULTADO DA PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA ENTRE OS GRUPOS	78
GRÁFICO 3 – RESULTADO DA PROLIFERAÇÃO VASCULAR ENTRE OS GRUPOS	79
GRÁFICO 4 – RESULTADO DA TAXA DE REPARO ENTRE OS GRUPOS ..	80
GRÁFICO 5 – RESULTADO DO COLÁGENO TOTAL	84
GRÁFICO 6 - RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE COLÁGENO TIPO III ENTRE OS GRUPOS	85
GRÁFICO 7 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I ENTRE OS GRUPOS	86
GRÁFICO 8 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE VEGF ENTRE OS GRUPOS	88
GRÁFICO 9 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MARCAÇÃO DE KI67	91
GRÁFICO 10 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MARCAÇÃO DE MMP-2 ENTRE OS GRUPOS	95
GRÁFICO 11 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MARCAÇÃO DE MMP-9 ENTRE OS GRUPOS	98

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DESENHO DA PESQUISA	55
QUADRO 2 – PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS ANALISADOS PELO MÉTODO HE	68
QUADRO 3 – RESUMO DOS RESULTADOS	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – TIPOS DE COLÁGENO	35
TABELA 2 – DIVISÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BR	Brasil
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	3,3'- diaminobenzidina tetrahydroclorida
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (fator de crescimento da epiderme)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (fator de crescimento de fibroblasto)
IL-1b	Interleucina 1 beta
HE	hematoxilina-eosina
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> (proteína de choque térmico)
kD	quilodalton
KGf	<i>Keratinocyte Growth Factor</i> (fator de crescimento de queratinócitos)
LED	<i>Light-emitting diode</i>
MEC	membrana extracelular
MMP	metaloproteinase
n.	número
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> (antígeno nuclear associado ao ciclo celular)
pH	potencial Hidrogeniônico
PLGF	<i>Placental Growth Factor</i> (fator de crescimento placentário)
PR	Paraná
PSB	<i>Phosphate Buffered Solution</i> (solução tampão de fosfato)
PUC-PR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
PVPI	Povidine-iodine
RF	Radiofrequência
SIBI	Sistema de Bibliotecas

TGF- β	<i>Transforming Growth Factor</i> beta (fator transformador de crescimento beta)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> alfa (fator de necrose tumoral alfa)
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (fator de crescimento vascular endotelial)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
@	arroba
©	copyright
®	marca registrada
%	porcentagem
°C	grau Celsius
CO ₂	gás carbônico
H ₂ O ₂	água oxigenada
kfg	quilograma-força
Kg	quilograma
μm	micrômetro
cm ²	centímetro quadrado (área)
mM	milimol
M	mol
Mg	miligrama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	25
1.1.1 Objetivo geral	25
1.1.2 Objetivos específicos	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 A PELE	26
2.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	27
2.1.1 Fase inflamatória ou exsudativa	28
2.1.2 Fase proliferativa	30
2.1.2.1 Angiogênese	32
2.1.2.2 Fibroplasia	32
2.1.2.3 Reepitelização	33
2.1.3 Fase de maturação ou remodelação	33
2.3 COLÁGENO	34
2.4 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL	36
2.5 PROTEÍNA NUCLEAR KI-67	37
2.6 METALOPROTEINASES	38
2.7 RADIOFREQUÊNCIA	39
2.7.1 História da radiofrequência	39
2.7.2 Definição de radiofrequência	40
2.7.3 Utilização da radiofrequência	42
2.7.4 A radiofrequência em estudos experimentais	47

2.7.5 A radiofrequência em estudos clínicos	48
3 MATERIAIS E MÉTODO	50
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	50
3.2 MATERIAL	50
3.2.1 Ambiente	50
3.2.2 Animais	51
3.2.3 Outros materiais	52
3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	53
3.3.1 Grupos de pesquisa	53
3.3.2 Desenho da pesquisa	55
3.4 ETAPAS EXPERIMENTAIS	55
3.4.1 Anestesia	55
3.4.2 Marcação da pele	56
3.4.3 Procedimento cirúrgico	57
3.4.4 Pós-operatório	58
3.5 APLICAÇÃO DA RADIOFREQUÊNCIA	58
3.6 EUTANÁSIA	61
3.7 CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS	61
3.8 ANÁLISE MECÂNICA – TESTE TENSIONOMÉTRICO	62
3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA	64
3.9.1 Coloração por Hematoxilina – Eosina (HE)	65
3.9.2 Coloração por <i>Picrosirius</i>	69
3.9.3 Imunoistoquímica para VEGF	72

3.9.4 Imunoistoquímica para Ki-67	73
3.9.5 Imunoistoquímica para MMP-2 e MMP-9	74
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	76
4 RESULTADOS	77
4.1 AVALIAÇÃO TENSIMÉTRICA	77
4.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	78
4.2.1 Avaliação de inflamação por HE	78
4.2.2 Avaliação de colágeno	83
4.2.2.1 Quantificação de colágeno total	83
4.2.2.2 Quantificação dos colágenos tipo I e tipo III	84
4.2.3 Avaliação de angiogênese por VEGF	87
4.2.4 Avaliação por quantificação de ki-67	91
4.2.5 Avaliação de metaloproteinases	94
4.2.5.1 Avaliação de metaloproteinase – 2	94
4.2.5.2 Avaliação de metaloproteinase – 9	98
4.3 MORBIDADE E MORTALIDADE	101
4.4 RESUMO DOS RESULTADOS	101
5 DISCUSSÃO	103
5.1 DO MÉTODO	103
5.2 DOS RESULTADOS	105
5.3 PERSPECTIVAS	110
6 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	112
ANEXOS	119

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização é um dos processos fisiológicos mais importantes e estudados. Os recentes avanços em biologia celular e molecular, com o conhecimento de mediadores químicos considerados maestros nesse processo, têm expandido a compreensão das etapas envolvidas na cicatrização e na regeneração de tecidos (SEEGER, 2015, JANIS; HARRISON, 2014). Os principais objetivos do tratamento de feridas são o seu fechamento rápido e a obtenção de uma cicatriz funcional e estética satisfatória (SINGER, 1999; CLARK, 1996). Nesse contexto, devido ao aumento do número de cirurgias plásticas no Brasil e a busca por melhores resultados estético-funcionais, busca-se investigar e aprimorar as técnicas e soluções para uma reparação cutânea mais próxima da perfeição. Além disso, cicatrizes patológicas decorrentes de sequelas de queimaduras ou traumas também são objeto de estudo e constituem queixa cada vez mais frequente.

A cicatrização de feridas foi dividida academicamente (CARREL, 1902, CARREL, 1912) em três fases – inflamatória, proliferativa e de remodelação – que se sobrepõem durante todo o processo (BROUGHTON *et al.*, 2006). Fatores locais ou sistêmicos, tais como localização da lesão, presença de corpos estranhos e debris, alterações de perfusão tecidual, sistema imunológico, fibroblastos deficientes e, em pacientes cirúrgicos, inadequada técnica cirúrgica, podem influenciar negativamente qualquer uma das fases da cicatrização (CAMPOS *et al.*, 2003, HENDRIKS, 1990).

O número e a disposição das fibras de colágeno proporcionam a força tênsil na fase de cicatrização do reparo tecidual, a qual influencia na formação da cicatriz. O seu metabolismo consiste em um equilíbrio entre biossíntese e degradação; as fibras de colágeno são reabsorvidas e sintetizadas durante o crescimento, a remodelação, a involução, a inflamação e o reparo de tecidos (WITTE; BARBUL, 1997).

O colágeno é a proteína estrutural mais importante e abundante nos humanos e 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 o tecido está em processo inicial de cicatrização, caracteriza-se por grande quantidade de fibroblastos jovens e fibras colágenas menos densas, devido à grande quantidade de água que possuem. Com o passar do tempo, o tecido conjuntivo vai amadurecendo progressivamente, com maior deposição de colágeno maduro (CLARK, 1996).

Com o recente desenvolvimento tecnológico na estética e com evolução dos resultados pós-operatórios, a radiofrequência passou a ser utilizada no rejuvenescimento e no combate à flacidez da pele e nas cicatrizes.

A radiofrequência é uma modalidade terapêutica que utiliza a emissão de correntes elétricas de alta frequência, formando um campo eletromagnético que gera calor quando em contato com os tecidos (DUARTE, 2009), e que pode ser utilizada no tratamento de fibroedema gelóide, gordura localizada e estimulação de produção de colágeno (ALSTER, 2007). Por ser uma onda senoidal de elevada frequência, perde seus efeitos químicos e biológicos de excitação neuromuscular, mas conserva o efeito de conversão em calor ao ser absorvida pelos tecidos, considerada, desse modo, como diatermia, e é aplicada há anos como termoterapia profunda (BUMB *et al.*, 2013).

A aplicação da radiofrequência é uma modalidade não invasiva capaz de estimular mudanças na forma e na disposição do colágeno e de induzir a neocolagênese através da geração da diatermia, de forma controlada, em camadas profundas do tecido cutâneo e subcutâneo (ALSTER, 2007). O estímulo na produção e na modelagem do colágeno com a utilização de RF resulta na ocorrência de alterações na cicatrização com melhor aspecto cicatricial (WILLEY *et al.*, 2010).

Na literatura mundial, existem poucos trabalhos experimentais sobre o uso de radiofrequência na cicatrização de lesões de pele e, nos estudos realizados, há controvérsias no que concerne às alterações na aplicação de radiofrequência e às alterações na cicatrização de feridas. Além disso, não

existem definições sobre qual frequência e quantidade essa terapia causa alterações significativas em todo o processo inflamatório (DE CARVALHO *et al.*, 2011).

No mesmo sentido, existem poucos trabalhos, tanto clínicos como experimentais, dedicados ao estudo de feridas incisionais (LI *et al.* 2011), comuns em pós-operatórios de cirurgias eletivas e que são, nesta pesquisa, cuidadosamente investigadas. O uso dessa terapia aumenta a formação de colágeno, mas a literatura especializada ainda é divergente a respeito de suas aplicações clínicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da radiofrequência monopolar aplicada em três sessões ao 7º e 14º dias de cicatrização de feridas incisionais em ratos.

1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos englobam:

1. analisar a evolução das feridas durante o processo cicatricial (avaliação das complicações locais);
2. estudar o efeito da radiofrequência na resistência tênsil da ferida submetida à radiofrequência.
3. avaliar o efeito da radiofrequência no padrão histológico das cicatrizes (avaliação histológica e imunoistoquímica);

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano e é composta pela epiderme, a derme, e a hipoderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A epiderme é a camada mais superficial da pele. Origina-se do ectoderma e é composta por vários tipos de células. As células da epiderme se distribuem em cinco camadas epiteliais [camada córnea (camada de descamação), camada lúcida (de células achatadas e núcleo pouco aparente), camada granulosa (células muito achatadas e citoplasma granuloso, onde inicia o processo de queratinização), camada espinhosa ou de Malpighi (composta por células poliédricas perfeitamente justapostas), e camada germinativa (camada basal, compostas por células jovens que se multiplicam constantemente, além das células-tronco)] (SCHNEIDER, 2012). Além disso, a epiderme é composta por células do sistema melânico e as células de Langerhans, que atuam como macrófagos e estão envolvidas em várias doenças, como micoses e dermatites de contato (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A derme, considerada a segunda camada da pele, é a camada na qual se encontram vasos sanguíneos, glândulas sebáceas e nervos. A derme é constituída primordialmente por substância fundamental (intersticial), fibras elásticas, vasos, nervos, além de folículos pilossebáceos e das glândulas sudoríparas. Essas estruturas se distribuem em duas regiões: derme superficial ou papilar e derme profunda ou reticular. Os fibroblastos e os fibrócitos estão presentes na derme e são responsáveis pela produção de fibras colágenas, elásticas e reticulares, além de substância fundamental e matriz extracelular do tecido conjuntivo (SCHNEIDER *et al.*, 2009).

Sob a derme, há o tecido subcutâneo, formado por tecidos fibrosos, elásticos e gordurosos. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apoia. A pele tem como principais funções o

revestimento de toda superfície corporal, a proteção contra diversos tipos de agentes, a regulação da temperatura corporal e a sensibilidade (SILVA *et al.*, 2010).

2.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

A reparação cutânea em mamíferos, após o nascimento, resulta em uma cicatriz. As feridas com cicatrização retardada ou com processos cicatriciais desregulados que resultem em cicatrizes patológicas são consideradas um problema para cirurgiões e cientistas (TOLAZZI *et al.*, 2009).

Os organismos vivos têm capacidade autorregenerativa. 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 (SHABBIR *et al.*, 2015).

O principal objetivo no tratamento das feridas cutâneas é promover rápida restauração da lesão, com cicatrizes satisfatórias do ponto de vista funcional e estético.

Apesar dos eventos ocorrerem de forma dinâmica e sobrepor-se no tempo, sob o ponto de vista morfológico, é possível classificá-los sequencialmente em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelamento (WITTE; BARBUL, 1997) (FIGURA 1).

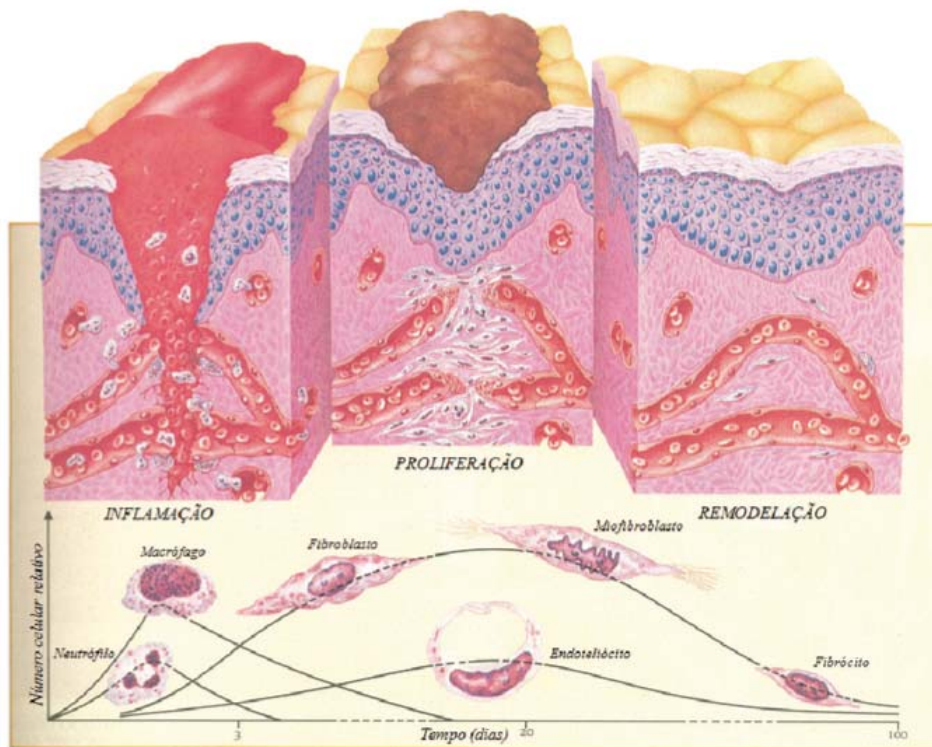


FIGURA 1 – FASES DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO. NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE MACRÓFAGOS NA FASE INFLAMATÓRIA E O AUMENTO DE FIBROBLASTOS COM O PICO NA FASE PROLIFETIVA.

FONTE: www.plasticaplexus.com.br/new/cicatrizacao.php#sthash.ZNst5wVq.dpbs

2.1.1 Fase inflamatória ou exsudativa

A fase inflamatória é considerada um processo preparatório para a formação de um novo tecido, com a presença de hemostase e inflamação. Ocorre desde o momento da lesão até o terceiro ou quarto dia de evolução. É caracterizada pela participação ativa de inúmeras células e fatores do sistema imunológico. O colágeno exposto após a lesão tecidual ativa a cascata de coagulação (ambas as vias intrínsecas e extrínsecas), iniciando a fase inflamatória. Logo após o ferimento, os tecidos lesados liberam mediadores químicos inflamatórios, potentes vasoconstritores (tromboxano A2 e prostaglandinas), os quais ditam o desencadeamento de outras fases. Surge um processo inflamatório agudo e o exsudato fibrinoso na superfície forma

uma crosta, a qual auxilia a conter a hemorragia e a proteger o ferimento de contaminações externas. O coágulo é formado de plaquetas, trombina e fibronectina e serve como suporte para células, tais como neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais. Também serve para concentrar as citocinas e os fatores de crescimento (WITTE; BARBUL, 1997).

A resposta celular da fase inflamatória é caracterizada por um influxo de leucócitos para a área de lesão. No início do processo inflamatório, neutrófilos e monócitos são as células predominantes no local da lesão. Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o local da ferida e atuam na fagocitose de microrganismos presentes na ferida e liberação de enzimas.

A presença de neutrófilos é seguida pela migração dos monócitos, rapidamente ativados em macrófagos. Essas células são responsáveis por auxiliar no desbridamento e por secretar citocinas e fatores de crescimento. 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.

Os fatores de crescimento também são potentes e fundamentais no processo de reparo tecidual. O PDGF é um importante fator de crescimento, agindo principalmente no início da fase inflamatória como fator quimiotático para macrófagos e neutrófilos e como fator mitogênico para fibroblastos e células musculares lisas. Muitos fatores de crescimento secretados por macrófagos influenciam a proliferação celular, a angiogênese e a síntese da matriz extracelular, sendo predominantemente o VEGF (WERNER; GROSE, 2003). O TGF- α exerce forte influência na migração de queratinócitos e reepitelização. O TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 promovem forte estímulo na produção de miofibroblastos, assim como na deposição da matriz extracelular pelos fibroblastos durante a formação do tecido de granulação (TOMASEK *et al.*, 2002) (FIGURA 2).

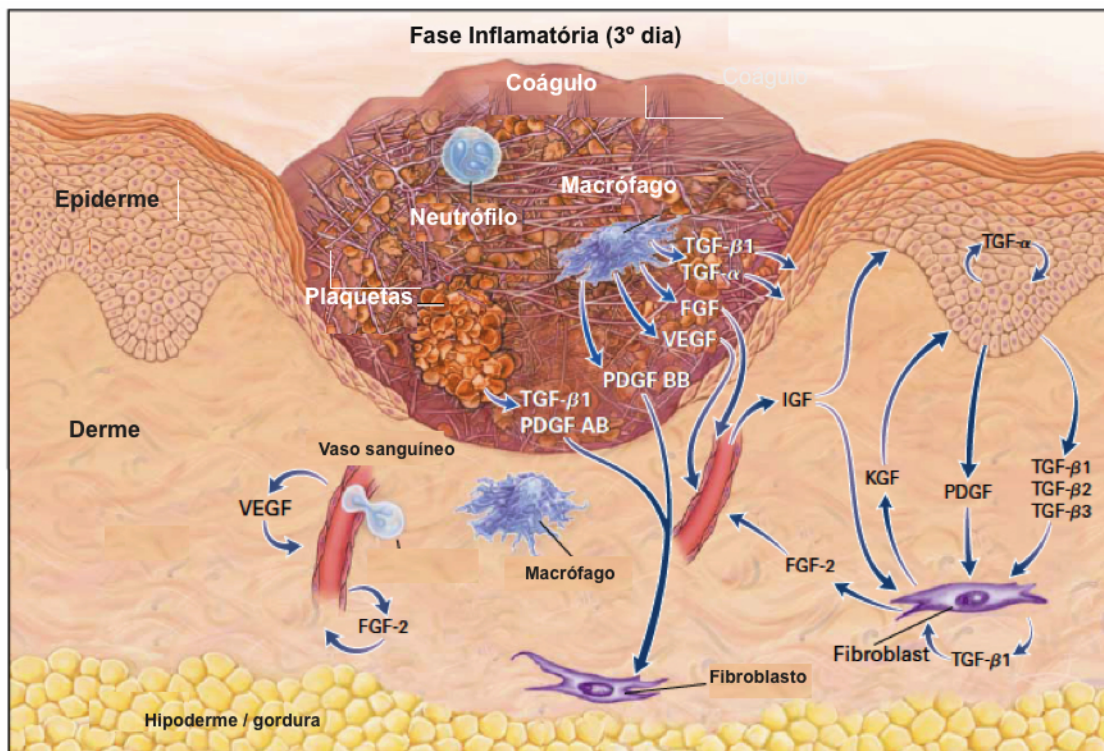


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DE FERIDA CUTÂNEA TRÊS DIAS APÓS LESÃO. FATORES DE CRESCIMENTO E CITOCINAS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO: VEGF, PDGF, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3

FONTE: SINGER, 1999

2.1.2 Fase proliferativa

A fase proliferativa caracteriza-se por intensa migração e proliferação de fibroblastos e por produção de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, as quais contribuem para a formação do tecido de granulação e “fechamento” da lesão ao redor do quarto dia até o 14º dia. É caracterizado por três processos: angiogênese, proliferação fibroblástica e reepitelização (LI *et al.*, 2007).

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. Alguns fibroblastos adquirem características fenotípicas de miofibroblastos e participam do processo de contração cicatricial (WELCH *et al.*, 1990, TOMASEK *et al.*, 2002) (FIGURA 3).

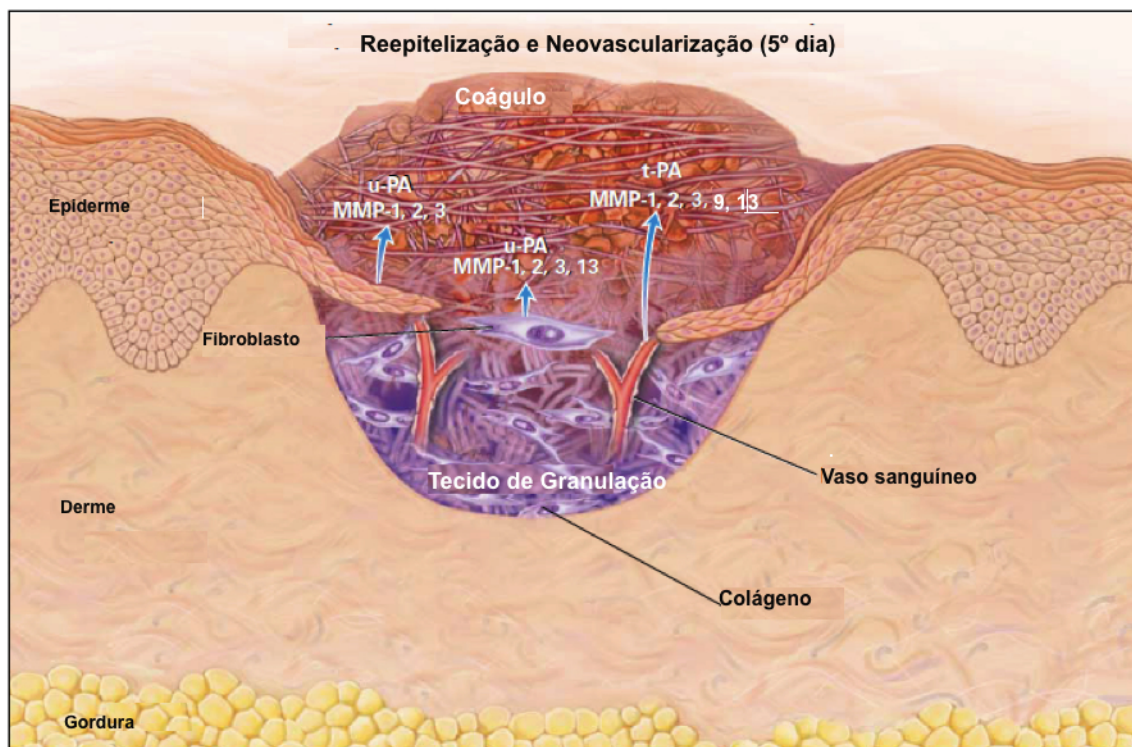


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DE FERIDA CUTÂNEA CINCO DIAS APÓS LESÃO. NOVOS VASOS SANGUÍNEOS SÃO VISTOS INVADINDO O COÁGULO E O TECIDO DE GRANULAÇÃO. CITOCINAS E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MOVIMENTAÇÃO CELULAR SÃO MOSTRADAS ACIMA. U-PA: uroquiase ativadora de plasminogênio, MMP – 1,2,3 e 13 (METALOPROTEINASES 1,2,3,13 – RESPECTIVAMENTE COLAGENASE 1, GELATINASE A, *stromelysin* 1, COLAGENASE 3), t-PA (*tissue plasminogen*).

FONTE: SINGER, 1999

2.1.2.1 Angiogênese

Na fase da angiogênese, acontece a formação de novos vasos sanguíneos, com o objetivo de prover nutrientes e oxigênio ao tecido cicatricial, além da migração de células inflamatórias para a ferida. As células endoteliais da microcirculação iniciam o processo angiogênico (ativação dessas células, degradação da sua membrana basal, proliferação celular, formação da estrutura capilar tubular e reconstituição da membrana basal) emitem pseudópodos citoplasmáticos após o segundo dia da lesão e, estimuladas pela secreção de metaloproteinases na matriz extracelular, invadem o espaço perivascular (LI *et al.*, 2007, SINGER; CLARK, 1999).

Algumas proteínas que sinalizam a proliferação de fibroblastos, como o FGF1 e 2, são também sinalizadoras de formação de novos vasos. O primeiro deles é o VEGF. Atualmente, a família do VEGF inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFE e o PDGF. O VEGF-A está sendo identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento. Os macrófagos e os queratinócitos da região em reparo aumentam de forma pronunciada a expressão gênica de VEGF-A e seus receptores estão aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação.

A associação desses fatos, por si só, constitui-se como forte indicativo de sua participação na angiogênese. Essa hipótese foi recentemente reforçada pela demonstração de que a sua neutralização por anticorpos reduz a angiogênese, a formação de tecido de granulação e o acúmulo de fluidos em regiões que sofreram lesão (BALBINO *et al.*, 2005).

2.1.2.2 Fibroplasia

A fibroplasia é caracterizada por um processo de proliferação de fibroblastos, migração de fibrina da ferida, e produção de novas proteínas de colágeno e outras proteínas de matriz, que contribuem para a formação de

tecido de granulação. Como uma resposta precoce na lesão, os fibroblastos nas bordas da ferida começam a proliferar aproximadamente ao 4º dia e a migrar para a matriz provisória do coágulo da ferida, onde eles estabelecem uma matriz rica em colágeno (ONO *et al.*, 2015).

2.1.2.3 Reepitelização

Reepitelização é o processo de restauração da epiderme intacta após sofrer lesão cutânea. Geralmente, envolve vários processos, incluindo a migração de queratinócitos epidérmicos adjacentes dentro da ferida, a proliferação de queratinócitos, a diferenciação em epiderme estratificada, e o restabelecimento da membrana basal, que conecta a epiderme e a derme subjacente e possibilita a migração celular (LI *et al.*, 2007, MIRASTSCHIKSKI *et al.*, 2002).

Esse processo começa com a alteração da integridade da epiderme. A divisão celular é estimulada por fatores de crescimento como o EGF (fator de crescimento da epiderme), o FGF (fator de crescimento de fibroblasto), KGF (fator de crescimento do queratinócito) e o TGF - β (fator transformador beta) (JANIS, 2014).

2.1.3 Fase de maturação ou remodelação

Na fase de maturação, que é a última e mais longa fase do processo de cicatrização, ocorre aumento da força de tensão da ferida, além de diminuição do tamanho da cicatriz e do edema. A fase final da cicatrização de feridas pode perdurar por até dois anos, e os resultados na formação do epitélio normal e a maturação da cicatriz dependem de variáveis como idade, estado nutricional do indivíduo, técnica cirúrgica, local da ferida, tipo de lesão e duração do processo inflamatório e proliferativo (YOUNG; MCNAUGHT,

2011). Clinicamente, é a fase mais importante, pois a quantidade e a qualidade do colágeno determinarão a força mecânica do tecido remodelado (YOUNG; MCNAUGHT, 2011). Maturação e remodelamento esperados resultam em cicatrizes adequadas, enquanto atrasos ou alterações nessa fase podem resultar em cicatrizes hipertróficas, queloides e até mesmo feridas crônicas. A maturação da ferida requer reorganização e maturação de novo colágeno em colágeno organizado e estruturado (JANIS, 2014).

2.3 COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante do organismo e constitui 30% de todas as proteínas do corpo humano (UITTO, 1991). 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. As cadeias que constituem a tripla hélice de colágeno variam na sequência de aminoácidos e no modo pelo qual eles se combinam, dando origem a mais de 16 tipos de colágeno (KAVITHA; THAMPAN, 2008). Os colágenos são classificados com algarismos romanos, com base na cronologia da sua descoberta, e os tipos I e IV são os mais abundantes. O tipo I é o principal constituinte da pele; é sintetizado por fibroblastos, células do músculo liso e osteoblastos. As células do músculo liso também produzem colágeno do tipo III, o tipo II é produzido pelos condrócitos. Nas feridas, os tipos e as quantidades de colágeno são modificados dependendo do estágio do processo de reparo, com maior quantidade de fibras tipo III no início do processo inflamatório com diminuição progressiva e aumento da quantidade de fibras tipo I durante o processo inflamatório (SINNO *et al.*, 2012).

TABELA 1 – TIPOS DE COLÁGENO.

Colágeno	Tipos
Fibrilar	I, II, III, XI e XXIV
Não-fibrilar grande	IV, VI, VII e XII
Cadeia curta	VIII, X e XIII

FONTES: ROCHA; TRUBIAN, 2004

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 de tipos de fibras de colágeno nos diferentes tecidos e durante as fases da formação do tecido de granulação.

Inicialmente, o colágeno tipo III deposita-se no tecido de cicatrização, apresentando-se como uma proteína imatura. Após, com a remodelação da fibra, surge o colágeno 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 esparsos, o que resulta em um tecido resistente e com fibras colágenas com grau complexo e melhor organizado de orientação (SINNO *et al.*, 2012). O colágeno que é depositado inicialmente é mais fino do que o colágeno da pele sem ferimentos, e é orientado paralelamente à pele. Com o tempo, as fibras de colágeno iniciais são remodeladas e depositadas em sua forma mais espessa e organizada ao longo das linhas de tensão da pele. Essas alterações também são acompanhadas por aumento da resistência à tração, o que indica uma

correlação positiva entre a espessura das fibras de colágeno / orientação e resistência à tração.

O colágeno encontrado no tecido de granulação é bioquimicamente diferente do colágeno da pele ileisa. 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 (BROUGHTON *et al.*, 2006).

O processo cicatricial é marcado por aumento de demanda metabólica e alterações na demanda de oxigênio. Os fibroblastos aparecem em torno de 24 horas após a lesão e necessitam de adequada concentração de oxigênio para a produção de colágeno. Sem a concentração adequada de oxigênio, há prejuízo importante na hidroxilação de prolina e lisina e deficiência na maturação do colágeno (JANIS, 2014).

2.4 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL

Várias moléculas estimuladoras da angiogênese já foram caracterizadas, entre elas, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fatores de crescimento ligados à heparina, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fatores de necrose tumoral (TNF α e TNF β) e fator de transformação de crescimento (TGF α). Dentre todos estes, destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente mitógeno envolvido na angiogênese. Sua atuação parece estar relacionada com a regulação endógena deste processo.

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) desempenha importante papel regulador no desenvolvimento vascular fisiológico, sendo que tanto a diminuição nos seus níveis ou sua ausência quanto o aumento provocam danos na formação vascular sistêmica. Atua através da ligação a receptores específicos do tipo tirosina-quinase, promovendo uma cascata de

eventos intracelulares (proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial) (CAPP *et al.*, 2009).

É um fator angiogênico amplamente estudado, e em tecidos onde a angiogênese é aumentada sua expressão é consideravelmente alta. A expressão desse fator é regulada por processos transcricionais e pós-transcricionais incluindo o *splicing* alternativo, hipóxia, hormônios, outros fatores angiogênicos e microRNAs (FÁTIMA; PAPA, 2010). É também um importante marcador de angiogênese no processo cicatricial.

2.5 PROTEÍNA NUCLEAR KI-67

O Ki-67 é uma proteína não histônica presente em todas as fases do ciclo de divisão celular (G_1 , S, G_2 , M), exceto na fase G_0 , sendo sua denominação decorrente de sua identificação em Kiel (Alemanha) na 67ª placa de cultura tecidual, alcançando sua maior expressão nas fases G_2 e M (SASAKI *et al.*, 1987). Funciona como um antígeno monoclonal, de vida média de uma hora, com gene (*MKI67*) correspondente presente no cromossomo 10 e síntese protéica determinante deste antígeno no ciclo celular. Vários trabalhos referenciam o Ki-67 como protetor clínico do comportamento biológico das neoplasias malignas (GERDES *et al.*, 1991), pois diagnostica a síntese do DNA da neoplasia com o aumento da marcação de células malignas com este antígeno (SASAKI *et al.*, 1987).

A positividade do Ki-67 não é exclusiva das neoplasias malignas mas sim predominante em relação às proliferações benignas. Desta forma, tem sido relacionada à pesquisa de proliferação celular em processos inflamatórios.

2.6 METALOPROTEINASES

As metaloproteinases (MMPs) de matriz são enzimas dependentes de zinco, que degradam diferentes proteínas de matriz extracelular. Há cerca de 26 tipos de MMPs, que são classificadas em cinco grupos diferentes, de acordo com a estrutura e o seu substrato específico, tais como colagenases, gelatinases, matrilisinas, estromelisinases e metaloproteinases de membrana (PARKS, 1999). A expressão constitutiva dessas moléculas é baixa em condições normais, mas sua expressão pode ser elevada quando ocorre o remodelamento da matriz em condições fisiológicas ou patológicas. As MMPs desenvolvem um papel crucial em processos fisiológicos e patológicos do remodelamento da membrana extracelular (MEC) durante a angiogênese, a cicatrização, a embriogênese e as metástases (DYE *et al.*, 2013). O grau de expressão de algumas MMP tem sido correlacionado com a fase da doença e ou com o prognóstico. MMP-9 degrada o colágeno tipo I e IV em certas condições.

As MMP são pouco expressas em tecidos normais e substancialmente aumentadas na maioria das neoplasias malignas e processos inflamatórios e cicatriciais. Dentre todas as MMP conhecidas, as MMP-2 e -9 (gelatinases) têm sido consistentemente associadas com a agressividade do processo inflamatório, o potencial metastático de algumas neoplasias malignas e aumento de atividade de degradação e *feedback* positivo no processo cicatricial (PARKS, 1999).

2.7 RADIOFREQUÊNCIA

2.7.1 História da radiofrequência

A radiofrequência (RF) foi usada pela primeira vez no século XIX, em 1891, pelo físico francês Jacques-Arsène D'Ansoval, inventor do galvanômetro, equipamento que promoveu uma revolução nas correntes medicinais. D'Ansoval descobriu que o corpo humano suportava correntes com frequências superiores a 10.000Hz (10KHZ) com poucos efeitos secundários, o que vem sendo utilizado até hoje nas práticas médicas e de fisioterapia.

Em 1893, ele experimentou uma corrente de radiofrequência (500kHz) a qual circulava por um circuito constituído por dois voluntários humanos e uma lâmpada elétrica de 100 watts de potência que brilhou intensamente. Os voluntários afirmaram que, durante o experimento, sentiram somente uma sensação de aquecimento (SILVA *et al.*, 1977).

O uso terapêutico da RF iniciou em 1920, quando o eletrocautério foi introduzido por Bovie e Gusting (BOVIE, 1920). 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 radiofrequência existe, portanto, há quase um século, mas nos últimos anos recebeu expressiva importância em diversos procedimentos, especialmente em eletrocirurgia e nos estímulos térmicos teciduais com fins terapêuticos.

2.6.2 Definição de radiofrequência

Radiofrequência é um tipo de onda eletromagnética que é atenuada exponencialmente quando adentra o tecido-alvo. Em ondas eletromagnéticas de altas frequências, a energia é transferida rapidamente quando está perto da superfície, e atenuada conforme ocorre dispersão. Nas ondas de baixas frequências, no espectro da RF, por exemplo, o comprimento de onda é maior e o aquecimento não permanece localizado em áreas delimitadas, sendo a penetrabilidade mais profunda.

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 neocolagênese subsequente pelo efeito clínico mais tardio (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

A geração de calor através da energia da RF opera através de transferência de energia do campo elétrico para as partículas carregadas no tecido-alvo. Essa transferência pode ser alcançada por intermédio de três mecanismos de interação entre o campo magnético e as cargas: a) orientação de dipolos elétricos já existentes nos átomos e moléculas no tecido; b) polarização dos átomos e moléculas que produzem polos opostos de carga; c) o deslocamento de íons e elétrons no tecido. No primeiro e no segundo mecanismos, o calor é gerado pela utilização de energia envolvida no movimento das partículas em resposta a um campo elétrico. No terceiro mecanismo, por sua vez, o calor é gerado por colisões entre as cargas de transmissão e partículas imóveis. O calor é gerado no tecido tanto pelas alterações de partículas elétricas quanto pelo campo magnético (MADHOK *et al.*, 2013).

A energia de radiofrequência é conduzida eletricamente ao tecido, e o calor é produzido quando a resistência inerente do tecido (impedância)

converte a corrente elétrica em energia térmica. Essa reação é ditada pela seguinte fórmula:

$$\text{Energia (J)} = I^2 \times R \times t$$

(J = Joules, I = intensidade de corrente elétrica, R = impedância do tecido atual, e t = tempo de aplicação). Tecidos de alta impedância, tais como gordura subcutânea, geram maior calor, com efeitos mais profundos de dispositivo de RF (LOLIS e GOLDBERG, 2012).

As formas de geração da radiofrequência não ablativa são: capacitiva (atinge somente a pele e é utilizada na estética), resistiva (alcança a musculatura) e indutiva (muito superficial, não ultrapassa a camada córnea).

A condutividade elétrica depende de vários parâmetros, incluindo o tipo de tecido, a frequência da corrente elétrica e a temperatura do tecido. A distribuição de corrente elétrica, por outro lado, depende da geometria dos eletrodos. Na medicina, existem duas configurações típicas de RF que são usadas: monopolar e bipolar. A principal diferença entre elas é a forma com a qual a corrente é controlada e orientada para o corpo. No entanto, quando há a mesma quantidade de energia, não há diferença no efeito de tecidos (BELENKY *et al.*, 2012). Os modos de transmissão de RF não ablativa são: monopolar (polos positivo e negativo são separados), bipolar (polo positivo e negativo no mesmo cabeçote), tripolar (possui dois polos positivos e um negativo), hexapolar/multipolar (alternância entre os polos, induzindo uma varredura da área).

A configuração monopolar transporta energia através de dois eletrodos: um eletrodo cilíndrico carregado negativamente e um segundo, carregado positivamente, ligado à terra. O eletrodo ativo tem um ponto de contato relativamente pequeno com a pele, enquanto que o eletrodo ligado à terra, que é maior em tamanho, é aplicado ao corpo, a uma distância do eletrodo ativo. A energia elétrica é concentrada próxima à ponta do eletrodo ativo e diminui rapidamente com a distância. A profundidade de penetrância da energia da RF representa a metade do tamanho do eletrodo ativo: por

exemplo, um eletrodo unipolar de 10mm libera energia que pode adentrar a uma profundidade de aproximadamente 5mm (FRANCO *et al.*, 2010). Um exemplo dessa modalidade é o aparelho Spectra®, da marca Tonederm, e o Thermage®.

A configuração bipolar também transporta energia através de dois eletrodos: negativo (ânodo) e positivo (cátodo), mas com uma distância fixa, com ambos os eletrodos em contato com a pele. Dessa forma, a propagação da corrente elétrica de RF é limitada pela área entre os eletrodos. A profundidade de penetração de energia de RF em um sistema bipolar é representada pela metade da distância entre os eletrodos. Por exemplo, em um sistema bipolar, com uma distância de 4mm entre dois eletrodos, a profundidade teórica é de aproximadamente 2mm. Em contraste com a configuração monopolar, a principal vantagem de uma configuração bipolar é que a corrente de RF no interior do tecido tem uma distribuição controlada, que é limitada pela distância entre os dois eletrodos (BELENKY *et al.*, 2012). Como exemplo, o aparelho bipolar Accent® da Alma Lasers.

Na radiofrequência tripolar, os três eletrodos estão na mesma ponteira. A profundidade da penetração da energia é, aproximadamente, a distância média entre os eletrodos. O aparelho Hertix®, da marca KLD, apresenta um cabeçote aplicador nesse modelo, assim como o Apollo® tripolar da Pollogen.

2.7.3 Utilização da radiofrequência

A passagem da RF pelo tecido produz normalmente eventos que derivam do aumento de temperatura: 1) vibração iônica: os íons estão presentes em todos os tecidos e, ao serem submetidos à radiofrequência, vibram à frequência desta, gerando fricção e colisão nos tecidos adjacentes e aumento de temperatura; 2) rotação das moléculas dipolares: as moléculas de água do nosso corpo, apesar de serem neutras, atraem cargas opostas que convertem em um dipolo, ocasionando colisão entre os tecidos adjacentes; 3) distorção molecular: ocorre nas moléculas e nos átomos eletricamente

neutros e seus movimentos são nulos, o que é justificado pelo fato de não possuírem carga elétrica (BOCK; DE NORONHA, 2013).

A RF apresenta alguns efeitos fisiológicos, tais como:

- vasodilatação e aumento da circulação sanguínea: além da elevação da temperatura que produz vasodilatação local, há também estímulo do aporte de nutrientes e oxigênio, acelerando a eliminação dos catabólitos. O incremento da circulação aparece a partir dos 40°C e alcança o limite máximo aos 45°C. A partir de então, inicia-se uma reação de defesa do organismo, manifestando vasoconstrição e consequente diminuição da circulação;
- atividade metabólica e enzimática: com o aumento da temperatura, toda atividade celular aumenta, incluindo a motilidade celular, a síntese e a liberação de mediadores químicos;
- viscosidade: o aumento da temperatura causa diminuição da viscosidade dos líquidos, como sangue, linfa e também dos líquidos dentro e através dos espaços intersticiais;
- alteração no colágeno: com temperaturas em uma faixa terapêuticamente aplicável, tem-se mostrado alteração na extensibilidade do tecido colagenoso. Isso ocorre somente se o tecido for simultaneamente alongado e requerer temperaturas próximas do limite terapêutico;
- estimulação nervosa: os nervos aferentes estimulados pelo calor podem causar um efeito analgésico, agindo sobre os mecanismos de controle da sinapse, do mesmo modo que os mecanoreceptores.

Os efeitos biológicos da radiofrequência são atérmico e térmico, sendo esse último o de mais elevada 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. Essa injúria térmica ativa o processo inflamatório e a síntese de colágeno pelos fibroblastos, ocorrendo a formação de nova fibra de colágeno alterada em diâmetro, espessura e periodicidade, levando à reorganização

das fibras e ao subsequente remodelamento do tecido. Também produz inflamação controlada dos tecidos, aumento imediato de interleucina 1-beta (IL-1b), fator de necrose tumoral alfa (TNF-a) e metaloproteinase de matriz 1 (humanos) e 13 (ratos) (MMP-13), sendo essa 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-b) mantêm-se elevados por dois dias. Juntamente, a tropoelastina, a fibrilina e o procolágeno I e III são estimulados por 28 dias após o tratamento e esses danos térmicos estimulam a cicatrização de feridas, a remodelação dérmica e a produção de novo colágeno, elastina e a formação de ácido hialurônico (BRAVO *et al.*, 2013).

A estimulação de colágeno ocorre em uma temperatura que varia entre 42°C e 45°C internamente, enquanto que a fibrose ocorre na temperatura máxima de 38°C internamente. Alguns estudos em cobaias têm demonstrado que há uma diferença entre temperatura interna e externa (temperatura superficial), a qual pode variar de 2°C a 5°C (GUNES *et al.*, 2014). Os danos começam a ser irreversíveis em alguns tecidos com temperaturas acima de 50°C (desnaturação do colágeno), assim como a redução de atividade enzimática (PETERSON *et al.*, 2011).

Lasers e diferentes comprimentos de onda de luz, e também novas modalidades de energia para tratamento cutâneo, como radiofrequência e ultrassom, estão entre as intervenções seguras que se supõe apresentar estímulo à cicatrização. Sequelas pós-tratamento são geralmente leves e resolvem espontaneamente, como eritema e edema, com duração de horas a dias (ALAM; WARYCHA, 2011).

Os dispositivos de energia cutâneas são modificadores cutâneos e têm como exemplo os dispositivos de radiofrequência (monopolar, bipolar – tópicos – e dispositivos invasivos), dispositivos de ultrassom (para indicações tais como tonificação da pele e redução de gordura), aparelhos de plasma, criolipólise, e qualquer terapêutica que envolva a utilização de energia para tratamento cutâneo (ALAM; WARYCHA, 2011).

Lasers e dispositivos de energia cutânea, apesar de suas diferenças, compartilham muitas semelhanças. Em geral, proporcionam uma quantidade precisamente graduada de energia em uma área definida da pele; de modo reprodutível e padronizado; que quase sempre envolve a adição ou a dissipação de calor. Com exceção das técnicas ablativas, praticamente todos os dispositivos de energia cutânea são "seletivos", na medida em que o alvo da terapêutica é um dos componentes da epiderme, da derme ou do tecido subcutâneo, com preservação dos outros componentes (ALAM; WARYCHA, 2011).

Lasers para tratamento de feridas são lasers de baixa energia, capazes de elevar a temperatura do tecido 0,1°C a 0,5°C. Tratamento com laser de baixa energia é chamado bioestimulação.

A bioestimulação moderada estimula a atividade fisiológica de homeostase, favorece o efeito fisiológico do processo cicatricial, impede processo inflamatório exagerado. Os lasers são utilizados por aumentar a taxa de cura, especialmente quando combinado com oxigenioterapia hiperbárica. A terapia a LED (*Light-Emitting Diode*) baseia-se na emissão de luz com comprimento de onda de 680, 730, e 880nm simultaneamente. Em comparação com grupo controle, foi observada cura em um tempo 50% mais rápido em lacerações da tripulação tratada com LED (BROUGHTON, 2006).

Na última década, devido à alta demanda por tratamentos antienvelhecimento e de melhora do aspecto da cicatriz, foram desenvolvidos tratamentos a laser e sistemas baseados em luz. A tecnologia não ablativa substitui sistemas tradicionais ablativos, como o dióxido de carbono e de *erbium* (considerados por muito tempo os padrões-ouro para a dermoabrasão) devido à capacidade desses sistemas não ablativos de induzirem neocolagênese sem lesão epidérmica (limitando os efeitos adversos e praticamente eliminando recuperação pós-operatória). Os dispositivos de radiofrequência foram desenvolvidos para resolver deficiências do tratamento não ablativo e diminuir a flacidez do tecido (ALSTER; LUPTON, 2007).

Ambos dispositivos de RF, monopolar e bipolar, têm sido usados para aplicações cutâneas. Sistemas monopolares fornecem corrente através de um único ponto de contato com ligação-terra de acompanhamento, que serve como um caminho de baixa resistência para o fluxo de corrente para completar o circuito elétrico. Eletrodos monopolares concentram a maior parte de sua energia perto do ponto de contato, e a energia diminui rapidamente à medida em que a corrente flui em direção ao eletrodo de aterramento. Dispositivos bipolares só passam corrente elétrica entre dois eletrodos posicionados aplicados sobre a pele. Não é necessária a ligação à terra como nos outros sistemas, porque nenhuma corrente flui ao longo do resto do corpo. Dispositivos de RF monopolar e dispositivos bipolares têm demonstrado utilidade clínica para o tratamento da flacidez facial excessiva e redução de rugas; redução de telangiectasias dos membros inferiores, acne e pelos indesejáveis; além de cuidados de cicatrizes pós operatórias (LU *et al.*, 2000).

A RF não ablativa foi introduzida recentemente para o tratamento da flacidez facial e corporal (MATTOS *et al.*, 2009), gordura localizada, lipodistrofia ginoide, úlceras venosas e cicatrizes hipertróficas e queiloideanas, por meio do aquecimento volumétrico na derme profunda e no tecido subcutâneo (ALDEN *et al.*, 2013).

Pacientes de diferentes fototipos de pele podem ser tratados com sistemas baseados em RF e significativa energia térmica pode ser gerada com segurança dentro das camadas mais profundas do tecido para efetuar a contração do colágeno e formação de colágeno novo.

O uso da RF é contraindicado em pacientes portadores de marcapasso, desfibriladores, qualquer implante metálico e neoplasias (HASSUN *et al.*, 2008).

2.7.4 A radiofrequência em estudos experimentais

A radiofrequência produz efeitos térmicos e atérmicos. O aumento da temperatura diminui a distensibilidade e aumenta a densidade de colágeno, conseguindo, assim, diminuir a flacidez da pele. Esse efeito é chamado de *lifting* de radiofrequência. Estudos mostram que o aumento de temperatura produz ainda uma inflamação controlada dos tecidos, com aumento imediato de interleucina 1-beta (IL-1b), fator de necrose tumoral alfa (TNF-a) e metaloproteinase de matriz 1, em humanos, e sua correspondente em roedores, a 13 (MMP-13) (CHOI *et al.*, 2013, LI *et al.*, 2011).

A fotobiomodulação a laser e o efeito térmico da radiofrequência têm sido cada vez mais utilizados com a finalidade de melhorar a qualidade da cicatrização. Os efeitos terapêuticos dessas terapias sobre os diferentes tipos biológicos são amplos e, entre eles, destacam-se os efeitos trófico-regenerativos, anti-inflamatórios e analgésicos (BUSNARDO; BIONDO-SIMÕES, 2010).

No estudo de Choi *et al.*, no qual foi realizada uma sessão de radiofrequência em coelhos, foram encontradas, na análise histológica, reações inflamatórias mais proeminentes. O processo inflamatório mostrou-se mais exacerbado com o passar dos dias, mudanças nanoestruturais em fibrilas de colágeno dérmico no grupo submetido à terapia (CHOI *et al.*, 2012).

Em estudos realizados por Fernandes (2009), observou-se que altas temperaturas podem comprometer o tecido inflamatório, provocando a morte celular e alterações de fibras de colágeno. No entanto, temperaturas com valores moderados podem estimular processos fisiológicos que melhoram os tecidos, promovendo a neoformação colágena e o surgimento de grande quantidade de vasos subepiteliais. Baixas temperaturas e uma menor quantidade de aplicações podem não ser suficientemente eficazes para gerar modificações fisiológicas. O protocolo avaliou a concentração de colágeno e as alterações no processo inflamatório após ser aplicada a radiofrequência em tecido dérmico de ratos da linhagem Wistar em dois grupos, sendo o

grupo 1 com uma aplicação de radiofrequência e o grupo 2 com três aplicações, em dias alternados, ambos com sacrifício em 24 horas após a última aplicação. Foi definido por um pré-teste um aumento de temperatura da pele do animal de 6°C a 7°C, com tempo de exposição por dois minutos em uma área de 5cm², que corresponde a duas áreas do eletrodo ativo, tempo necessário para chegar nesses valores (FERNANDES *et al.*, 2009).

Em estudo realizado em camundongos diabéticos, identificou-se maior processo inflamatório no grupo submetido à radiofrequência duas vezes ao dia, com auxílio do fechamento das feridas e maior expressão de Ki-67. No entanto, a resistência dos tecidos não foi medida (LI *et al.*, 2011)

2.7.5 A radiofrequência em estudos clínicos

As terapias que utilizam estimulação térmica e por ondas de luz e radiação têm sido cada vez mais utilizadas como coadjuvantes no processo cicatricial. Laser, LED, ultrassom e radiofrequência são cada vez mais estudados no processo cicatricial.

Em 2010, realizou-se um estudo clínico em trinta pacientes, usando a RF para melhorar o envelhecimento facial. Nessa pesquisa, foi evidenciada melhora da flacidez e de rugas profundas (diminuição de dois ou mais graus na escala de rugas de Fitzpatrick) em 86,7% dos pacientes, avaliados após três meses (ELMAN *et al.*, 2010).

Segundo o estudo clínico multicêntrico de Abraham e Ibrahim, no qual foi realizada sessão única de RF monopolar na área periorbital de 86 indivíduos, observou-se elevação do supercílio em 62% dos pacientes e melhora clínica de 83% na profundidade / grau de gravidade de ríides (ABRAHAM; IBRAHIM, 2007).

Estudos do uso de radiofrequência em gordura localizada e melhora do contorno corporal evidenciaram melhora dos parâmetros clínicos com o uso dessa terapia (PAUL; MULHOLLAND, 2009). O protocolo realizado por Costa

e colaboradores mostra que a utilização da radiofrequência aplicada em humanos por 12 sessões, três vezes por semana, visando à redução da adiposidade abdominal, apresentou redução significativa de gordura localizada. O tempo utilizado foi de três minutos por área, com temperatura média inicial 33,7°C e média final 40,5°C avaliadas com termômetro de superfície, totalizando uma média de 20 minutos por sessão para atingir os resultados esperados (COSTA; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este estudo faz parte da área de Concentração Nutrição e Cicatrização em Cirurgia, na linha de pesquisa de cicatrização e resistência de tecidos, do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR. Foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC - PR), sob o registro nº 770 de 2013 (ANEXO 1), de acordo com as normas de pesquisa animal dispostas na legislação nacional, obedecendo aos Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA). O projeto faz parte de uma linha de pesquisa sobre cicatrização e radiofrequência e é desenvolvido em conjunto com outras duas alunas desse Programa de Pós-Graduação.

Caracterizou-se como uma pesquisa quantitativa descritiva experimental provocada, randomizada, do tipo simples cego.

A normatização do trabalho segue as recomendações do Sistema de Bibliotecas (SIBI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), estabelecidas nas Normas para Apresentação de Documentos Científicos (2007).

3.2 MATERIAL

3.2.1 Ambiente

Os procedimentos experimentais foram realizados nos laboratórios da PUC-PR, Curitiba-PR. As condições ambientais do laboratório foram controladas eletronicamente para que fosse mantida uma temperatura controlada através de ar-condicionado estável e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram mantidos no laboratório de cirurgia experimental da

Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica, onde também os experimentos cirúrgicos foram realizados.

Durante o período, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, que foram identificadas, conforme o número do animal e o grupo ao qual pertencia, e acomodadas em estantes horizontais. O laboratório foi mantido com temperatura controlada de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12h mantido artificialmente através do timer digital foxlux®, com lâmpadas fluorescentes. Os animais receberam água filtrada e ração sólida comercial balanceada (Nuvital Cr1®) *ad libitum* durante todo o período experimental, totalizando 15 dias (FIGURA 4).

O estudo anátomo-patológico foi desenvolvido no laboratório de Patologia do Hospital São Lucas, Curitiba-PR.

A análise tensiométrica foi realizada no laboratório do Setor de Ciências da Saúde, anexo ao Setor de Cirurgia Experimental, da Universidade Federal do Paraná.

Para delineamento do grupo experimental, foi realizado, em 2012, em conjunto com os projetos das alunas Ana Maria Cepeda e Gilian Fernanda Dias Erzinger, um estudo piloto no biotério da PUC – PR.

3.2.2 Animais

Quarenta e oito ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, nome vulgar “rato Wistar albino”, pesando entre 300g e 350g, com idade de aproximadamente 3 meses, procedentes do Biotério Central da PUC – PR, foram incluídos no estudo. Esses animais foram divididos em quatro grupos com 12 animais cada, a serem descritos.



FIGURA 4 - RATOS WISTAR ALBINO UTILIZADOS NO EXPERIMENTO, ORGANIZADOS EM GAIOLAS INDIVIDUAIS. AS GAIOLAS ESTÃO DISPOSTAS EM PRATELEIRAS.

3.2.3 Outros materiais

Luvas de látex foram utilizadas para manipulação diária dos animais (anestesia, documentação fotográfica e aplicação de radiofrequência). Para anestesia e eutanásia dos animais, foram utilizadas quetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), conforme protocolos estabelecidos por veterinários.

A pesagem dos animais foi feita em balança modelo AM 500 Marte®, regulada nos padrões do Inmetro.

A documentação fotográfica foi realizada com câmera digital Sony® modelo Cyber-shot DSC-W1 (Sony, Tokyo, Japão), com resolução de 6.1 megapixels.

Para a realização do procedimento cirúrgico, foi utilizado material estéril: cabo de bisturi número 4, tesoura de Mayo reta, tesoura de

Metzembraum curva, pinça de Adson e porta-agulha Derf, todos da marca Edlo®. Os materiais descartáveis consistiram de lâminas de bisturi número 15 (Solidor®), fios de nylon monofilamentar 4-0 (Shalon®) e gazes. Como medidas antissépticas, foi utilizada solução tópica de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) e campos estéreis. Para marcação da pele, foi usada uma caneta preta, de ponta fina, modelo Sharpie®.

3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Grupos de pesquisa

Os animais foram pesados e randomicamente divididos em quatro grupos iguais, de 12 animais, com três aplicações de radiofrequência em dias alternados, os quais foram sacrificados em períodos distintos a contar da última aplicação de cada grupo, da seguinte forma:

- a) Grupo Radiofrequência 7 dias (GR7): os animais foram submetidos à terapia de radiofrequência em estudo e eutanásia após 7 dias de lesão e início de terapia.
- b) Grupo Controle 7 dias (GC7): os animais foram submetidos à terapia com o aparelho de radiofrequência desligado e eutanásia após 7 dias de lesão e início de terapia.
- c) Grupo Radiofrequência 14 dias (GR14): os animais foram submetidos à terapia de radiofrequência em estudo e eutanásia após 14 dias de lesão e início de terapia.
- d) Grupo Controle 14 dias (GC14): os animais foram submetidos à terapia com o aparelho de radiofrequência desligado e eutanásia após 14 dias de lesão e início de terapia.

TABELA 2 - DIVISÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS.

GRUPO	
GR7	Grupo no qual foi realizada eutanásia ao 7º dia após lesão e radiofrequência com o aparelho ligado
GC7	Grupo controle no qual foi realizada eutanásia ao 7º dia após lesão e radiofrequência com aparelho desligado
GR14	Grupo no qual foi realizada eutanásia ao 14º dia após lesão e radiofrequência com o aparelho ligado
GC14	Grupo controle no qual foi realizada eutanásia ao 14º dia após lesão e radiofrequência com aparelho desligado

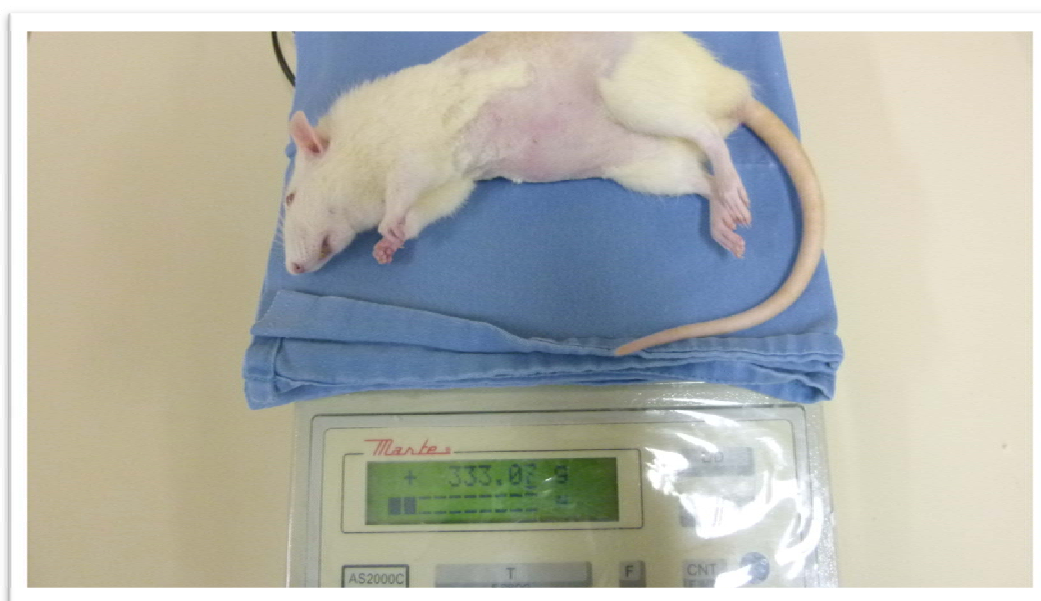


FIGURA 5 – PESAGEM DO ANIMAL ANTES DA DISTRIBUIÇÃO ALEATÓRIA EM GRUPOS.

3.3.2 Desenho da pesquisa

QUADRO 1 – DESENHO DA PESQUISA



3.4 ETAPAS EXPERIMENTAIS

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

3.4.1 Anestesia

Para a realização do procedimento cirúrgico inicial, a aplicação da radiofrequência e a retirada das peças cirúrgicas, os animais foram submetidos à anestesia intramuscular. Primeiramente, foi realizada a

anestesia com quetamina 80 mg/kg e xilazina 8 mg/kg em cada animal, com aplicação via intramuscular, em coxa bilateral. Os animais foram vigiados durante todo o procedimento pela pesquisadora e por técnicos do biotério, que dedicaram especial atenção no que concerne a sedação e a eventuais manifestações de dor. ;

3.4.2 Marcação da pele

Após anestésiar o animal, foi realizada tricotomia e antissepsia com povidine-iodine (PVPI). Após, o animal foi posicionado em decúbito dorsal, com os quatro membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco e a marcação com caneta preta foi realizada na linha média da região ventral. A ferida incisional foi demarcada com caneta preta, utilizando uma régua e medindo 5cm de extensão. (FIGURA 6).

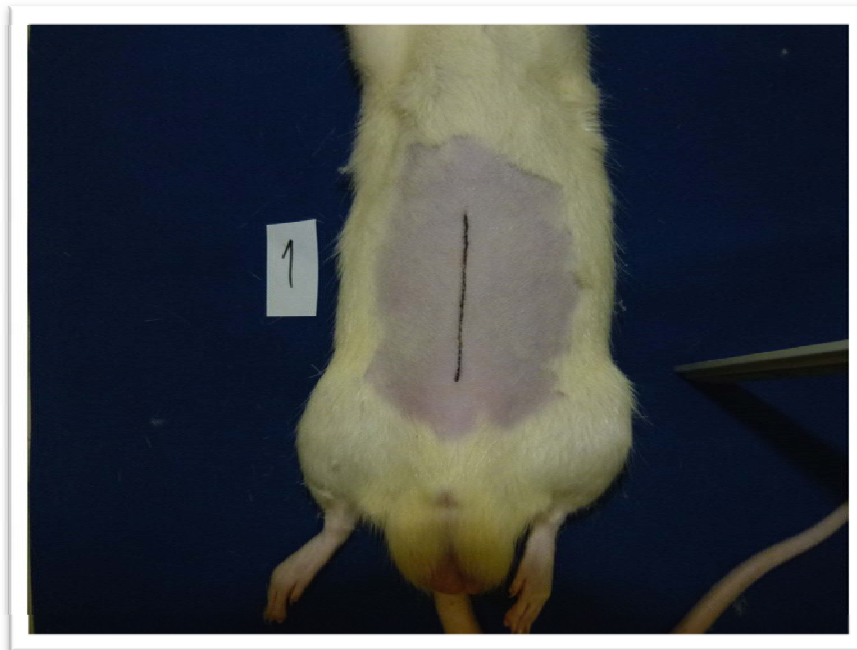


FIGURA 6 - MARCAÇÃO DA FERIDA INCISIONAL COM CANETA PRETA NA PORÇÃO VENTRAL.

3.4.3 Procedimento cirúrgico

No período pré-operatório imediato, os animais foram submetidos a jejum de 2 horas prévias ao procedimento cirúrgico.

Depois de anestesiado e tricotomizado, o animal foi alinhado e posicionado sobre o campo operatório, em decúbito dorsal, com os quatro membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco.

A equipe foi composta por uma cirurgiã (a pesquisadora) e um auxiliar, responsável pelo monitoramento do plano anestésico do animal.

O procedimento cirúrgico foi realizado com uma incisão de 5cm, com bisturi de lâmina n. 15, até a exposição da fáscia abdominal muscular (FIGURA 7). A síntese dessa foi feita com seis a sete pontos interrompidos de nylon 4-0, igualmente distribuídos pela ferida.

Os animais também foram submetidos a feridas excisionais dorsais para avaliação por outra pesquisadora do curso de pós-graduação.

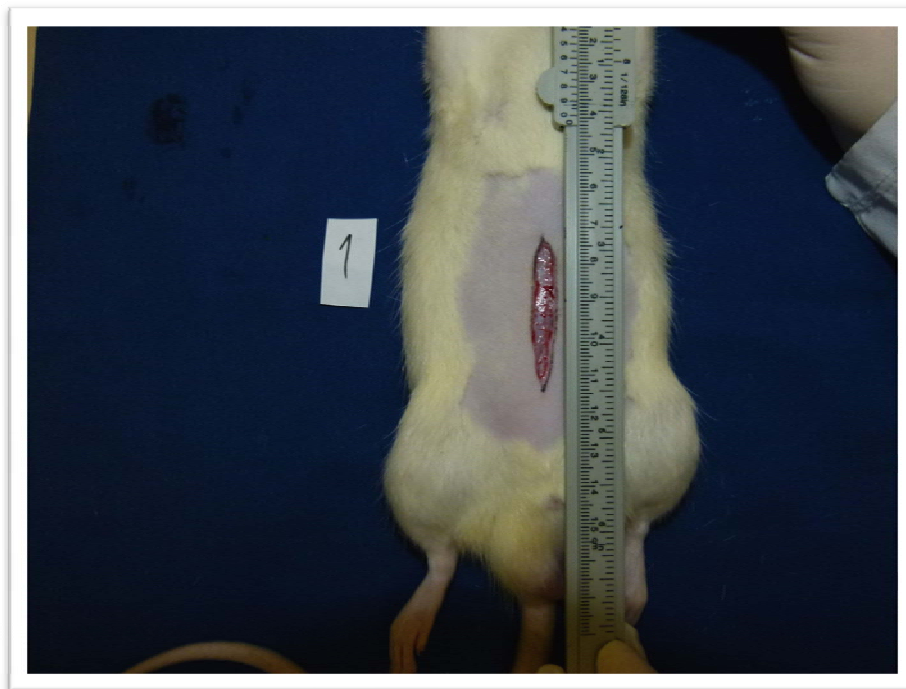


FIGURA 7 – FERIDA INCISIONAL.

3.4.4 Pós-operatório

Ao fim do procedimento cirúrgico, os ratos foram mantidos em ar ambiente até a completa recuperação. Com o intuito de evitar possíveis interferências dos outros animais ainda não operados, como mordeduras na área cruenta, ao término do ato operatório cada rato foi colocado em gaiola isolada até a completa recuperação anestésica. Após recuperação anestésica, cada rato foi recolocado em sua gaiola de origem, onde voltou a receber, após 2 horas do procedimento, água e ração *ad libitum*.

Durante os cinco dias subsequentes, foram ministrados, via intramuscular, 5mg/kg do analgésico dipirona, duas vezes ao dia, para minimizar a dor ou desconforto que o animal pudesse estar sentindo. Foi optado por usar essa medicação pelo seu baixo potencial anti-inflamatório.

3.5 APLICAÇÃO DA RADIOFREQUÊNCIA

Uma vez transcorridas 24 horas das lesões, foi realizada a mesma anestesia citada acima, para que, durante a aplicação da radiofrequência com o equipamento Spectra[®] da Tonederm[®] com amplitude de 1 kHz (FIGURA 8), o rato permanecesse parado, colocando o eletrodo de dispersão de 10 x 5cm de tamanho na região abdominal para aplicação da radiofrequência e o eletrodo ativo foi aplicado durante 7 minutos, dos quais 5 minutos sobre a região abdominal; os outros 2 minutos foram necessários para atingir a temperatura ideal (38°C). Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes em dias alternados. Utilizou-se o equipamento de radiofrequência com amplitude de 100% e com gel neutro para facilitar o deslizamento.



FIGURA 8 – EQUIPAMENTO MONOPOLAR DE RADIOFREQUÊNCIA SPECTRA® DA TONEDERM®

A manopla (eletrodo ativo) foi posicionada sobre a pele depilada do dorso do rato em 90°. Foram realizados movimentos retilíneos e circulares lentos até que a temperatura atingisse 38°C (FIGURA 9). Para isso, a temperatura foi medida através do termômetro de infravermelho que acompanha o aparelho, no qual a aferição é exata e imediata. Nos dois grupos de radiofrequência, foi realizado o mesmo procedimento, com exceção dos grupos controle, em que o equipamento era mantido desligado (FIGURA 10).

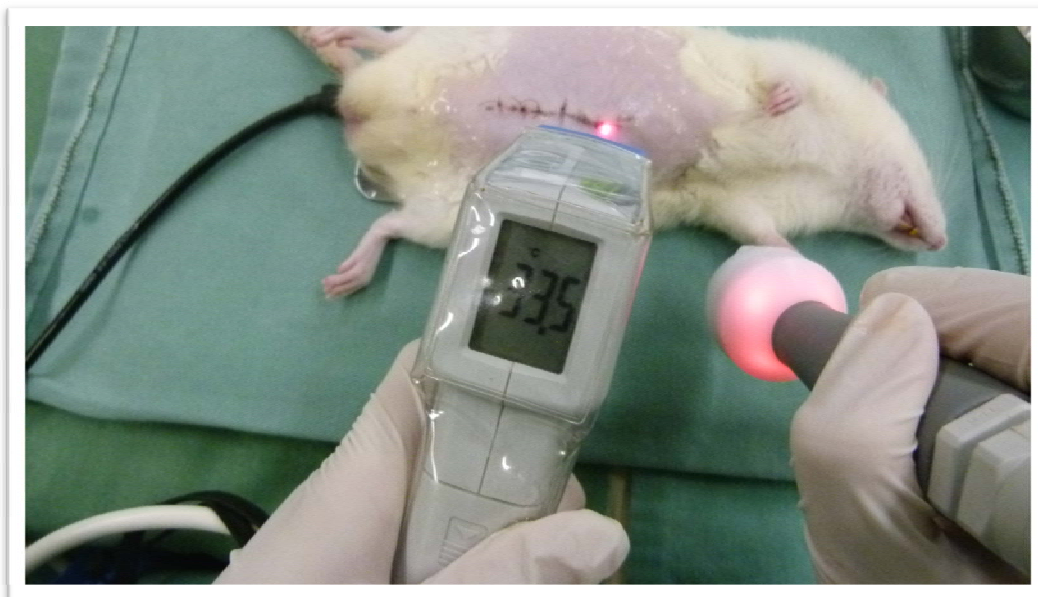


FIGURA 9 – AFERIÇÃO DA TEMPERATURA COM TERMÔMETRO INFRAVERMELHO. NOTA-SE A MANOPLA ACESA NO CANTO DA FIGURA, IDENTIFICANDO QUE O APARELHO ESTÁ EM FUNCIONAMENTO.



FIGURA 10 – ANIMAL DO GRUPO CONTROLE SENDO SUBMETIDO À COLOCAÇÃO DO APARELHO DE RADIOFREQUÊNCIA DESLIGADO. NOTA-SE A MANOPLA DESLIGADA NO CANTO DA FIGURA.

3.6 EUTANÁSIA

Previamente à eutanásia, no 7º dia pós-operatório, todos os animais dos grupos GR7 e GC7 foram submetidos à anestesia, e, no 14º dia pós-operatório, todos os animais dos grupos GR14 e GC14 foram submetidos à anestesia. Logo em seguida, o rato foi posicionado em decúbito dorsal, fotografado e devidamente marcado para ressecção dos espécimes cirúrgicos.

Após esse procedimento, os animais foram submetidos à eutanásia na câmara com saturação de CO₂ a 70%.

3.7 CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS

Após retirada cuidadosa dos pontos da ferida incisional, segmentos padronizados de pele foram ressecados para o teste tensiométrico e estudo histológico, tendo sido desprezados 5mm da extremidade superior e inferior da ferida. O corpo de prova do teste tensiométrico consistiu do segmento de pele de espessura total, contendo a ferida cirúrgica no centro, medindo 2cm de largura por 6cm de comprimento. Essa maior extensão teve por finalidade proporcionar melhor fixação do tecido ao aparelho de tração. Para estudo histológico, foram ressecados 2cm da porção superior da ferida incisional (pele de espessura total).

As amostras foram colocadas em frascos com solução de formaldeído a 10%, para, na sequência, serem preparadas para avaliação histológica.

Com isso, as amostras foram encaminhadas para confecção das lâminas no laboratório da PUC-PR, para realização da análise histológica.

3.8 ANÁLISE MECÂNICA – TESTE TENSIONOMÉTRICO

Para realização do teste de tração, as extremidades de cada segmento de pele (corpo de prova) foram fixadas na presilha superior e inferior do aparelho tensionométrico (DL -500 MF ; Emic ® , São José dos Pinhais, PR), mantendo a cicatriz da ferida incisional entre as porções fixadas. Todos os testes foram feitos num intervalo máximo de 1 hora após a ressecção dos corpos de prova. O ensaio foi comandado automaticamente pelo aparelho e a obtenção dos resultados se fez por programa de computador específico acoplado ao sistema (Instron, IX, 7.26.00 ©).



FIGURA 11 – APARELHO DE TENSIONOMETRIA.

A tração desenvolveu-se com velocidade constante de 50 mm/min, com limite de força de 4.500 kgf, até o colapso da linha cicatricial do corpo de prova, de acordo com a técnica proposta por Knolmayer *et al.* (1996). As

variáveis tensão máxima e força máxima foram obtidas para cada corpo de prova testado.

Tensão máxima foi definida como a quantidade máxima de força suportada por unidade de área de secção (kgf/cm^2). Assim, essa variável foi dependente das dimensões de tecido ressecado e testado, as quais foram padronizadas em 2cm para a largura e 2mm para a espessura. Força máxima consistiu na maior força suportada pelo tecido até haver a perda de continuidade deste (kgf). Assim, duas variáveis relacionadas a tensões, as quais refletem a força da sutura da parede abdominal, foram obtidas para cada rato (FIGURAS 12 e 13).

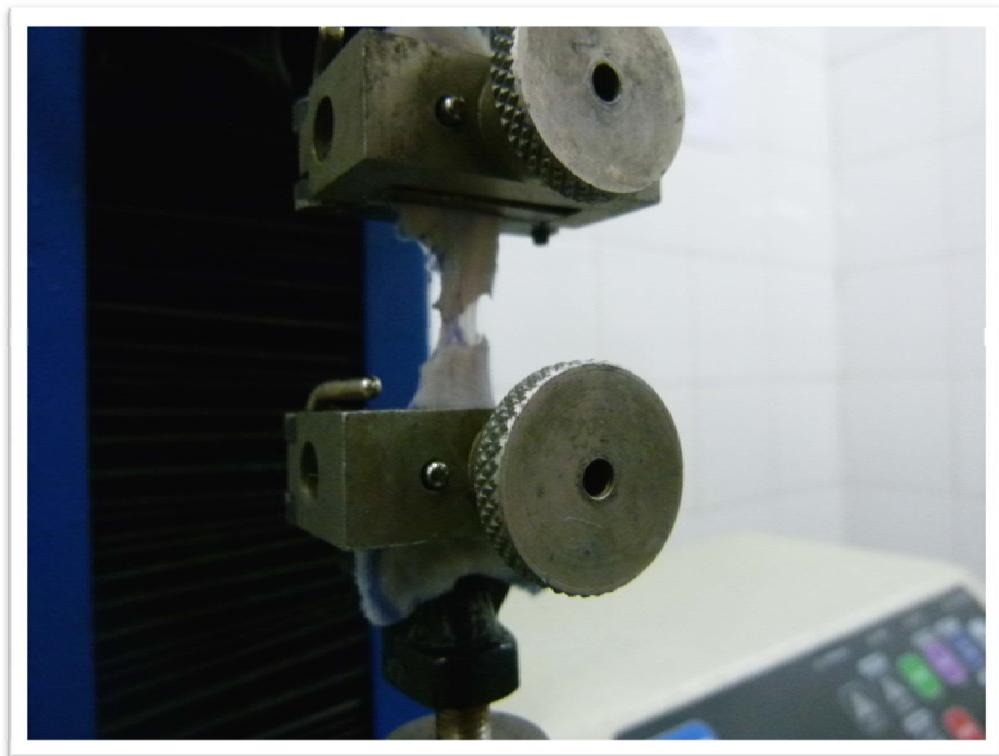


FIGURA 12 – TESTE TENSOMÉTRICO DA FERIDA CUTÂNEA INCISIONAL. TRAÇÃO PROGRESSIVA ATÉ RUPTURA COMPLETA DA LINHA CICATRICAL.



FIGURA 13 – EXEMPLO DE GRÁFICO OBTIDO POR PROGRAMA DE COMPUTADOR ACOMPLADO AO SISTEMA. EVIDENCIA-SE GRÁFICO COM PICO SINALIZANDO A FORÇA MÁXIMA E A FORÇA DE RUPTURA SOFRIDAS PELO TECIDO.

FONTE: DR. ANDRÉ TOLAZZI (2007). Modificado pela autora (2015)

3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após o 7º dia nos grupos GR7 e GC7, e após o 14º dia nos grupos GR14 GC14, cada fragmento de pele, incluindo a margem do ferimento e o tecido subcutâneo, após teste tensiométrico, foi fixado a 10% de formalina (Reagen, RJ- Br) e embebido em parafina, para evitar a digestão dos tecidos por enzimas presentes no interior das células, preservando, assim, sua estrutura e a composição molecular. Os blocos foram orientados de forma a obter cortes perpendiculares, com espessura de 0,4µm, utilizando um micrótomo (FIGURA 14). Foi realizada análise cega por patologista.



FIGURA 14 – BLOCOS DE PARAFINA COM PEÇAS HISTOLÓGICAS.

3.9.1 Coloração por Hematoxilina – Eosina (HE)

As amostras foram coradas com HE (hematoxilina-eosina), tendo em vista que a hematoxilina cora o núcleo das células e outras estruturas ácidas e a eosina cora citoplasma e o colágeno. As lâminas foram identificadas e, posteriormente, para análise dos elementos do tecido, os dados de identificação foram ocultados.

As peças foram fixadas em Paraformaldeído 4%; em PBS; pH 7,4. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em Xilol e incluídas em parafina. Cortes de 3 μ m das peças foram depositados em lâminas carregadas positivamente. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em

concentrações decrescentes de etanol, e processados para a técnica de coloração Hematoxilina & Eosina (HE).

Analisaram-se os cortes histológicos por meio do uso de microscópio óptico Olympus, modelo CX31® (Olympus®, Tokyo, Japão). Foram definidos cinco campos, dispostos no tecido de granulação, examinados inicialmente em aumento panorâmico para a identificação dos melhores campos representativos da lesão e, a seguir, foram analisados sob aumento de 400 vezes, dependendo do parâmetro em questão. Os segmentos histológicos corados com hematoxilina-eosina foram examinados por um patologista profissional cego e permitiram avaliar de forma semiquantitativa os vasos neoformados e o número de células do tecido de granulação na pele dos animais dos quatros grupos (FIGURA 15).

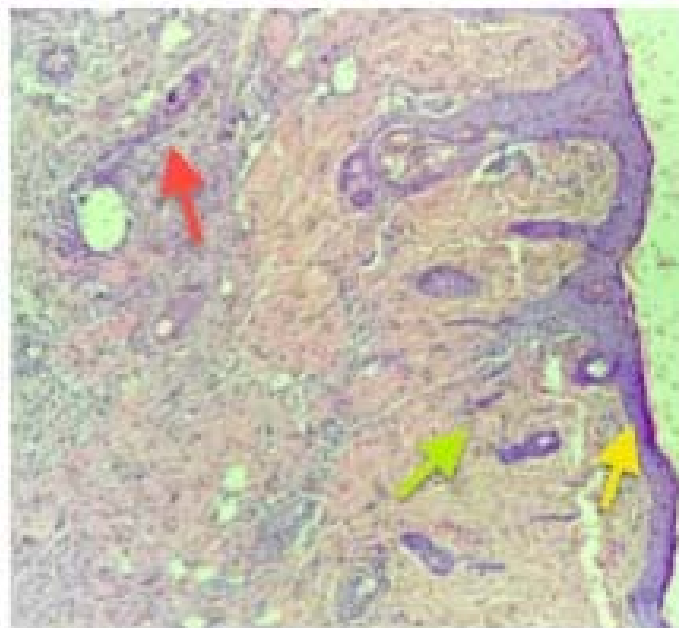


FIGURA 15 – COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA (MAGNIFICAÇÃO 100X). CAMPO EVIDENCIANDO PROCESSO INFLAMATÓRIO. (SETA AMARELA): CÉLULAS DA EPIDERME. (SETA VERDE): CÉLULAS DA DERME / FIBROBLASTOS. (SETA VERMELHA): CÉLULAS INFLAMATÓRIAS / AGLOMERADO DE LINFÓCITOS.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

O componente inflamatório celular, os elementos celulares da inflamação crônica e aguda, a reparação e a proliferação fibroblástica foram quantificados (QUADRO 2). Sendo os parâmetros utilizados na avaliação o HE subjetivos, foram denominado graus, de 0, que é o menor número encontrado de células, até 4, que evidencia a presença de numerosas células, a fim de transformar esses dados em valores numéricos para gerar gráficos.

QUADRO 2 - PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS ANALISADOS PELO MÉTODO HE

FONTE: JUNQUEIRA, 2014

G R A U	Componente inflamatório celular	Elementos celulares da inf. crônica: linfócitos	Elementos celulares da inf. 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 inflamatórias 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 inflamatórias em número moderado, agrupamentos	Numerosos linfócitos/plasmócitos	Exsudato neutrófilico	Macrófagos em número moderado, 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

3.9.2 Coloração por *Picrosirius*

Para a diferenciação do colágeno, foi utilizado o corante Picrosirius, baseado na característica desse método de quantificação das fibras de colágeno e de diferenciação dos dois tipos principais de fibras de colágeno presentes no processo inflamatório: tipos III e I (JUNQUEIRA *et al.*, 1979).

Uma vez obtidos os segmentos de tecido das feridas incisionais, os espécimes foram mantidos em Paraformaldeído 4%, para posterior estudo histológico, o qual foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas, Curitiba - PR. O método consistiu na identificação e quantificação das fibras colágenas totais, fibras tipo I e fibras tipo III, por técnica de microscopia óptica com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. Após desidratação, diafanização e emblocamento dos tecidos em parafina, foram realizadas microtomias com 4µm de espessura e subsequente coloração com picrosirius-red F3BA (FIGURA 16).

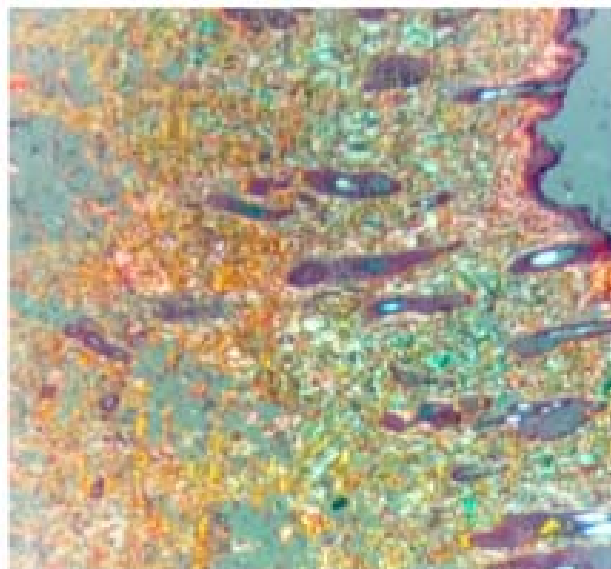


FIGURA 16 – COLORAÇÃO PICROSSIRIUS (MAGNIFICAÇÃO 100X). EVIDENCIANDO PROCESSO INFLAMATÓRIO. E CONGLOMERADO DE FIBRAS DE COLÁGENO. FIBRAS AMARELAS E ALARANJADAS: COLÁGENO TIPO I; FIBRAS VERDES: COLÁGENO TIPO III.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA PATRÍCIA STREMEL (2014)

Analisaram-se os cortes histológicos através de microscópio óptico Olympus® (Olympus®, Tokyo, Japão), com fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por uma câmara fotográfica Sony® CCD Íris (Sony®, Tokyo, Japão), transmitidas a monitor colorido Triniton Sony®, congeladas e digitalizadas por meio de placas Oculus TCX®. Finalmente, as imagens foram analisadas pelo aplicativo Image Pro-Plus® versão 4.5 (Mídia Cibernética, São Paulo, SP, Brasil). Foram analisadas as densidades dos colágenos tipos I e III. Em aumento de 100 vezes, a calibração do sistema foi realizada pela leitura de área cicatricial considerada normal pelo examinador. No sistema RGB (Red, Green, Blue) considerou-se valores para os tons de vermelho e laranja (colágeno maduro tipo I) e para os tons de verde (colágeno imaturo tipo III). O colágeno total da ferida foi quantificado (quaisquer estruturas com coloração em espectro variando de amarelo, verde a vermelho) e diferenciado da substância amorfa restante do tecido (tons de preto). Todas as análises histológicas foram realizadas em um mesmo período, de forma aleatória, sob as mesmas condições de regulação e calibração do aparelho.

Na análise histológica de cada área cicatricial, cinco campos de grande aumento (200 vezes) foram aleatoriamente selecionados para a quantificação dos tipos de colágeno. A média dessas cinco análises foi considerada como valor final para cada ferida.

A coloração pelo método do *Picrosirius* faz com que grande quantidade de moléculas do *Sirius Red*, de caráter ácido e alongadas, disponham-se paralelamente às moléculas do colágeno, o que provoca aumento considerável da birrefringência das fibras que contêm colágeno quando observadas à luz polarizada. Assim, o método da coloração *Picrosirius* associado à microscopia de polarização é um método histoquímico específico para detecção de estruturas compostas de moléculas de colágeno. O colágeno tipo I forma fibras grossas, compostas por fibrilas grossas densamente agrupadas e, conseqüentemente, apresenta intensa birrefringência com coloração avermelhada. O colágeno do tipo III forma fibras finas (fibras reticulares), compostas por fibrilas finas, frouxamente dispostas, mostrando fraca birrefringência de coloração amarelo e verde. A utilização

desse método permite a identificação diferenciada das fibras de colágeno (JUNQUEIRA *et al.*, 1979).

Para a quantificação do colágeno total da ferida, foram analisadas as áreas com coloração diferente da cor preta e foi calculada a porcentagem de áreas com e sem fibras colágenas por campo de grande aumento (200 vezes). Para a quantificação dos colágenos tipos I e III, em cada campo analisado, foi calculada a porcentagem somente das áreas ocupadas por fibras, desconsiderando outras tonalidades e espaços escuros entre elas. Assim, a soma da porcentagem de fibras maduras e imaturas em cada amostra totalizou 100%. As avaliações foram realizadas no software ImageJ (Image J ©, 1,38x, National Institutes of Health, EUA) (FIGURA 17).

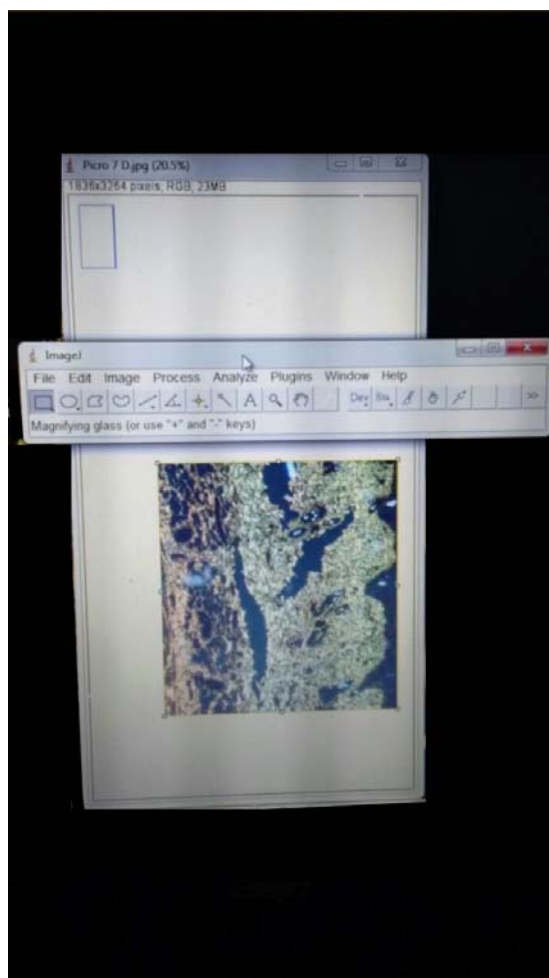


FIGURA 17 – AVALIAÇÃO DA COLORAÇÃO PICROSSIRIUS PELO IMAGEJ. CÁLCULO DO PIXELS APÓS SUPRESSÃO DE COLORAÇÃO AMARELA, EVIDENCIANDO FIBRAS DE COLÁGENO TIPO III (VERDE).

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA (2014)

3.9.3 Imunoistoquímica para VEGF

A imunoistoquímica consiste na utilização de anticorpos específicos conhecidos e manipulados quimicamente para que, ao se ligarem aos seus antígenos celulares ou teciduais correspondentes, devido a diversas reações e à utilização de cromógenos, produzam alteração de coloração visível à microscopia óptica, a qual indica o antígeno específico e o quantifica.

Para a imunoistoquímica, foi utilizado o método *tissue array* ou *micro array*, sendo retiradas amostras do bloco de parafina utilizado para a confecção do hematoxilina e eosina (HE) e *Picrosirius*.

Para a imunoistoquímica, os cortes reidratados foram incubados com 3% H₂O₂ em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada em tampão Citrato de Sódio 10mM, pH 6.0, a 100°C, por 20 minutos. Possíveis ligações não específicas, bem como radicais aldeídicos livres, foram bloqueados pela incubação de 5 minutos com dois tampões (PBS contendo 1% de BSA e por PBS contendo 0,1M de Glicina, respectivamente). Posteriormente, os cortes foram incubados por 12 horas, a 8°C, com os anticorpos primários como, por exemplo, anti-KI67 1:200 (Biocare®, CRM325), VEGF 1:100 (BioSB BSB6085®), MMP 2 e 9 (Santa Cruz 8835, Santa Cruz 6840®). Posteriormente, foi realizada a revelação da ligação dos anticorpos primários com DAB (“3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride”) (DAB substrate Kit, BD Pharmigen®), com posterior contracoloração com o corante de Hematoxilina. A seguir, os cortes foram desidratados em bateria crescente de etanol e depois xilol, e as lâminas permanentes foram montadas com Entellan (Merck®) (ANEXO 5).

A leitura das lâminas (dez campos por lâmina) foi realizada por patologista que não conhecia a que grupo o animal pertencia, isto é, ocorreu mediante leitura cega.

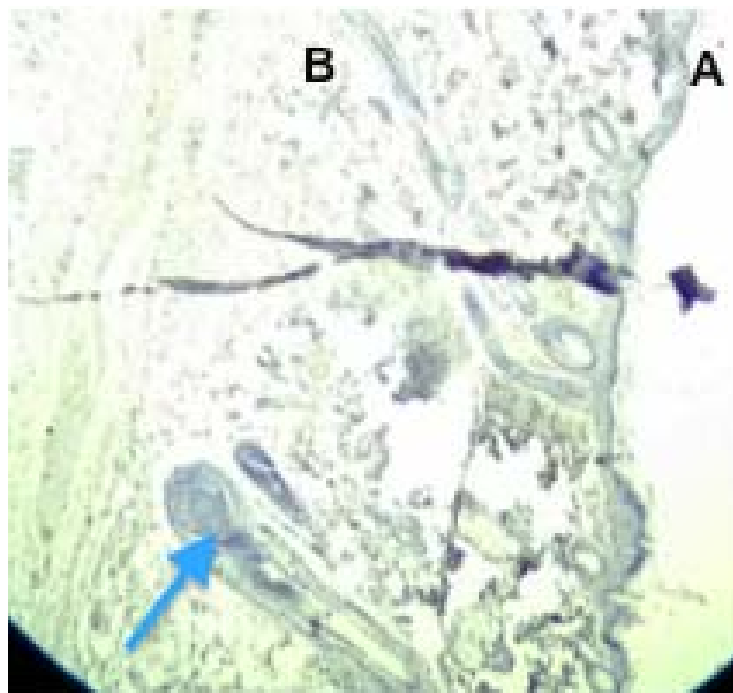


FIGURA 18 – AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PELO VEGF. MARCAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL DE VASOS PELOS ANTICORPOS, EVIDENCIANDO COLORAÇÃO AZULADA. (SETA AZUL): VASO SANGUÍNEO COM GRANDE QUANTIDADE DE FATOR MARCADO PELA IMUNOISTOQUÍMICA.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

3.9.4 Imunoistoquímica para Ki-67

O anticorpo Ki-67 reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular e que, em células continuamente ciclizantes, é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (SCHLUTER *et al.*, 1993). O antígeno definido pelo mAb Ki-67 é uma proteína nuclear humana cuja expressão é estritamente associada com a proliferação celular e que é amplamente utilizado na patologia de rotina como um "marcador de proliferação" para medir a fração de crescimento de células de tumores humanos. Ki-67 detecta uma banda dupla, com pesos moleculares aparentes de 395 e 345 kD em imunomarcações de proteínas a partir de células em proliferação (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

No presente estudo, as lâminas foram submetidas à imunohistoquímica, conforme descrito no item anterior, com utilização de anticorpo para marcação do fator ki-67, altamente expresso após a fase G1 da divisão celular (ANEXO 6).

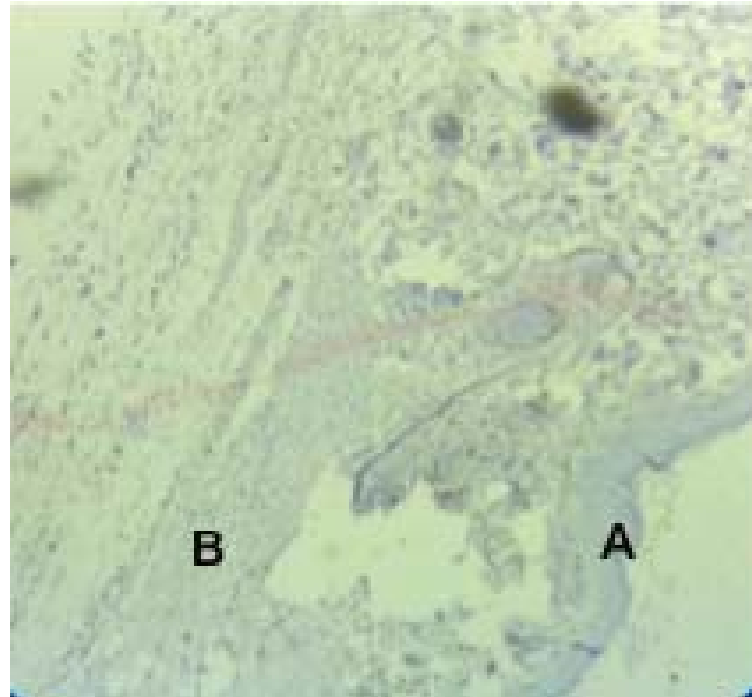


FIGURA 19 – AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PELO Ki-67. MARCAÇÃO DO FATOR DE Ki-67 PELOS ANTICORPOS, EVIDENCIANDO COLORAÇÃO AZULADA. (A): EPIDERME / (B): DERME.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA PATRÍCIA STREMEL (2014)

3.9.5 Imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9

MMP são expressas por células estromais em resposta a estímulos, como também, pela maioria das células inflamatórias que invadem o tecido durante eventos de remodelamento *in vivo*.

Para avaliação da degradação de matriz extracelular e da capacidade de clivar TGF-beta, além de modular positivamente o processo inflamatório, foi optado por avaliar as gelatinases (MMP 2 e 9).

As lâminas foram submetidas à imunohistoquímica, em conformidade com os procedimentos descritos no item anterior, com utilização de anticorpo para marcação de metaloproteinases, especificamente 2 e 9, altamente expresso em atividade de degradação, conforme exemplificado na Figura 18. A avaliação é realizada por concentração da marcação por área (ANEXOS 7 E 8).

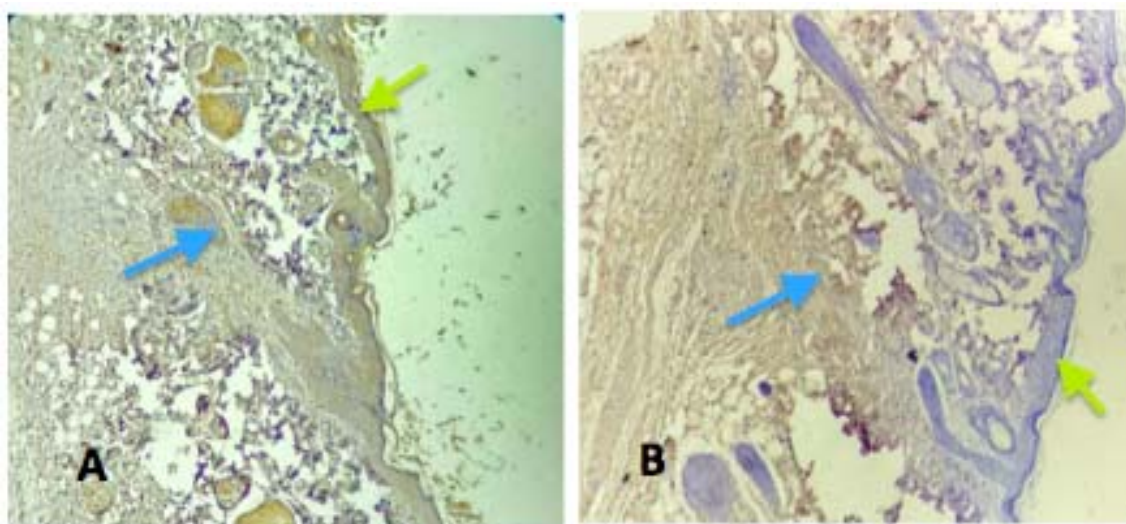


FIGURA 20 – AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE METALOPROTEINASES. MARCAÇÃO DO FATOR DE MMP PELOS ANTICORPOS, EVIDENCIANDO COLORAÇÃO AZULADA. (A): AUMENTO DE 100X. MARCAÇÃO DE MMP-2 / (B): AUMENTO DE 400X. MARCAÇÃO DE MMP-9. (SETA VERDE): EPIDERME, (SETA AZUL): DERME.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA PATRÍCIA STREMEL (2014)

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram tabulados em planilha no programa *Microsoft Office Excel*[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA).

Para a análise das médias e dos desvios padrão dos resultados encontrados, foi realizada análise de variância (ANOVA), e os resultados obtidos foram avaliados em teste “t”.

Para as medidas de tensiometria (com avaliação de tensão máxima das feridas incisionais), quantificação do colágeno total, tipos I e III, e contagem diferencial de células à microscopia, foi utilizado o teste *t* não pareado. Para avaliação estatística dos resultados da imunistoquímica, foi utilizado teste estatístico One way Anova não pareado com teste *t*.

Para os testes realizados, foi utilizado o nível de significância com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA

O valor médio e de desvio padrão da variável “tensão máxima” nos animais sacrificados no 7º dia pós-operatório foi de $2,5 \pm 0,16$ kgf/cm² no grupo GC7; $1,6 \pm 0,23$ kgf/cm² no grupo GR7; $3,0 \pm 0,6$ kgf/cm² nos animais sacrificados no 14º dia pós-operatório no grupo GC14, e de $2,3 \pm 0,5$ kgf/cm² no grupo GR14, havendo significância estatística na comparação dos quatro grupos ($p < 0,05$), conforme evidenciado no Gráfico 1.

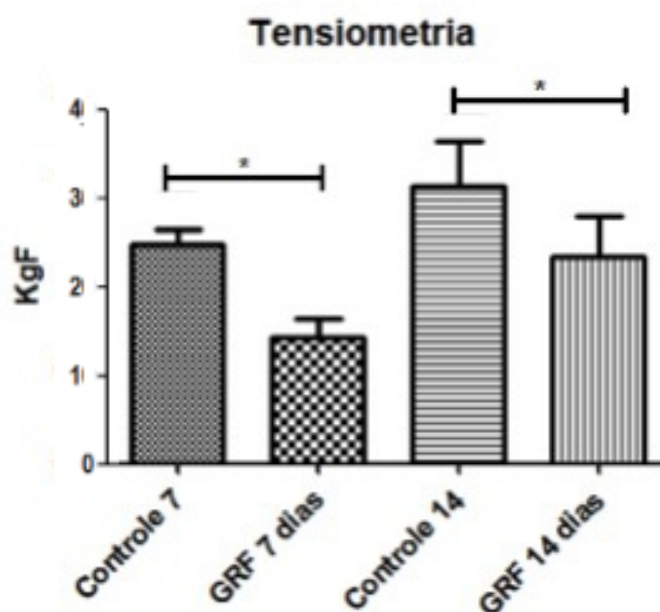


GRÁFICO 1 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE TENSIO METRIA ENTRE OS GRUPOS. HÁ DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS TRATADOS E CONTROLES NAS DUAS FASES DA PESQUISA, COM MAIOR TENSÃO NOS CONTROLES.

4.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

4.2.1 Avaliação de inflamação por HE

Na avaliação das variáveis vistas ao HE, não houve significância estatística entre os grupos em nenhuma das variáveis (proliferação fibroblástica, proliferação vascular e reparação, padronizadas de 0 a 4, conforme previamente descrito), com $p > 0,05$.

Na variável proliferação fibroblástica, os seguintes dados foram encontrados, expostos aqui por média \pm desvio padrão: GC7: $1,2 \pm 0,4$; GR7: $1,5 \pm 0,5$; GC14: $1,4 \pm 0,3$; GR14: $1,7 \pm 0,6$, com $p > 0,05$ (GRÁFICO 2).

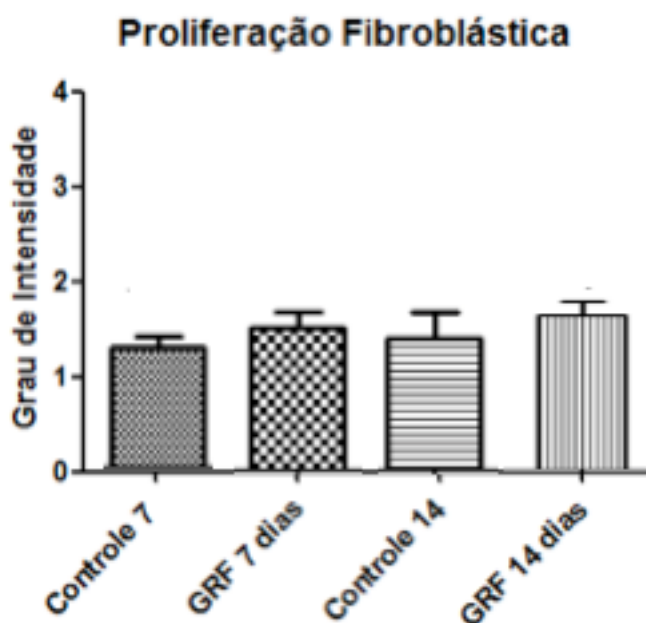


GRÁFICO 2 – RESULTADO DA PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA ENTRE OS GRUPOS. NOTA-SE POUCA DIFERENÇA AVALIADA ENTRE OS GRUPOS NA ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS AO HE.

Na análise da proliferação vascular, os seguintes dados foram encontrados, expostos aqui por média \pm desvio padrão: GC7: $1,2 \pm 0,4$; GR7: $1,6 \pm 0,5$; GC14: $1,3 \pm 0,3$; GR14: $1,5 \pm 0,6$, com $p > 0,05$ (GRAFICO 3).

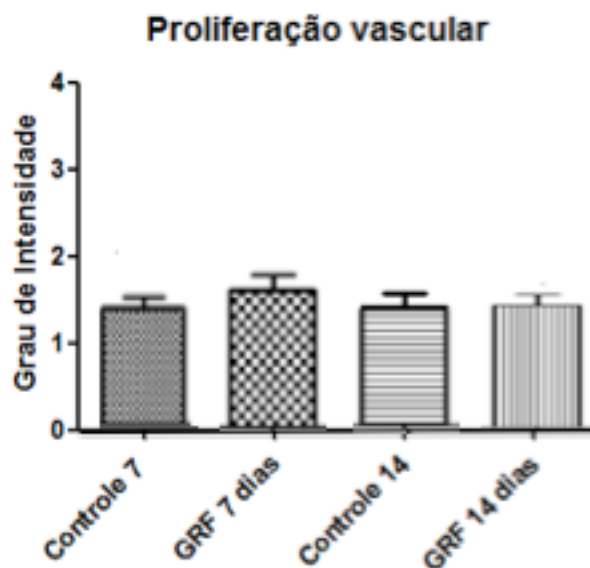


GRÁFICO 3 – RESULTADO DA PROLIFERAÇÃO VASCULAR ENTRE OS GRUPOS. NOTA-SE POUCA DIFERENÇA AVALIADA ENTRE OS GRUPOS NA ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO VASCULAR AO HE.

A reparação apresentou macrófagos em pequeno número e foi similar nos GR7 e GC7 (GC7 $0,9 \pm 0,3$ X GR7 $0,8 \pm 0,2$), sem diferença estatística entre os grupos. O mesmo padrão de resultados foi encontrado nos grupos avaliados no 14º dia, sem diferença estatística entre os grupos (GC14 $0,3 \pm 0,3$ X GR14 $0,4 \pm 0,7$), com $p > 0,05$ (GRÁFICO 4).

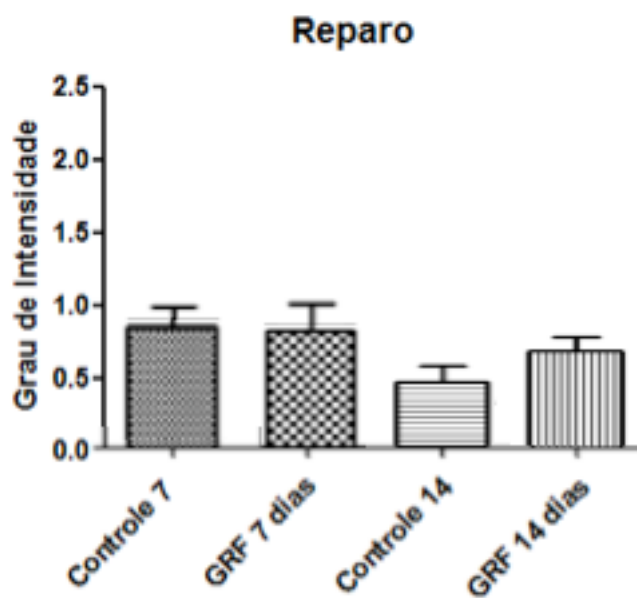


GRÁFICO 4 – RESULTADO DA TAXA DE REPARO ENTRE OS GRUPOS.

No entanto, na visualização das lâminas, houve predominância de células inflamatórias em campo de pequeno e grande aumento nos grupos tratados (FIGURAS 21 E 22).

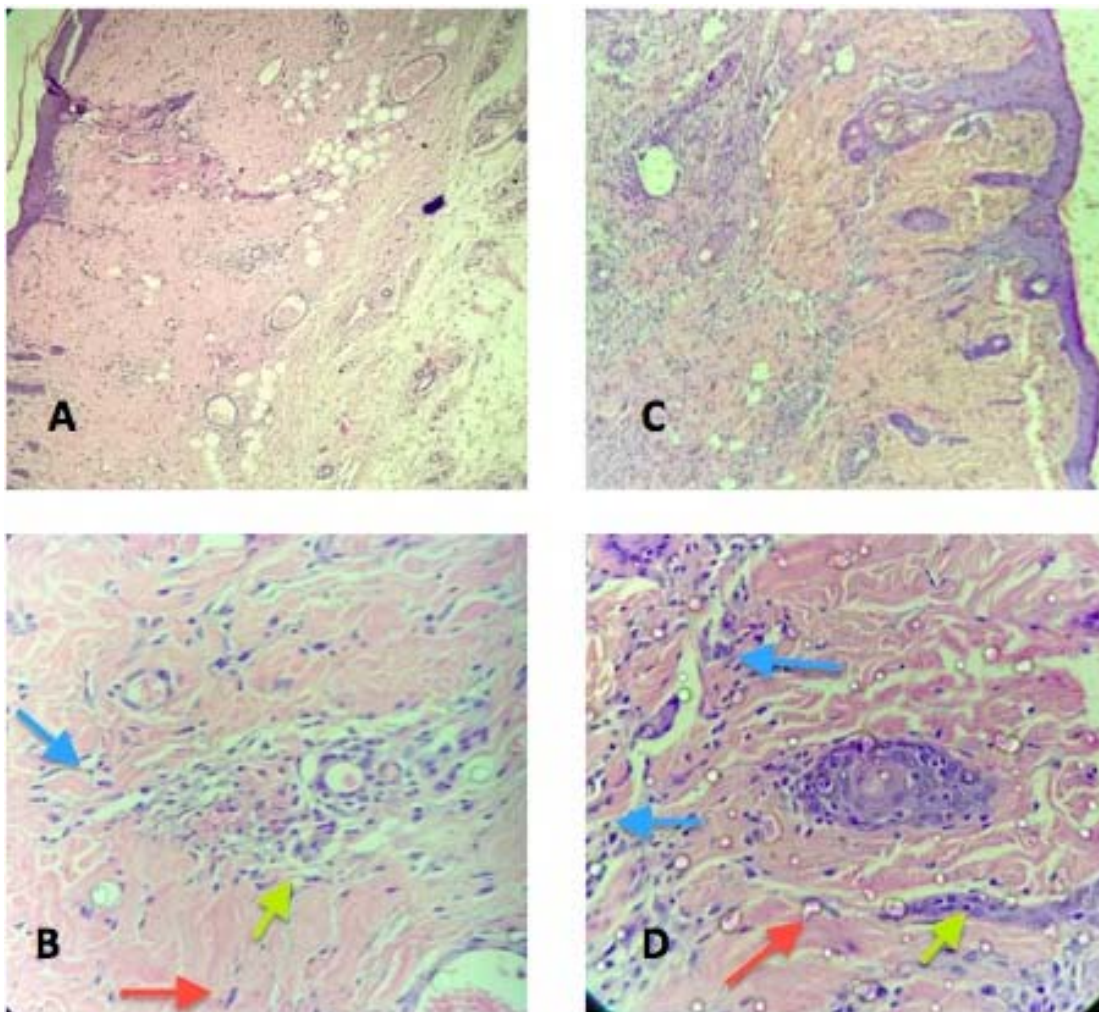


FIGURA 21 – EXEMPLO DE COLORAÇÃO POR HE E A DIFERENÇA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO ENTRE OS GRUPOS APÓS 7 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 7 DIAS (GC7) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 7 DIAS (GR7) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE PREDOMINÂNCIA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NA FIGURA D, COM GRANDE QUANTIDADE DE LINFÓCITOS (SETA AZUL), NEUTRÓFILOS (SETA AMARELA) E FIBROBLASTOS (SETA VERMELHA).

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

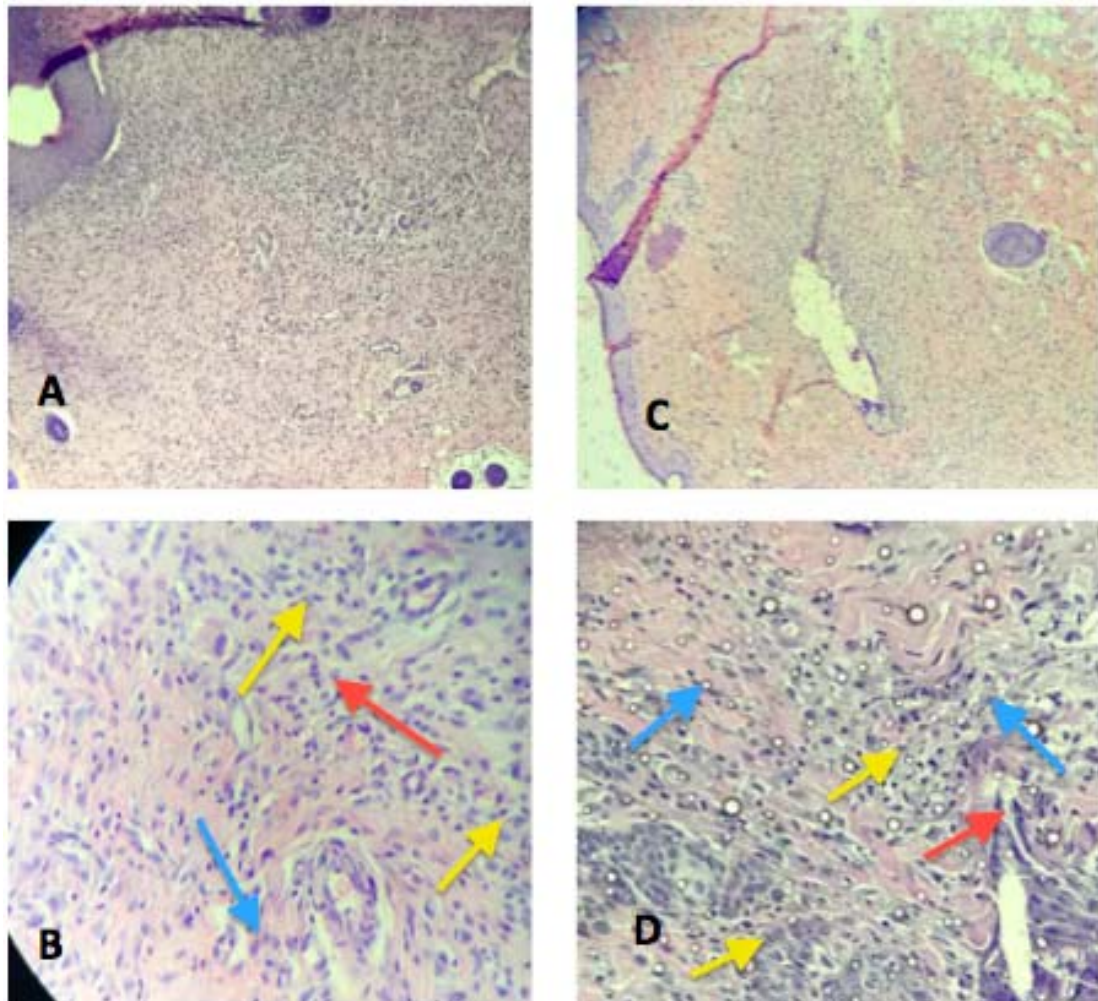


FIGURA 22 – EXEMPLO DE COLORAÇÃO POR HE E A DIFERENÇA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO ENTRE OS GRUPOS APÓS 14 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 14 DIAS (GC14) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE PREDOMINÂNCIA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NA FIGURA D, COM GRANDE QUANTIDADE DE LINFÓCITOS (SETA AZUL), NEUTRÓFILOS (SETA AMARELA) E FIBROBLASTOS (SETA VERMELHA).

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

4.2.2 Avaliação de colágeno

Na análise dos cortes corados pelo *Sirius Red*, as fibras colágenas mais espessas e birrefringentes apresentaram coloração vermelho-alaranjada (colágeno I), e as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes, apresentaram coloração esverdeada (colágeno III). Em cada um dos campos, foi calculado o percentual de área ocupada pelas fibras vermelhas e amarelas (colágeno I) e verdes (colágeno III). Uma vez que os demais tipos de colágeno constituíam frações muito pequenas, para fins práticos, considerou-se a somatória dos colágenos I e III como sendo o colágeno total da cicatriz.

4.2.2.1 Quantificação de colágeno total

A dosagem total de colágeno, representada por colágenos III e I (os tipos predominantes em ferida), apresentou medidas quantificadas em intensidade de marcação por área com os seguintes resultados mostrados em pixels: GC7: 1032 ± 15 ; GR7: $1094,3 \pm 24$; GC14: $993,2 \pm 19$; GR14: 1203 ± 21 .

Na avaliação de colágeno total, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados no 7º dia (GC7: 1032 ± 15 x GR7: $1094,3 \pm 24$, $p > 0,05$). O grupo tratado e avaliado no 14º dia apresentou maior quantidade de colágeno total quando comparado ao grupo controle (GC14: $993,2 \pm 19$ x GR14: 1203 ± 21 , $p < 0,05$), conforme evidenciado no Gráfico 5.

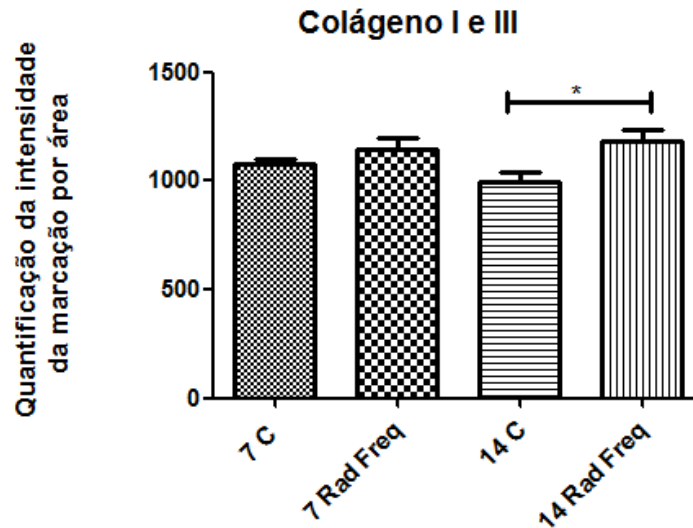


GRÁFICO 5– RESULTADO DO COLÁGENO TOTAL. HÁ MAIOR QUANTIDADE DE COLÁGENO NO GRUPO TRATADO E AVALIADO NO 14º DIA ($p < 0,05$).

4.2.2.2 Quantificação dos colágenos tipo I e tipo III

A quantificação das fibras de colágeno tipos I e III foi realizada pelo cálculo do percentual de área ocupada por cada um dos tipos de fibras.

Os valores de média \pm desvio padrão na avaliação das fibras tipo III foram calculados em pixels e foram de $323,9 \pm 64$ no GC7; $728,8 \pm 117$ no GR7; $102,5 \pm 33$ no GC14; $987,3 \pm 185$ no GR14. Essa avaliação demonstrou predominância de fibras tipo III nos grupos submetidos à radiofrequência, tanto nos ratos que sofreram eutanásia ao 7º dia quanto naqueles que apresentaram maior tempo de efeitos do tratamento e que foram submetidos à eutanásia no 14º dia. A diferença entre os grupos foi significativa, com $p < 0,0001$ (GRÁFICO 6).

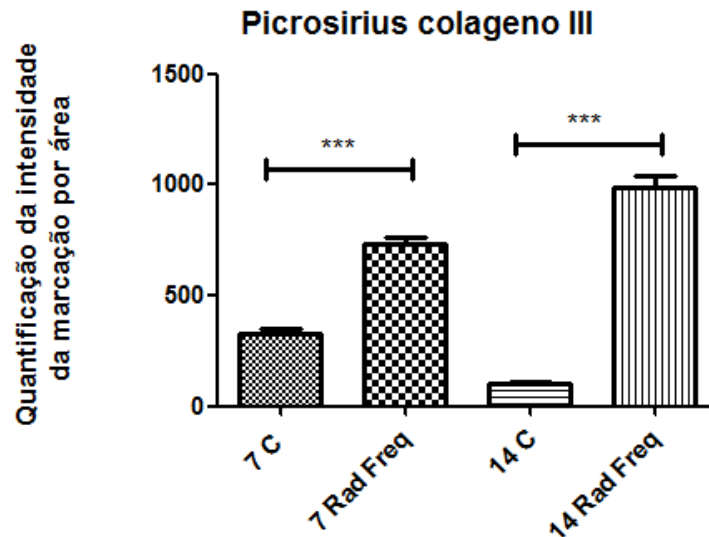


GRÁFICO 6 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE COLÁGENO TIPO III ENTRE OS GRUPOS. HÁ MAIOR CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO TIPO III NOS GRUPOS TRATADOS (GR7 E GR14) QUANDO COMPARADOS COM OS CONTROLES (GC7 E GC14) NAS DUAS FASES DA PESQUISA ($p < 0,0001$).

Os valores de média \pm desvio padrão na avaliação das fibras tipo I foram calculados em pixels e foram $754,3 \pm 99$ no GC7; $414,7 \pm 75$ no GR7; 889 ± 160 no GC14; $193,1 \pm 62$ no GR14. As fibras colágenas tipo I foram predominantes no grupo controle, nas duas fases em que foi realizada eutanásia dos ratos. A concentração de colágeno tipo I foi menor nos grupos tratados (GR7 e GR14) quando comparada dos grupos controles (GC7 e GC14), nas duas fases da pesquisa, com $p < 0,0001$ (GRÁFICO 7).

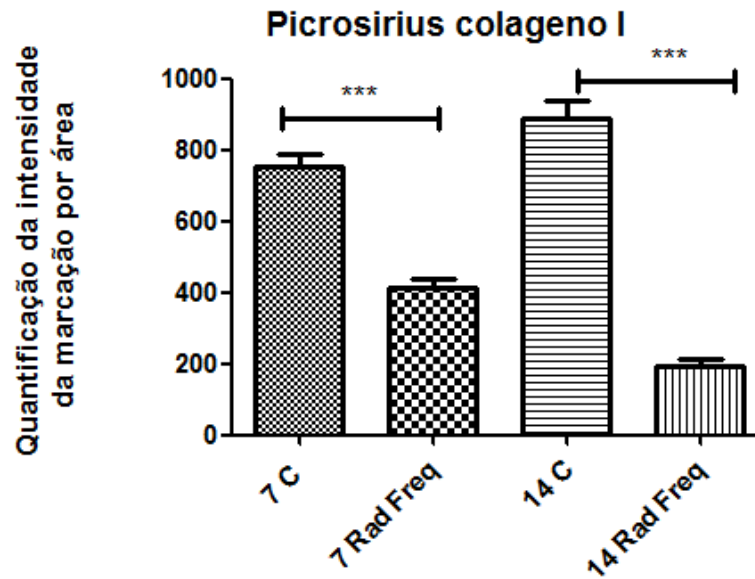


GRÁFICO 7 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I ENTRE OS GRUPOS. HÁ MENOR CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I NOS GRUPOS TRATADOS (GR7 E GR14) QUANDO COMPARADOS COM OS CONTROLES (GC7 E GC14) NAS DUAS FASES DA PESQUISA ($p < 0,0001$).

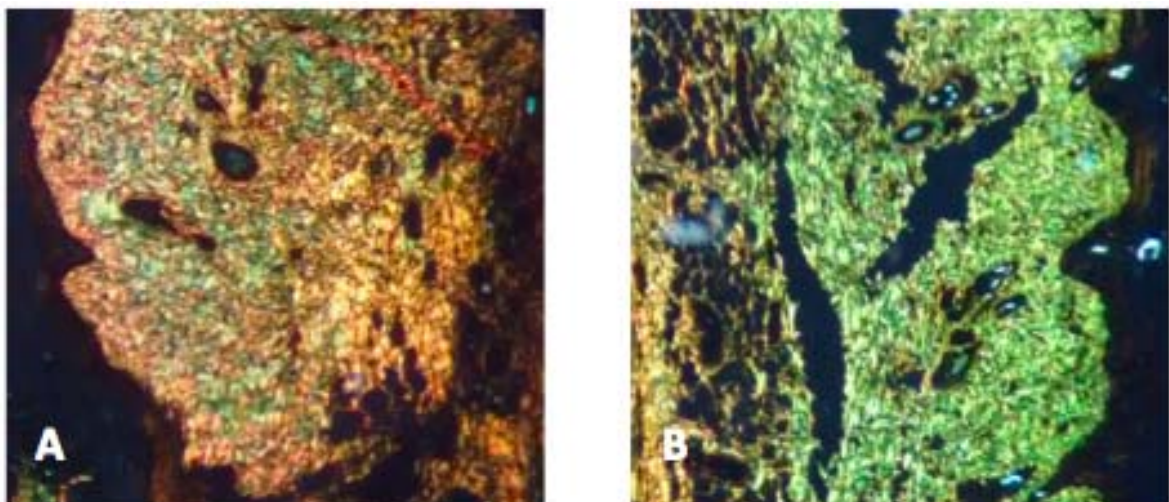


FIGURA 23 – EXEMPLO DE COLORAÇÃO POR PICROSIRIUS E A DIFERENÇA DE FIBRAS DE COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS APÓS 7 DIAS. (A) CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 7 DIAS (GC7) EM 100X DE AUMENTO. (B) CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 7 DIAS (GR7) EM 100X DE AUMENTO. NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE FIBRAS AMARELAS E ALARANJADAS: COLÁGENO TIPO I NO GRUPO CONTROLE (GC7) E A PREDOMINÂNCIA DE FIBRAS VERDES: COLÁGENO TIPO III NO GRUPO TRATADO (GR7).

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

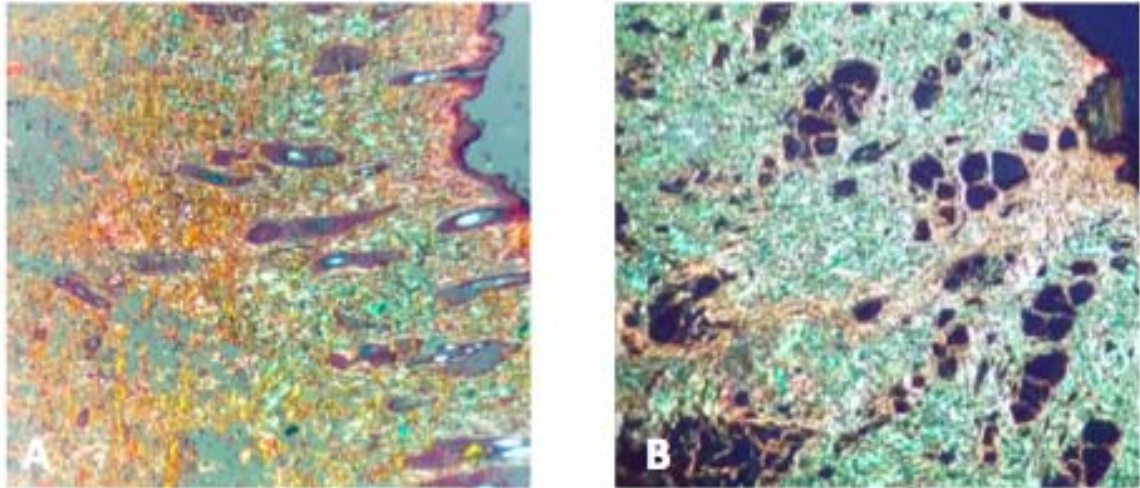


FIGURA 24 – EXEMPLO DE COLORAÇÃO POR PICROSIRIUS E A DIFERENÇA DE FIBRAS DE COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS APÓS 14 DIAS. (A) CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 14 DIAS (GC14) EM 100X DE AUMENTO. (B) CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO. NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE FIBRAS AMARELAS E ALARANJADAS: COLÁGENO TIPO I NO GRUPO CONTROLE (GC14) E A PREDOMINÂNCIA DE FIBRAS VERDES: COLÁGENO TIPO III NO GRUPO TRATADO (GR14).

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

4.2.3 Avaliação de angiogênese por VEGF

A análise da quantificação da intensidade da marcação por anticorpos para VEGF foi realizada pelo cálculo do percentual de área ocupada. Essa avaliação demonstrou predominância de marcação nos grupos submetidos à radiofrequência, tanto nos ratos que sofreram eutanásia ao 7º dia como naqueles que apresentaram maior tempo de efeitos do tratamento, e que foram submetidos à eutanásia no 14º dia. A diferença entre os grupos, no entanto, não foi estatisticamente significativa, com $p = 0,44$ nos grupos avaliados no 7º dia (GR7 e GC7) e $p = 0,24$ nos grupos avaliados no 14º dia (GR714 e GC14) (GRÁFICO 8).

Os valores de média \pm desvio padrão na avaliação de VEGF foram calculados em pixels e foram de 12 ± 8 no GC7; $18,5 \pm 7$ no GR7; $15,7 \pm 7$ no GC14; $19,8 \pm 5$ no GR14.

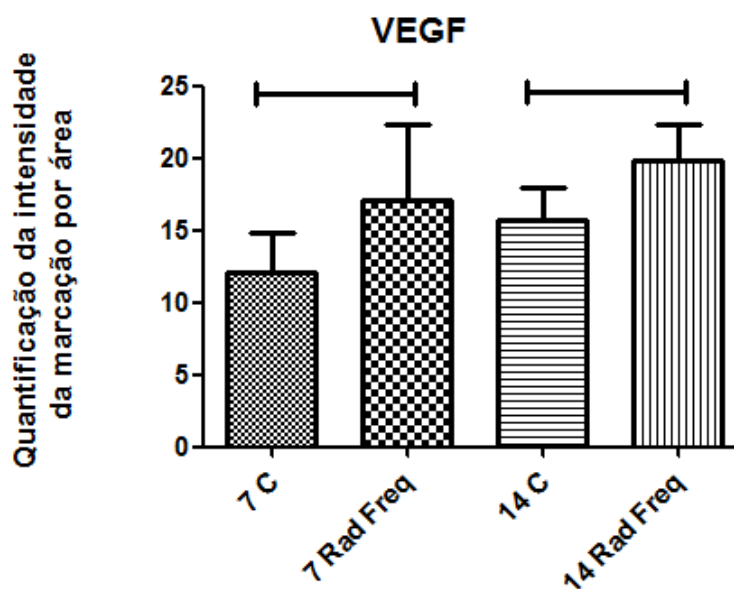


GRÁFICO 8 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE VEGF ENTRE OS GRUPOS. NÃO FOI IDENTIFICADA DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS TRATADOS E CONTROLES NAS DUAS FASES DA PESQUISA.

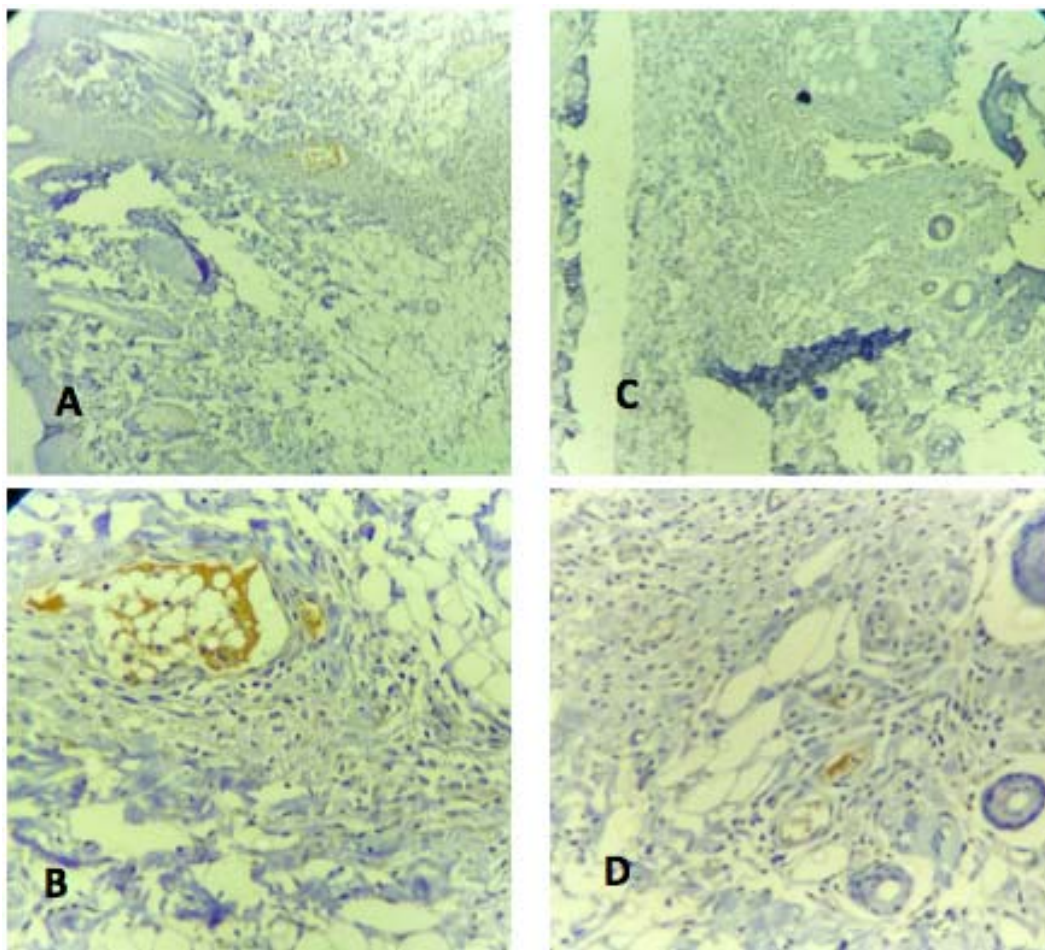


FIGURA 25 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUÍMICA COM MARCAÇÃO DE VEGF APÓS 7 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 7 DIAS (GC7) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 7 DIAS (GR7) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE MARCADORES DE VEGF NO GRUPO TRATADO COM RADIOFREQUÊNCIA

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

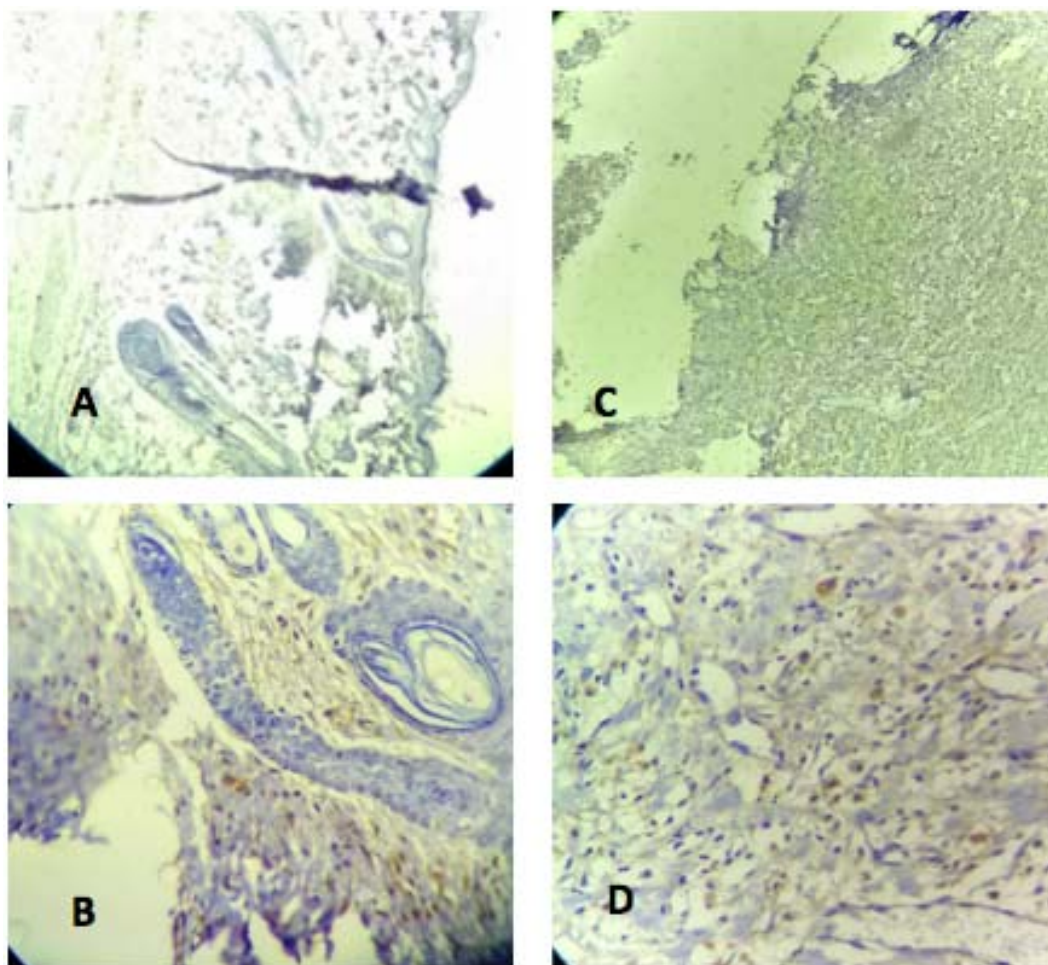


FIGURA 26 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUÍMICA COM MARCAÇÃO DE VEGF APÓS 14 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 14 DIAS (GC14) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE MARCADORES DE VEGF NO GRUPO TRATADO COM RADIOFREQUÊNCIA

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

4.2.4 Avaliação de quantificação por ki-67

O marcador ki-67 (anticorpo) foi avaliado pela quantificação da intensidade da marcação por área avaliada ao microscópio. Os valores de média \pm desvio padrão na avaliação de ki-67 foram calculados em pixels e foram de $13,6 \pm 6$ no GC7; $20,5 \pm 4$ no GR7; $20,2 \pm 12$ no GC14; $33,4 \pm 10$ no GR14, com $p < 0,005$.

No 7º dia pós-operatório, o grupo tratado (GR7) apresentou maior quantidade de ki-67 quando comparado ao grupo controle (GC7) com diferença estatística entre os grupos (GC7 $13,6 \pm 6$ x GR7 $20,5 \pm 4$, $p = 0,0088$). No 14º dia pós-operatório, o grupo tratado (GR14) apresentou maior quantidade de ki-67 quando comparado ao grupo controle (GC14), com diferença estatística entre os grupos (GC14 $20,2 \pm 12$ x GR14 $33,4 \pm 10$, $p = 0,0148$) (GRÁFICO 9).

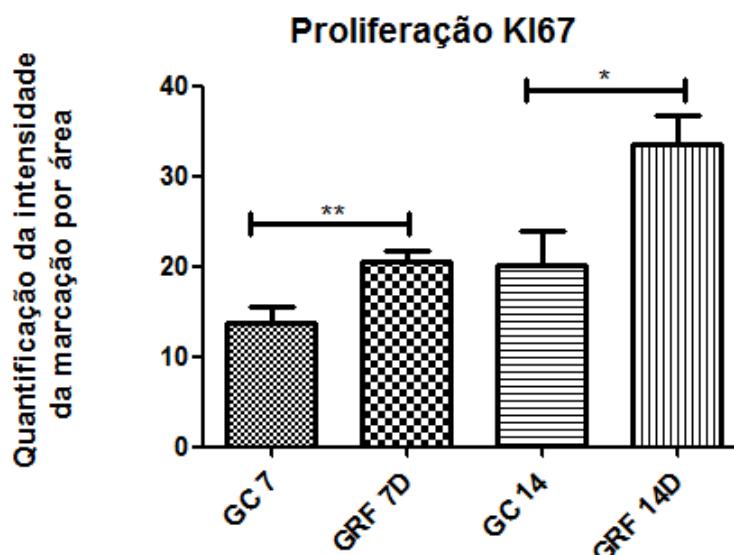


GRÁFICO 9 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MARCAÇÃO DE KI-67 ENTRE OS GRUPOS. OS GRUPOS TRATADOS (GR7 E GR14) APRESENTARAM MAIOR EXPRESSÃO DE KI-67 QUANDO COMPARADOS AOS GRUPOS CONTROLES (GC7 E GC14) NAS DUAS FASES DA PESQUISA ($p < 0,05$).

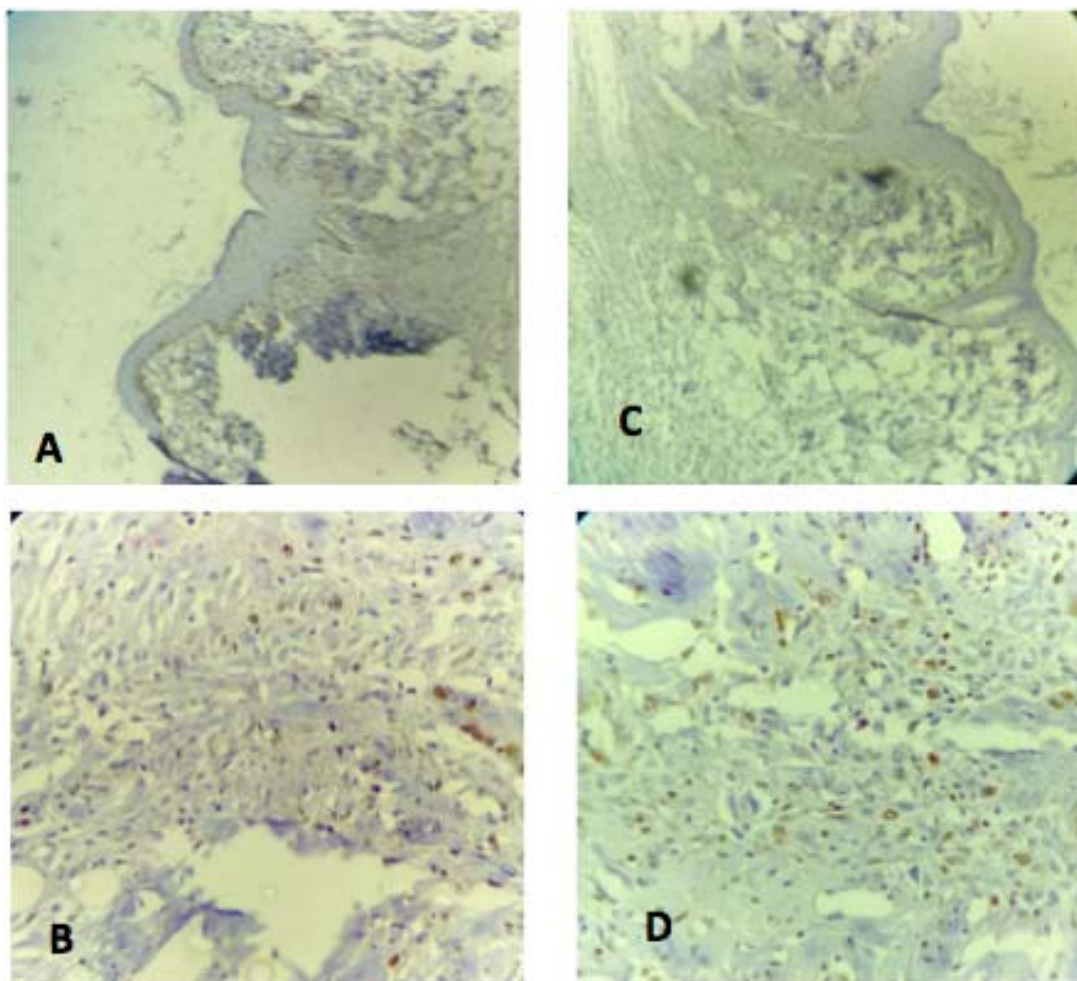


FIGURA 27 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUÍMICA COM MARCAÇÃO DE KI-67 APÓS 7 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 7 DIAS (GC7) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 7 DIAS (GR7) EM 100X DE AUMENTO CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE MARCADORES DE KI-67 NOS GRUPOS SUBMETIDOS À RADIOFREQUÊNCIA, COM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

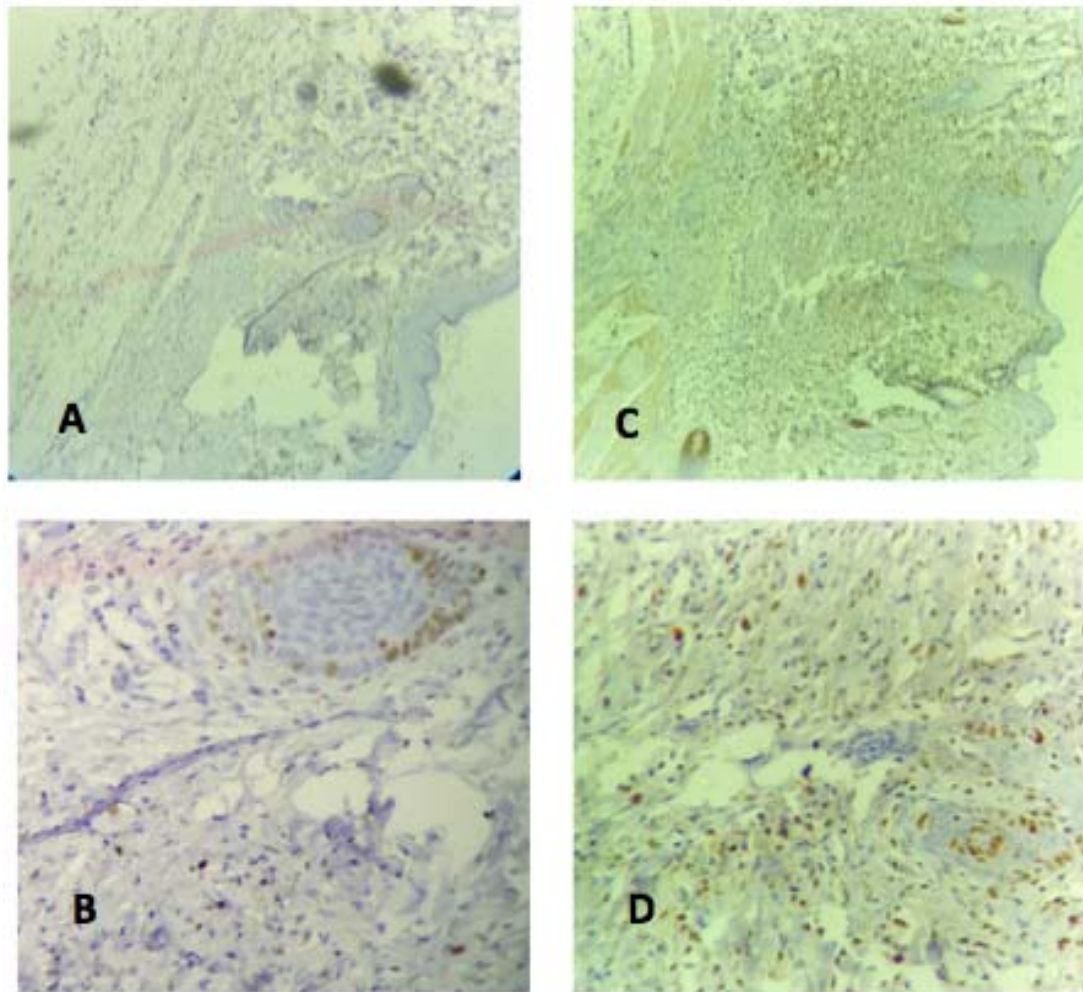


FIGURA 28 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUÍMICA COM MARCAÇÃO DE KI-67 APÓS 14 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 14 DIAS (GC14) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE MARCADORES DE KI-67 NOS GRUPOS TRATADOS COM RADIOFREQUÊNCIA, COM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

4.2.5 Avaliação de metaloproteinases

Na análise dos cortes marcados por imunistoquímica para metaloproteinases, foi realizado o cálculo do percentual de área ocupada pelos anticorpos.

4.2.5.1 Avaliação de metaloproteinase – 2

O marcador de MMP-2 (anticorpo) foi avaliado pela quantificação da intensidade da marcação por área avaliada ao microscópio. No 7º dia pós-operatório, o grupo tratado (GR7) apresentou maior quantidade de marcadores quando comparado ao grupo controle (GC7). Quanto à variável MMP-2, os valores de média \pm desvio padrão no 7º pós-operatório foram calculados em pixels e foram de $7,78 \pm 2$ no GC7; $10,8 \pm 3$ no GR7. O valor estatístico foi marginalmente significativo para as diferenças entre os dois grupos ($p=0,0649$).

No 14º dia pós-operatório, os valores de média \pm desvio padrão foram calculados em pixels e foram de $9,8 \pm 3$ no GC14; 22 ± 4 no GR14. Houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados no 14º dia, com maior expressão no grupo tratado (GR14) em relação ao controle (GC14), com $p=0,0002$ (GRÁFICO 10).

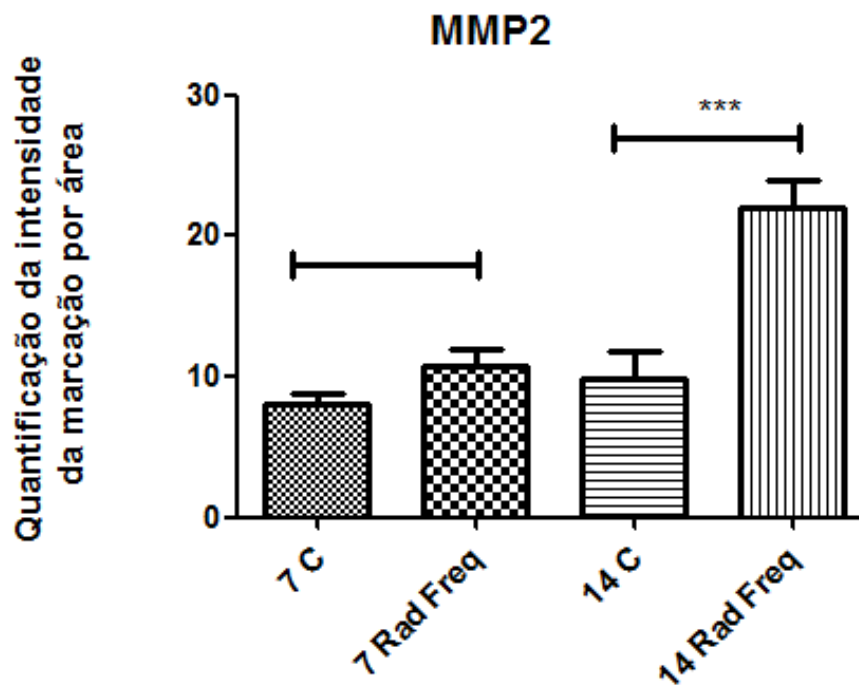


GRÁFICO 10 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MARCAÇÃO DE MMP-2 ENTRE OS GRUPOS. NO 7º DIA, HOVE MAIOR EXPRESSÃO NO GRUPO TRATADO (GR7) EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (GC7). O VALOR ESTATÍSTICO FOI MARGINALMENTE SIGNIFICANTE PARA AS DIFERENÇAS ENTRE OS DOIS GRUPOS ($p = 0,0649$). HÁ DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA ($p < 0,005$) ENTRE OS GRUPOS TRATADOS E CONTROLES AVALIADOS NO 14º DIA (GC14 e GR14), COM PREDOMINÂNCIA DA EXPRESSÃO DE MMP-2 NO GRUPO SUBMETIDO À RADIOFREQUÊNCIA.

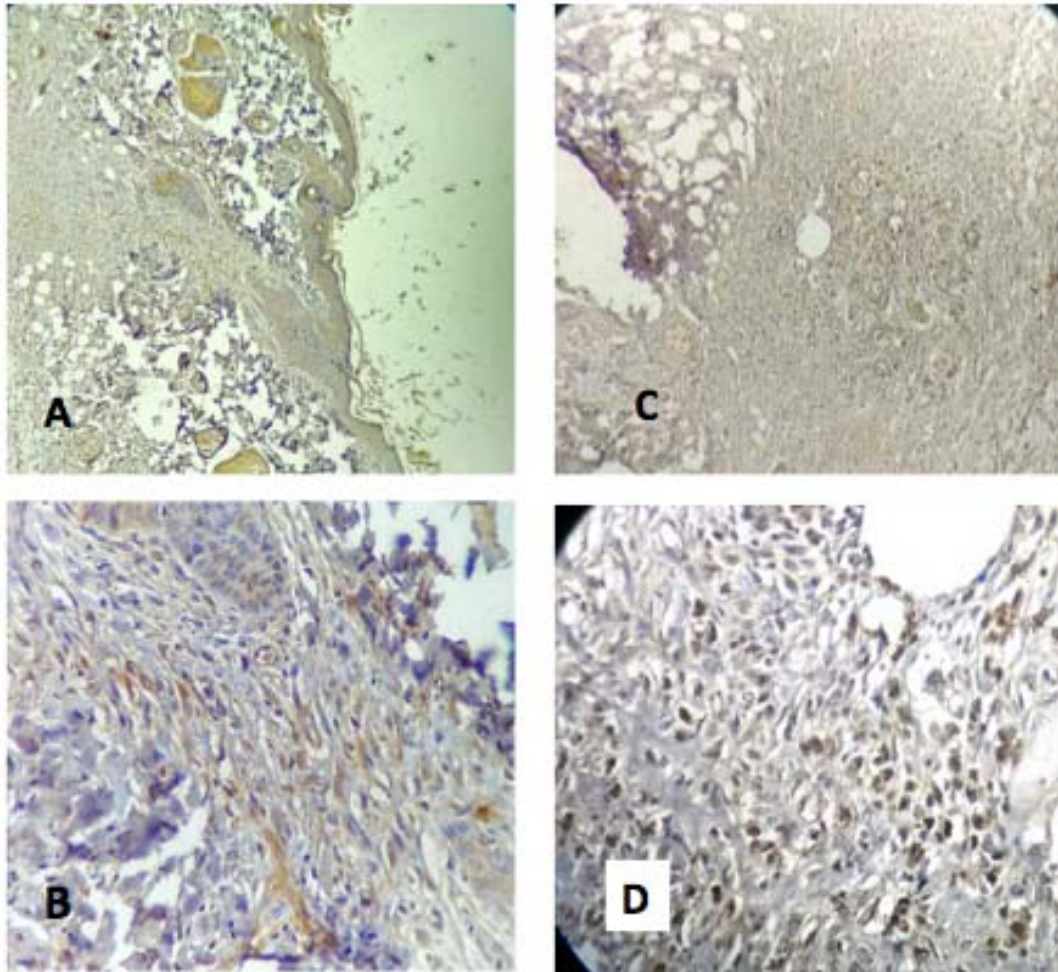


FIGURA 29 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUÍMICA COM MARCAÇÃO DE MMP-2 APÓS 7 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 7 DIAS (GC7) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 7 DIAS (GR7) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE MARCADORES DE MMP-2 NO GRUPO TRATADO COM RADIOFREQUÊNCIA.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

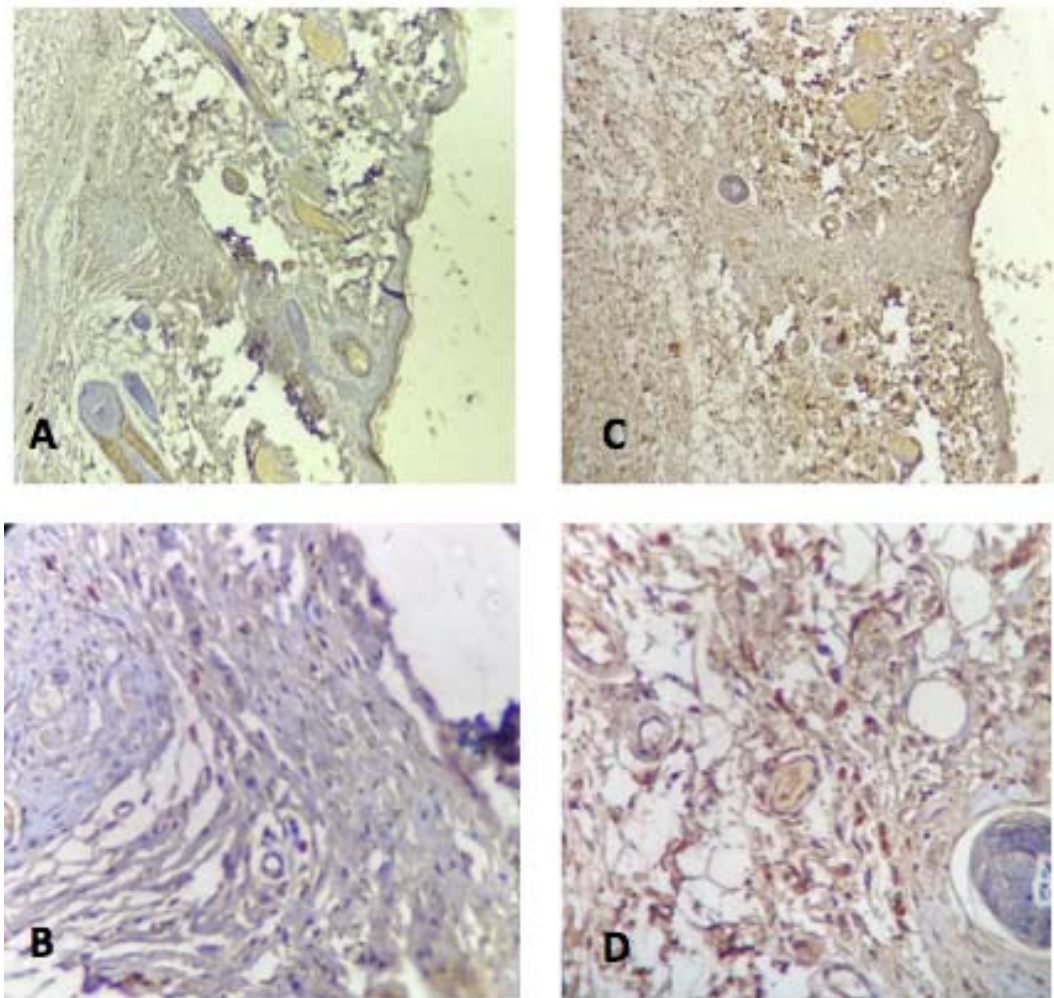


FIGURA 30 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUÍMICA COM MARCAÇÃO DE MMP-2 APÓS 14 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 14 DIAS (GC14) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE MARCADORES DE MMP-2 NO GRUPO TRATADO COM RADIOFREQUÊNCIA, COM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

4.2.5.2 Avaliação de metaloproteinase – 9

A avaliação de MMP-9 foi realizada pela quantificação da intensidade da marcação por área avaliada. Essa avaliação demonstrou maior quantidade de marcadores nos grupos submetidos à radiofrequência, tanto nos ratos que sofreram eutanásia ao 7º dia (GR7) quanto naqueles que apresentaram maior tempo de efeitos do tratamento, e que foram submetidos à eutanásia no 14º dia (GR14). A diferença entre os grupos foi significativa nas duas fases da pesquisa, com $p < 0,005$ (GRÁFICO 11). Os valores de média \pm desvio padrão na avaliação de MMP-9 foram calculados em pixels e foram de $9,9 \pm 4$ no GC7; $21,4 \pm 6$ no GR7; $24,7 \pm 9$ no GC14; $50,3 \pm 12$ no GR14.

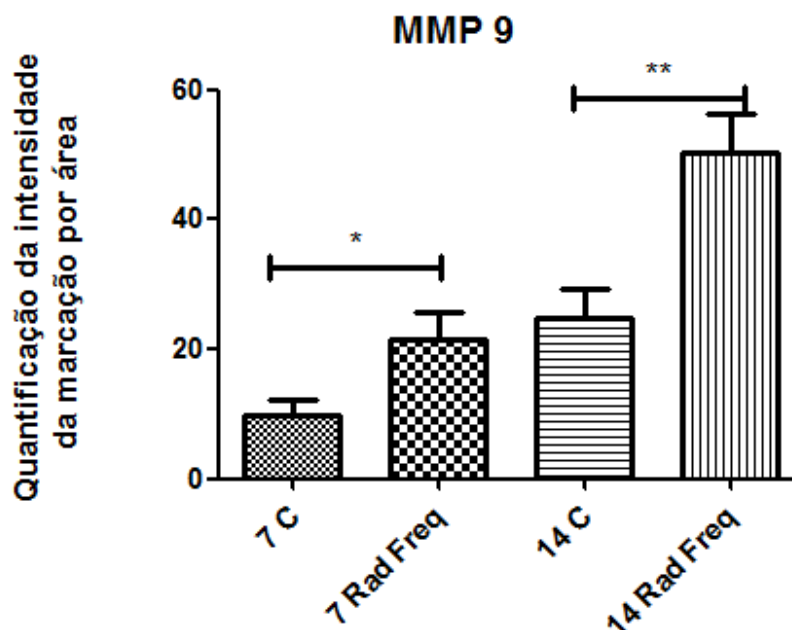


GRÁFICO 11 – RESULTADO DA COMPARAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MARCAÇÃO DE MMP-9 ENTRE OS GRUPOS. HÁ PREDOMINÂNCIA DA EXPRESSÃO DE MARCADOR DE MMP-9 COM DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA ($p < 0,005$) ENTRE OS GRUPOS TRATADOS E CONTROLES AVALIADOS NO 7º E NO 14º DIA.

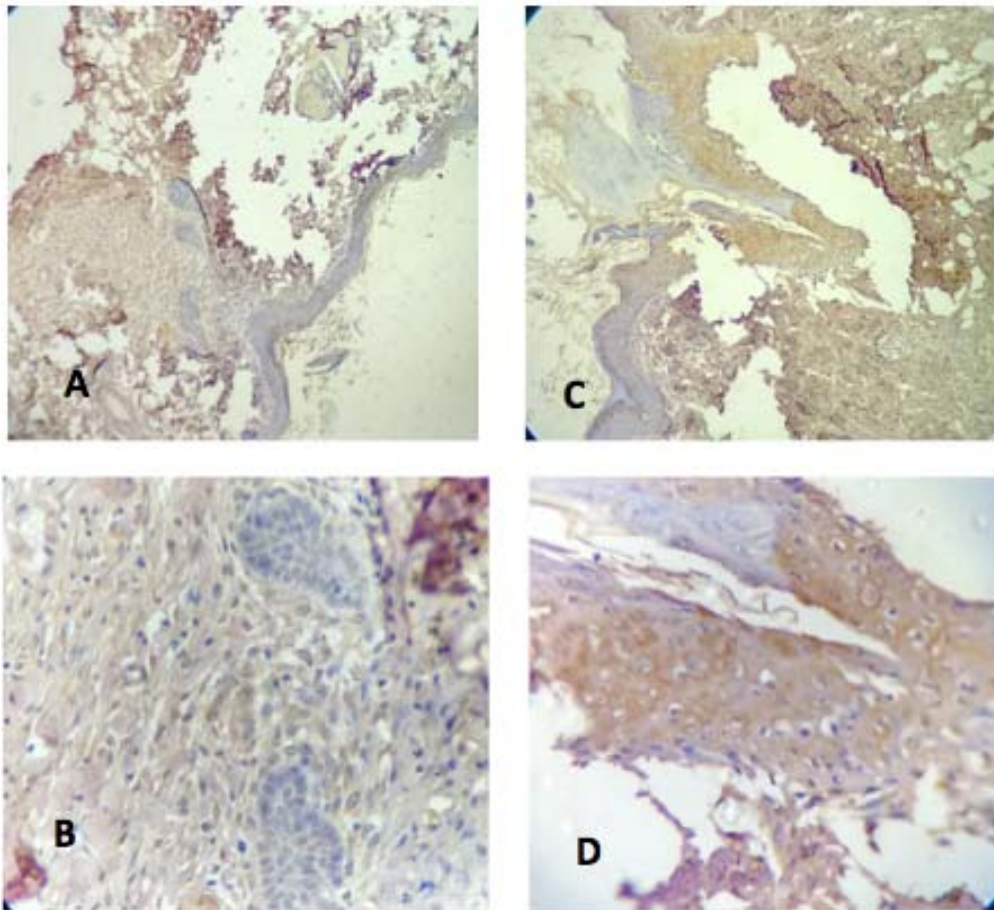


FIGURA 31 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUÍMICA COM MARCAÇÃO DE MMP-9 APÓS 7 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 7 DIAS (GC7) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 7 DIAS (GR7) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE MARCADORES DE MMP-9 NO GRUPO TRATADO COM RADIOFREQUÊNCIA, COM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

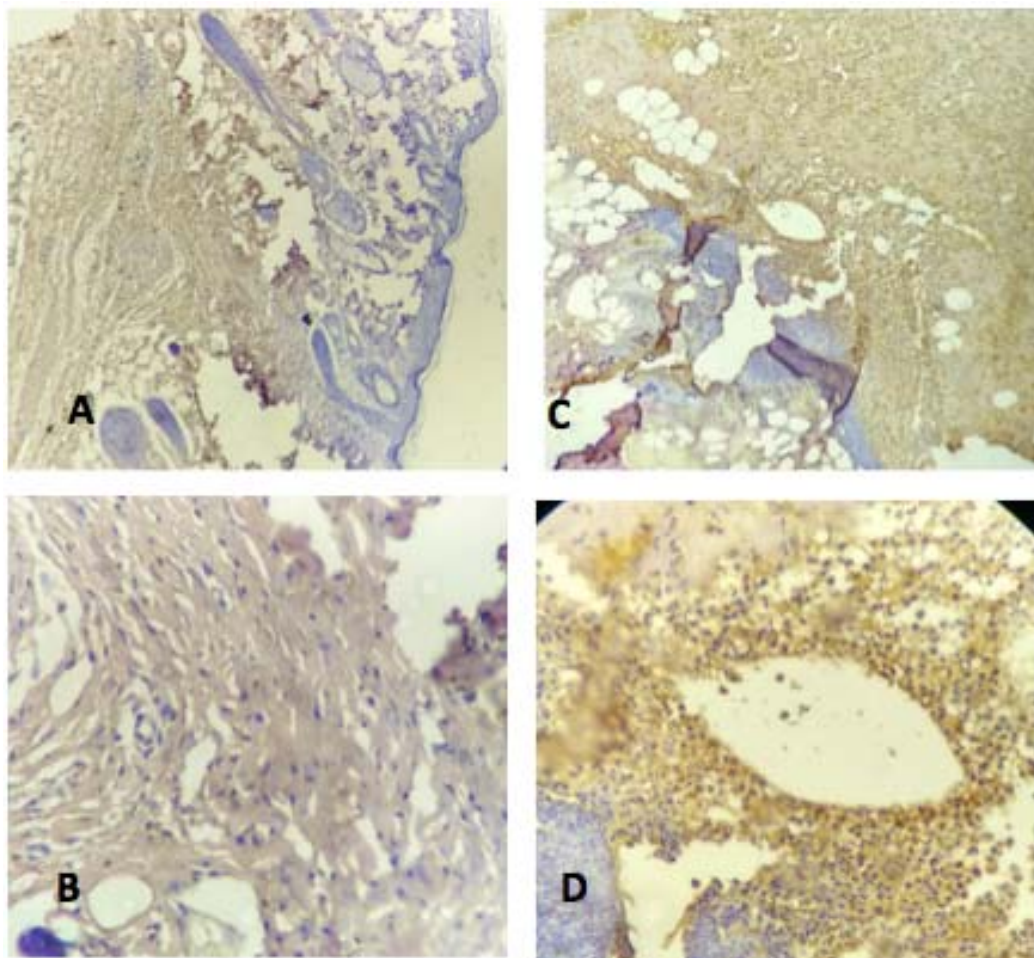


FIGURA 32 – EXEMPLO DE IMUNOISTOQUÍMICA COM MARCAÇÃO DE MMP-9 APÓS 14 DIAS. CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE 14 DIAS (GC14) EM 100X DE AUMENTO (A) E 400 X DE AUMENTO (B). CORTE HISTOLÓGICO DO GRUPO TRATADO COM 14 DIAS (GR14) EM 100X DE AUMENTO (C) E 400 X DE AUMENTO (D). NOTA-SE A PREDOMINÂNCIA DE MARCADORES DE MMP-9 NO GRUPO TRATADO COM RADIOFREQUÊNCIA, COM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS.

FONTE: BIÓLOGO CLEBER RAFAEL COSTA E DRA. PATRÍCIA STREMEL (2014)

4.3 MORBIDADE E MORTALIDADE

Segundo avaliação clínica, nenhuma ferida incisional apresentou complicações como deiscência, infecção ou hematoma. Dois óbitos ocorreram devido à depressão respiratória relacionada a procedimento anestésico, não sendo realizada reposição.

4.4 RESUMO DOS RESULTADOS

Registrou-se o óbito de dois animais, por alterações anestésicas, não sendo feita a reposição dos animais. Nos grupos tratados com radiofrequência, a variável “tensão máxima” foi maior nas feridas dos grupos controles, tanto no 7º quanto no 14º pós-operatório ($p < 0,05$).

Na avaliação dos parâmetros histológicos corados por HE (proliferação fibroblástica, proliferação vascular e reparação tecidual), não houve diferença estatística entre os grupos.

Nos dois tempos avaliados, observou-se maior concentração de colágeno nas feridas tratadas, com diferença estatística no grupo que foi submetido à radiofrequência no 14º dia (GR14) ($p < 0,001$). A concentração de colágeno III foi maior nas feridas dos dois grupos tratados, tanto nos tempos iniciais (7º dia) ($p < 0,0001$) quanto no maior tempo de exposição nas feridas (14º dia) ($p < 0,0001$). A concentração de colágeno I mostrou-se maior no grupo controle nos dois tempos examinados e mostrou-se significativa no 7º dia ($p < 0,0001$) e no 14º dia ($p < 0,0001$).

O processo de angiogênese não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p = 0,44$ no 7º dia e $p = 0,2443$ no 14º dia).

A proliferação celular foi avaliada pelo ki-67, com maior expressão no grupo tratado, com significância no 7º dia ($p < 0,05$) e no 14.º dia ($p < 0,05$).

A degradação celular e de MEC e a ativação do processo inflamatório também foram avaliadas pelas metaloproteinases, apresentando predominância de expressão nos grupos tratados, com diferença estatística no 14º dia para MMP-2 ($p < 0,001$), e no 7º ($p < 0,05$) e 14º dias ($p < 0,05$) para

MMP-9. A avaliação no 7º dia para MMP-2 foi marginalmente significativa para as diferenças entre os dois grupos ($p=0,0649$).

QUADRO 3 – RESUMO DOS RESULTADOS

Variáveis	GC7	GR7	GC14	GR14	<i>p</i>
Tensão máxima (kgf)	2,5 ± 0,16	1,6 ± 0,23	3,0 ± 0,6	2,3 ± 0,5	S ($p<0,05$)
Proliferação fibroblástica (HE)	1,2 ± 0,4	1,5 ± 0,5	1,4 ± 0,3	1,7 ± 0,6	NS
Proliferação vascular (HE)	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,5	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,6	NS
Reparo (HE)	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,7	NS
Colágeno total (Picrosirius)	1032 ± 15	1094,3 ± 24			NS
			993,2 ± 19	1203 ± 21	S ($p<0,001$)
Colágeno III (Picrosirius)	323,9 ± 64	728,8 ± 117			S ($p<0,001$)
			102,5 ± 33	987,3 ± 185	
Colágeno I (Picrosirius)	754,3 ± 99	414,7 ± 75			S ($p<0,001$)
			889 ± 160	193,1 ± 62	
VEGF (pixel)	12 ± 8	18,5 ± 7			NS
			15,7 ± 7	19,8 ± 5	
Ki-67 (pixel)	13,6 ± 6	20,5 ± 4			S ($p<0,05$)
			20,2 ± 12	33,4 ± 10	
MMP-2 (pixel)	7,78 ± 2	10,8 ± 3			S ($p<0,05$)
			9,8 ± 3	22 ± 4	
MMP-9 (pixel)	9,9 ± 4	21,4 ± 6			S ($p<0,05$)
			24,7 ± 9	50,3 ± 12	

S = estatisticamente significativo / NS: não significativo estatisticamente

5 DISCUSSÃO

5.1 DO MÉTODO

A escolha do modelo animal foi o rato Wistar como modelo experimental do estudo da cicatrização, por ser um animal de pequeno porte, resistente a infecções e à manipulação, de fácil acesso, com padronização em relação à idade, peso, gênero, alimentação, alojamento e por ser um modelo experimental reprodutível. O modelo animal deve permitir avaliar os fenômenos biológicos para que possam ser comparados aos fenômenos biológicos em humanos. Apesar de algumas diferenças, busca-se um modelo que possa ser facilmente acessível e com evoluções em pesquisa semelhantes às alterações avaliadas em humanos, com facilidade de reprodução destas alterações (FERREIRA *et al.*, 2005). A pele de rato, por exemplo, apresenta diferença em relação à humana com a ausência de um limite definido entre derme papilar e derme reticular. Apesar dos achados histológicos diferentes da pele humana (a derme do rato é mais espessa e não apresenta tecido gorduroso subcutâneo nem tela muscular subcutânea), os vasos sanguíneos responsáveis pela irrigação cutânea são subdérmicos em ambos e mostram reposta semelhante a estímulos, o que permite sua utilização como modelo animal (SANTOS *et al.*, 2006). Experimentos de cicatrização em modelo animal propiciam um método com o qual pode-se estudar as interações complexas que ocorrem *in vivo* nos humanos (LI *et al.*, 2011).

O processo de cicatrização experimental de feridas cutâneas tem sido amplamente utilizado, buscando melhorar o conhecimento do reparo tecidual em humanos, porém é necessária cautela na interpretação dos resultados, devido principalmente às diferenças fundamentais entre animais e seres humanos (ONO *et al.*, 2015). Apesar de muitas espécies mamíferas simularem a cicatrização humana, nenhuma realmente se iguala. Na pele de rato não há uma definição entre derme papilar e derme reticular; não ocorrem as cicatrizes hipertróficas ou queloides; a derme é mais espessa e não

apresenta tecido gorduroso subcutâneo; porém os vasos sanguíneos apresentam as mesmas modificações de perfusão de macro e microvascularização que ocorre em humanos (GALIANO *et al.*, 2004).

De acordo com os resultados do estudo de Carvalho (2011), no qual foram analisados os efeitos da aplicação de 3 sessões de radiofrequência em dias alternados na pele de 20 ratos, percebeu-se que, sete dias após as aplicações, o colágeno sofreu alterações tornando-se mais denso, com a presença de neocolagênese, e após quinze dias não ocorreu importante formação neocolágena. Porém, a neoeslastogênese estava presente no 15º e 21º dia (DE CARVALHO *et al.*, 2011). Foi observado processo inflamatório intenso, com a presença de alterações epiteliais e áreas edematosas após 24 horas da aplicação de RF, resultados semelhantes aos de Almeida e Brown (2005), que mostram que a RF gera inflamação no tecido aplicado com a formação de edema, aumento da vascularização e do fluxo sanguíneo, podendo gerar o aparecimento de hemorragias, e a estimulação de fibroblastos (BROWN e DE ALMEIDA, 2005). Por estas razões, a escolha de 3 aplicações de RF e avaliação de seus efeitos em 14 dias após a aplicação, apresentou-se aceitável e adequada como modelo animal para este experimento.

No presente estudo, optou-se por avaliar feridas incisivas pois se assemelham à realidade de pós-operatórios de Cirurgia Plástica nos quais são utilizadas terapias para modular o processo de cicatrização. A radiofrequência monopolar foi escolhida como terapia modificadora do processo cicatricial por ser amplamente utilizada, por apresentar bons resultados no tratamento de flacidez de pele, e por estimular o aumento do número de fibroblastos e de fibras de colágeno, os quais tem grande influência na cicatrização. Além disso, apesar de adequado para análise do processo de contração cicatricial, o modelo excisional não é ideal para avaliação do ganho de resistência mecânica pela ferida, principalmente em modelos experimentais agudos (DAVIDSON, 2001).

Os experimentos que avaliam a cicatrização necessitam de métodos de quantificação para que terapias e grupos diferentes possam ser avaliados e

comparados. Os principais parâmetros utilizados são: clínicos, mecânicos, bioquímicos e histológicos. A preferência é pela utilização do método mecânico, bioquímico ou combinação de ambos (HENDRIKS e MASTBOOM, 1990). De forma experimental, os métodos para avaliação do processo cicatricial podem ser dividido em três formas: determinação da força necessária para rompimento de tecidos cicatrizados, observação do índice de fechamento das feridas (quando excisionais) e a quantificação de um dado evento durante o processo de reparo (GOODSON 3rd *et al*, 1987).

Para avaliar este estudo, foram utilizados parâmetros clínicos (avaliação da ferida e suas complicações), método mecânico (força tênsil) e método histológico (utilização de polarização para densitometria do colágeno, análise de atividade inflamatória, angiogênese e apoptose, e análise microscópica com avaliação da reepitelização das feridas e contagem celular da derme em reconstituição), visando ampliar a avaliação dos resultados.

5.2 DOS RESULTADOS

Este estudo examinou quantitativamente o efeito a curto prazo do tratamento de RF sobre a resposta inflamatória e a morfologia das fibrilas de colágeno da derme de ratos *in vivo*, utilizando animais, em um período de 7 e 14 dias. Na presente investigação, não foram observadas complicações pós-operatórias significativas que possam influenciar negativamente os resultados. A realização de estudo piloto, prévio ao início do estudo, para treinamento de todos os passos do trabalho, pode ter influenciado positivamente, diminuindo a chance de vieses. Além disso, a experiência na linha de pesquisa em cicatrização de órgãos e tecidos, do Programa de Pós-Graduação da UFPR, com o uso de um modelo conhecido para investigação de cicatrização também trouxe benefícios e representou um bom andamento da pesquisa.

A radiofrequência é indicada em todos os processos degenerativos que impliquem na diminuição ou no retardo do metabolismo, irrigação e nutrição,

sendo, em geral, utilizada em doenças crônicas. Também é indicada por provocar aumento da vasodilatação e na irrigação abaixo da zona tratada, além da oxigenação, da nutrição dos tecidos e da neocolagênese (CARVALHO *et al.*, 2003). Essas alterações foram identificadas na pesquisa, porém, as consequências do aumento do processo inflamatório é que devem ser discutidas.

Os efeitos térmicos da radiofrequência provocam a desnaturação do colágeno, promovendo imediata e efetiva contração de suas fibras, ativando fibroblastos, provocando a neocolagenização e levando à reorganização das fibras colágenas e ao subsequente remodelamento do tecido (NASCIMENTO *et al.*, 2008). O aumento do número de fibras de colágeno parece ser benéfico para a formação de cicatrizes. Nesse estudo, o número total de fibras de colágeno foi maior no grupo submetido à radiofrequência, porém, com maior número de fibras tipo III presentes nesses grupos, quando em comparação com os grupos controles. No entanto, a presença de maior número de fibras imaturas pode ser considerada ruim, já que confere menor resistência e aspecto imaturo da cicatriz, e merece ser objeto de estudo a longo prazo.

Atualmente, os métodos de tração são considerados padrão-ouro para a avaliação da cicatrização de feridas, sendo que os parâmetros geralmente avaliados são a força máxima, a força de ruptura e a tensão máxima do corpo de prova (DAVIDSON, 1998). Na avaliação de tensão máxima, foi observada menor tensão/resistência da cicatriz no grupo submetido à RF nas duas fases avaliadas no estudo. A maior quantidade de fibras tipo III, consideradas imaturas no processo cicatricial, pode ter levado ao rompimento mais fácil e precoce da ferida, quando analisada por tensiometria. A maior tensão vista nos grupos avaliados no 14º dia (GC14 e GR14), quando comparada aos grupos submetidos à análise no 7º dia (GC7 e GR7), é explicada por maior concentração de colágeno total nessa fase do processo inflamatório.

O processo inflamatório mostrou-se maior nos grupos tratados com radiofrequência e esse fator mostrou agir por longo tempo, mesmo alguns dias após a última sessão da terapia, como identificado por maior expressão de atividade inflamatória nos grupos que sofreram eutanásia no 14º dia.

Houve maior expressão de parâmetros inflamatórios nos grupos tratados, com diferença significativa na expressão das metaloproteinases e do ki-67, e no atraso da maturação das fibras de colágeno.

A avaliação histológica do processo cicatricial foi feita com coloração pela Hematoxilina-Eosina, por ser uma técnica simples e classicamente utilizada 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. Nos parâmetros inflamatórios identificados no método de HE, não houve diferença estatística, provavelmente pela avaliação em graus e a grande variação entre os animais do mesmo grupo. Além disso, por ser um método de avaliação que não é considerado padrão-ouro, algumas diferenças podem ser encontradas. Contudo, ao avaliar as lâminas em pequeno (100x) e grande (400x) aumento, há diferença visível.

O sistema vascular se desenvolve e amadurece mediante dois processos fundamentais: a vasculogênese e a angiogênese, sendo que a primeira está relacionada a fase embriológica. A angiogênese, por outro lado, ocorre tanto no embrião como no adulto, e refere-se à formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasculatura pré-existente, seja sob condições fisiológicas ou patológicas. Os exemplos de angiogênese fisiológica incluem a formação de novos vasos sanguíneos no processo de desenvolvimento, na cura de feridas e no ciclo reprodutor feminino adulto; e é fortemente relacionada aos sinais pró-angiogênicos e anti-angiogênicos. Em contraste, a angiogênese patológica é observada numa grande gama de doenças humanas, incluindo o crescimento de tumores, retinopatia diabética e inflamação crônica. A regulação da angiogênese é influenciada por um grande número de fatores de crescimento, entre os quais o VEGF tem sido identificado como um dos fatores mais proeminentes, atuando principalmente através do seu receptor endotelial VEGFR2 (ZENG *et al.*, 2014). Devido ao seu uso consagrado em estudos (KATO *et al.*, 2011), foi optado por realizar a pesquisa de angiogênese e a relação com inflamação com a pesquisa de anticorpos anti-VEGF em imunistoquímica. O estudo mostrou aumento

percentual de angiogênese mensurada por VEGF nos grupos tratados com radiofrequência, apesar desta diferença não ter se apresentado estatisticamente significante.

A proteína nuclear Ki-67 é expressa em células em proliferação. Neste estudo, a marcação positiva por anticorpos foi facilmente identificada e quantificada na derme (miofibroblastos, fibroblastos, leucócitos e células endoteliais) e na epiderme (queratinócitos da camada basal) das feridas. O aumento da proliferação celular foi verificado em células da derme e epiderme, assim como maior deposição de colágeno foi identificada no grupo experimental. Baseado nestes achados, é sensato relacionar o estímulo pela radiofrequência com maior processo inflamatório e estimulação e proliferação celular. Houve maior expressão entre os grupos submetidos a RF quando avaliados por Ki-67. A maior expressão de Ki-67 pode ser explicada por aumento da divisão celular com o aumento da resposta inflamatória. Pensou-se em medir o PCNA (antígeno nuclear associado ao ciclo celular), outro marcador de proliferação celular, mas esse é expresso desde a fase G0 da divisão celular, o que não traria benefícios na avaliação da maturação/evolução do processo inflamatório.

As proteínas da metaloproteinase da matriz (MMP) são envolvidas na degradação da matriz extracelular (MEC) em processos fisiológicos normais, tais como desenvolvimento embrionário, reprodução, e remodelação de tecidos, bem como em processos de doença, tais como artrite e metástases. A degradação da MEC por MMP afeta o comportamento celular mediante alterações nas integrinas de ligação das células, na liberação de fatores de crescimento relacionados a MEC, através da geração de produtos de degradação da MEC, e revelando os locais de ligação nas moléculas da MEC. Por exemplo, MMP-2 está envolvida na degradação do colágeno tipo I e pode revelar um sítio de ligação enzimático, anteriormente inacessível, e estimular apoptose em células malignas (FRESKOS *et al.*, 2013). Acredita-se que as células inflamatórias também apresentam o mesmo mecanismo de ação. A MMP-2 também desempenha um papel importante na formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), bem conhecido em neoplasias e presente em processos inflamatórios. A angiogênese é essencial para a progressão de

tumores e para restauração no processo inflamatório. Além disso, têm sido sugeridos que a MMP-9 e outras MMPs desempenham também um papel complexo na angiogênese através da promoção de mobilização de VEGF e gerando fatores anti-angiogênicos (MOOK *et al.*, 2004).

A maioria das MMP são secretadas como pro-proteínas inativas, que são ativadas quando clivadas por proteases extracelulares. A maior expressão de MMP identificou maior resposta inflamatória local e sua presença é um *turnover* positivo para o processo inflamatório, estimulando localmente as células inflamatórias e fibroblastos. O aumento das MMP, indicativo de maior degradação celular, pode indicar o por quê da menor maturação celular e da resolução do processo inflamatório, com menor número de fibras colágenas tipo I e menor maturação celular.

O aumento na firmeza dos tecidos é bem observado na pele, porém pouco estudado em feridas. A RF inicia remodelação progressiva do colágeno ao longo das semanas e induz a produção de novo colágeno, resultando em redução na flacidez da pele. A terapia de radiofrequência modula a resposta inflamatória, com maior deposição de fibras colágenas, no entanto com atraso na maturação do processo inflamatório e aumento do número médio de vasos neoformados. Vários estudos têm demonstrado que o tratamento com RF provoca a contração do colágeno por um efeito eletrotérmico na derme (ATIYEH e DIBO, 2009; KÜMPERS *et al.*, 2005; KWAK *et al.*, 2013; VÉLEZ-DÍAZ-PALLARÉS *et al.*, 2015).

Os resultados indicam aumento do total de colágeno e sugere-se maior angiogênese nos casos tratados, com aumento do processo inflamatório. No entanto, na avaliação detalhada destes parâmetros, percebe-se que maior atividade inflamatória não trouxe benefícios na cicatrização. Com a avaliação de parâmetros de evolução do processo inflamatório e em comparação com o grupo exposto mais tempo aos efeitos da radiofrequência, percebe-se atraso na evolução do processo inflamatório e na maturação de fibras colágenas, que influenciou na resistência da ferida medida por tensiometria, o que provavelmente resultará em cicatriz de pior aspecto.

Diante dos resultados, conclui-se que os efeitos do tratamento são de no mínimo sete dias e que há permanência de efeitos da radiofrequência no tecido colágeno até 14 dias. A RF monopolar em feridas incisadas, na dose de 3 aplicações em dias alternados foi nociva ao processo cicatricial, com aumento da atividade inflamatória e diminuição da resistência dos tecidos. Novos estudos com outros tipos de animais que tenham maior semelhança com o tecido humano e peso corporal maior devem ser realizados, buscando confirmar estes achados para que se possa basear cientificamente a dosimetria da radiofrequência e facilitar o trabalho em nível clínico dos médicos e fisioterapeutas, promovendo maior segurança para a saúde do paciente e maior eficácia nos resultados.

5.3 PERSPECTIVAS

Algumas questões merecem ser objeto de novas pesquisas. Neste estudo foi desenvolvido um modelo experimental com uma ferida linear caracterizando uma cicatriz nova. Desta forma, cicatrizes antigas ou que sejam modelos de feridas excisionais, semelhantes a úlceras, por exemplo, não puderam ser analisadas e o efeito da RF neste tipo de cicatriz não pode ser avaliado.

Utilizou-se a padronização da aplicação da RF baseada em aplicações clínicas e em protocolos em humanos, devido ao pequeno número de estudos experimentais. Essa frequência/dose aumentou o processo inflamatório. Em novos estudos, com o objetivo de estudar mais profundamente o uso desta terapêutica, deve-se pesquisar novas formas de feridas e cicatrizes e, se possível, tratar mais grupos com frequências e doses diferentes de RF, tentando desta forma avaliar se há diferença de protocolos de estudos clínicos.

Tendo o conhecimento das inúmeras variáveis físicas relacionadas com a aplicação da RF no reparo tecidual e sua repercussão direta sobre a aplicação clínica, sugere-se extensão dos estudos.

6 CONCLUSÕES

Em relação aos efeitos da radiofrequência, foi possível concluir que, após três aplicações de radiofrequência em dias alternados utilizado temperatura de 38°C no ventre de ratos Wistar, as feridas tratadas com radiofrequência apresentaram aumento no processo inflamatório agudo que foi mantido por maior tempo que o fisiológico, provavelmente por influência da radiofrequência.

A aplicação de radiofrequência nessa dose em feridas incisivas de ratos Wistar resulta em:

- 1- prolongamento do tempo do processo inflamatório agudo;
- 2- redução da tensão máxima da ferida submetida à radiofrequência;
- 3- retardo no processo de maturação de colágeno;
- 4- maior expressão de fatores pró-inflamatórios, de degradação de membrana celular e de proliferação celular (MMP, Ki-67).

A radiofrequência aumentou o processo inflamatório e retardou a maturação do processo cicatricial na dose utilizada na fase cicatricial analisada.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, R.; IBRAHIM, T. S. Proposed radiofrequency phased-array excitation scheme for homogenous and localized 7-Tesla whole-body imaging based on full-wave numerical simulations. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 57, n. 2, p. 235–242, 2007. Wiley Online Library.
- ALAM, M.; WARYCHA, M. Complications of lasers and light treatments. **Dermatologic Therapy**, v. 24, n. 6, p. 571–580, 2011.
- ALDEN, P. B.; LIPS, E. M.; ZIMMERMAN, K. P.; et al. Chronic venous ulcer: Minimally invasive treatment of superficial axial and perforator vein reflux speeds healing and reduces recurrence. **Annals of Vascular Surgery**, v. 27, n. 1, p. 75–83, 2013.
- ALSTER, T. S.; LUPTON, J. R. Nonablative cutaneous remodeling using radiofrequency devices. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 5, p. 487–491, 2007.
- ATIYEH, B. S.; DIBO, S. A. Nonsurgical nonablative treatment of aging skin: radiofrequency technologies between aggressive marketing and evidence-based efficacy. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 33, n. 3, p. 283–294, 2009. Springer.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização : uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 27–51, 2005.
- BELENKY, I.; MARGULIS, A.; ELMAN, M.; BAR-YOSEF, U.; PAUN, S. D. Exploring channeling optimized radiofrequency energy: a review of radiofrequency history and applications in esthetic fields. **Advances in therapy**, v. 29, n. 3, p. 249–66, 2012.
- BOCK, V.; DE NORONHA, A. F. Estimulação da neocolagênese através da radiofrequência. **Revista Eletrônica Saúde e Ciência**, v. III, n. 02, p. 7–17, 2013.
- BOVIE, W. T. Radiations and their effects. **Oxford Med**, v. 1, p. 339, 1920.
- BRAVO, B. S. F.; ISSA, M. C. A.; DE SOUZA MUNIZ, R. L.; TORRADO, C. M. Tratamento da lipodistrofia ginoide com radiofrequência unipolar: avaliação clínica, laboratorial e ultrassonográfica. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 5, n. 2, p. 138–144, 2013.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 1e–S–32e–S, 2006.
- BROWN, A.; DE ALMEIDA, G. O. Novel Radiofrequency (RF) Device for Cellulite & Body Reshaping Therapy. accentfatblaster.com.au, 2005.
- BUMB, R. A.; PRASAD, N.; KHANDELWAL, K.; et al. Long-term efficacy of single-dose radiofrequency-induced heat therapy vs. intralesional antimonials for cutaneous leishmaniasis in India. **British Journal of Dermatology**, v. 168, n. 5, p. 1114–1119, 2013.
- BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. **Revista brasileira de fisioterapia (São Carlos (São Paulo, Brazil))**, v. 14, n. 1, p. 45–51, 2010.

CAMPOS, A. C. L.; GROTH, A. K.; BRANCO, A. B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 11, n. 3, p. 281–8, 2008.

CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A. L. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in tumor. **Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, 2009

CARREL, A. **La technique opératoire des anastomoses vasculaires et de la transplantation des viscères**. Association typographique, 1902.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **The Journal of experimental medicine**, v. 15, n. 5, p. 516–528, 1912.

DE CARVALHO, G. F.; DA SILVA, R. M. V; DE MESQUITA FILHO, J. J. T.; et al. Avaliação dos efeitos da radiofrequência no tecido conjuntivo. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 68, n. 11, 2011.

CARVALHO, P. DE T. C.; MAZZER, N.; SIQUEIRA, J. F.; FERREIRA, V. J.; SILVA, I. S. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 4, n. 4, p. 253–258, 2003.

CHOI, S.; CHEONG, Y.; SHIN, J.-H.; et al. Short-term nanostructural effects of high radiofrequency treatment on the skin tissues of rabbits. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 923–933, 2012. Springer.

CHOI, S.; SHIN, J. H.; NAM, S. W.; et al. Mid-long term effect of non-ablative high radiofrequency therapy on the rabbit dermal extracellular matrix. **Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS**, p. 3761–3764, 2013.

CLARK, R. **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. Springer Science & Business Media, 1996.

COSTA E OLIVEIRA, D. A. G.; DUTRA, E. A.; SANTORO, M.; KEDOR, H.; ERM PROTETORES SOLARES, R. Pele. **Cosmetics e Toiletries**, v. 16, n. 2, p. 68–72, 2003.

DAVIDSON, J. M. Animal models for wound repair. **Archives of Dermatological Research**, v. 290, n. 1, p. S1-S11, 1998.

DUARTE, A. B.; MEJIA, D. P. M. A utilização da Radiofrequência como técnica de tratamento da flacidez corporal. <http://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/19/35>, 2009

DYE, D. E.; MEDIC, S.; ZIMAN, M.; COOMBE, D. R. Melanoma biomolecules: independently identified but functionally intertwined. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. September, p. 252, 2013.

ELMAN, M.; VIDER, I.; HARTH, Y.; GOTTFRIED, V.; SHEMER, A. Non-invasive therapy of wrinkles and lax skin using a novel multisource phase-controlled radio frequency system. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 12, n. 2, p. 81–86, 2010.

FÁTIMA, L. A.; PAPA, P. C. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF):Regulação Transcricional e Pós-Transcricional. **Revista de Biologia**, v. 4, 2010.

FERNANDES, A.S; MENDONÇA, W.C.M. Efeitos da Radiofrequência no tecido colágeno. [Trabalho de conclusão de curso]. Rio Grande do Norte: Universidade Potiguar, 2009.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. [Experimental models in research]. **Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 20 Suppl 2, p. 28–34, 2005.

FRANCO, W.; KOTHARE, A.; RONAN, S. J.; GREKIN, R. C.; MCCALMONT, T. H. Hyperthermic injury to adipocyte cells by selective heating of subcutaneous fat with a novel radiofrequency device: Feasibility studies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 361–370, 2010.

FRESKOS, J. N.; ASMELASH, B.; GASTON, K. R.; et al. Design and synthesis of MMP inhibitors with appended fluorescent tags for imaging and visualization of matrix metalloproteinase enzymes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 20, p. 5566–5570, 2013.

GALIANO, R. D.; MICHAELS, V.; DOBRYANSKY, M.; LEVINE, J. P.; GURTNER, G. C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 4, p. 485–492, 2004.

GERDES, J.; SCHLUETER, C. L. ; DUCHROW, M.; WOHLBERG, C.; GERLACH, C.; STAHLER, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E., FLAD, H. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **American Journal of Pathology**, v. 238, p. 867-873, 1991.

GOODSON 3RD, W. H.; LOPEZ-SARMIENTO, A.; JENSEN, J. A.; et al. The influence of a brief preoperative illness on postoperative healing. **Annals of surgery**, v. 205, n. 3, p. 250, 1987.

GUNES, T.; BILGIC, E.; ERDEM, M.; et al. Effect of radiofrequency microtenotomy on degeneration of tendons: An experimental study on rabbits. **Foot and Ankle Surgery**, v. 20, n. 1, p. 61–66, 2014.

HASSUN, K. M.; BAGATIN, E.; VENTURA, K. F. Radiofrequência e infravermelho:[revisão]. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, v. 65, n. esp, p. 18–20, 2008.

HENDRIKS, T.; MASTBOOM, W. J. B. Healing of experimental intestinal anastomoses. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 33, n. 10, p. 891–901, 1990.

JANIS, J.E.; HARRISON, B.H. Wound Healing: Part I. Basic Science. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 2, p. 199-207, 2014.

JANIS, J.E.; HARRISON, B.H. Wound Healing: Part II. Clinical Applications. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 3, p. 383-392, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447–455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. **Histologia Básica**, ed, v. 9, p. 303–309, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447–455, 1979.

KATO, S.; FUKAI, A.; TAKEDA, H.; et al. Immunohistological analysis of extracted anterior cruciate ligament graft impinged against posterior cruciate ligament. **Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy & Technology**, v. 3, n. 1, p. 26, 2011.

KAVITHA, O.; THAMPAN, R. V. Factors influencing collagen biosynthesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n. 4, p. 1150–1160, 2008.

KNOLMAYER, T. J.; CORNELL, K. M.; BOWYER, M. W.; MCCULLOUGH, J. S.; KOENIG, W. Imbrication versus excision for fascial healing. **The American Journal of Surgery**, v. 172, n. 5, p. 506–511, 1996.

KÜMPERS, P.; PÖTZL, W.; HEUSNER, T.; STEINBECK, J.; SZUWART, T. Cellularity and apoptosis after radiofrequency-induced shrinkage of collagenous tissue: assessment of postoperative immobilization using an in vivo rabbit model. **Acta Orthopaedica**, v. 76, n. 4, p. 487–95, 2005.

KWAK, H.-W.; CHOI, S.; CHEONG, Y.; et al. Postoperative effect of radiofrequency treatments on the rabbit dermal collagen fibrillary matrix. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 3, p. 219–224, 2013.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2007.

LI, Q.; KAO, H.; MATROS, E.; et al. Pulsed radiofrequency energy accelerates wound healing in diabetic mice. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 127, n. 6, p. 2255–2262, 2011.

LOLIS, M. S.; GOLDBERG, D. J. Radiofrequency in Cosmetic Dermatology: A Review. **Dermatologic Surgery**, v. 38, n. 11, p. 1765–1776, 2012.

LU, Y.; HAYASHI, K.; EDWARDS, R. B.; et al. The effect of monopolar radiofrequency treatment pattern on joint capsular healing. In vitro and in vivo studies using an ovine model. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 28, n. 5, p. 711–719, 2000.

MADHOK, B. M.; VOWDEN, K.; VOWDEN, P. New techniques for wound debridement. **International Wound Journal**, v. 10, n. 3, p. 247–251, 2013.

MATTOS, R.; FILIPPO, A.; TOREZAN, L.; CAMPOS, V. Fontes de energia não laser no rejuvenescimento: parte II. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 1, n. 2, p. 80–86, 2009.

MIRASTSCHIJSKI, U.; IMPOLA, U.; KARSDAL, M. A.; SAARIALHO-KERE, U.; ÂGREN, M.S. Matrix Metalloproteinase Inhibitor BB-3103 Unlike the Serine Proteinase Inhibitor Aprotinin Abrogates Epidermal Healing of Human Skin Wounds *Ex Vivo*. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, n.1, p. 55-64, 2002.

MOOK, O. R. F.; FREDERIKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. F. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1705, n. 2, p. 69–89, 2004.

NASCIMENTO, D. S.; NIWA, A. B. M.; OSÓRIO, N. Radiofrequência e infravermelho. **Revista Brasileira de Medicina**, 2008.

ONO, M. C. C.; DA SILVA FREITAS, R.; OKAWA, L.; et al. Influência de dieta imunomoduladora na cicatrização cutânea em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 29, n. 3, p. 431–37, 2015.

PARKS, W. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, n. 6, p. 423–432, 1999.

PAUL, M.; MULHOLLAND, R. S. A new approach for adipose tissue treatment and body contouring using radiofrequency-assisted liposuction. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 33, n. 5, p. 687–694, 2009.

PETERSON, J. D.; PALM, M. D.; KIRIPOLSKY, M. G.; GUIHA, I. C.; GOLDMAN, M. P. Evaluation of the effect of fractional laser with radiofrequency and fractionated radiofrequency on the improvement of acne scars. **Dermatologic Surgery**, v. 37, n. 9, p. 1260–1267, 2011.

PLÁSTICA PLEUX. Fases do processo de cicatrização. Disponível em: www.plasticaplexus.com.br/new/cicatrizacao.php#sthash.ZNst5wVq.dpbs. Acessado em 12 mar. 2015.

SANTOS, M. F. D. S.; CZECHKO, N. G.; NASSIF, P. A. N.; et al. Evaluation of the use of raw extract of *Jatropha gossypifolia* L. in the healing process of skin wounds in rats. **Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 21 Suppl 3, n. Suplemento 3, p. 2–7, 2006.

SASAKI, K.; MURAKAMI, T.; KAWASAKI, M. The cell cycle associated a change of the Ki-67 nuclear antigen expression. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 860–865, 1992.

SCHLUTER, C.; DUCHROW, M.; WOHLBERG, C.; et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 3, p. 513–522, 1993.

SCHNEIDER, M. R. MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 1, p. 22–28, 2012.

SCHNEIDER, M.; STRACKE, F.; HANSEN, S.; SCHAEFER, U. F. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. **Dermato-endocrinology**, v. 1, n. 4, p. 197–206, 2009.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 Protein : From the Known and the Unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 322, n. August 1999, p. 311–322, 2000.

SEEGER, M. A.; PALLER, A. S. The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 4, p. 213–224, 2015.

SHABBIR, A.; COZ, A.; RODRIGUEZ, L.; SALGADO, M.; BADIIVAS, E. Mesenchymal stem cell exosomes induce the proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro. **Stem Cells and Development**, , n. ja, 2015.

SILVA, JOS. A.; APOLINÁRIO, A. CONCEI.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. N. A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125–131, 2010.

SILVA, L. F.; DEWITT, D. P.; PEARCE, J. A.; BOHAC, F. J.; GEDDES, L. A. Temperature distributions under electrosurgical dispersive electrodes. American Association of Medical Instrumentation Twelfth Annual Meeting, San Francisco. **Annals of XII Congress**, 1977.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 1999.

SINNO, H.; MALHOTRA, M.; LUTFY, J.; et al. Accelerated wound healing with topical application of complement C5. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 130, n. 3, p. 523–529, 2012.

TOLAZZI, A. R. D.; TOLAZZI, K. D.; GARCIA, M.; et al. Influence of leukotriene inhibitor montelukast on wound contraction and cutaneous healing process in rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 33, n. 1, p. 84–89, 2009.

TOMASEK, J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and Mechanoregulation of Connective Tissue Remodelling. **Nature Reviews**, v. 3, n. 5, p. 349–363, 2002.

UITTO, J. Molecular pathology of collagen in cutaneous diseases. **Advances in dermatology**. v. 6, p. 265–286, 1991.

ULRICH, D; LICHTENEGGER, F; EBLENKAMP, M; REPPER, D; PALLUS, N. Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, Aminoterminal Propeptide of Procollagen Type III, and Hyaluronan in Sera and Tissue of Patients with Capsular Contracture after Augmentation with Trilucent Breast Implants. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 114, n. 1, p. 229–236, 2004.

VÉLEZ-DÍAZ-PALLARÉS, M.; LOZANO-MONTOYA, I.; ABRAHA, I.; et al. Nonpharmacologic Interventions to Heal Pressure Ulcers in Older Patients: An Overview of Systematic Reviews (The SENATOR-ONTOP Series). **Journal of the American Medical Directors Association**, 2015.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. **The Journal of Cell Biology**, v. 110, n. 1, p. 133–145, 1990.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 835–870, 2003.

WILLEY, A.; KILMER, S.; NEWMAN, J.; et al. Elastometry and clinical results after bipolar radiofrequency treatment of skin. **Dermatologic Surgery**, v. 36, n. 6, p. 877–884, 2010.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509–528, 1997.

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

ZENG, Q.; WU, Z.; DUAN, H.; et al. Impaired tumor angiogenesis and VEGF-induced pathway in endothelial CD146 knockout mice. **Protein and Cell**, v. 5, n. 6, p. 445–456, 2014.

ANEXOS

ANEXO 1



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa

Curitiba, 13 de Agosto de 2015.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 0770 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: A influência na cicatrização cutânea de ratos tratados com radiofrequência analisada por histologia e tensiometria

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Priscila Balbinot

EQUIPE DE PESQUISA: Priscila Balbinot, Antonio Carlos Ligocki Campos

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Medicina / Mestrado UFPR

VIGÊNCIA DO PROJETO	04/2013 a 07/2013	QUANTIDADE DE ANIMAIS	64 (liberados em 18.03.13)
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratos Wistar)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	3 meses / 300 a 350 g	ESPECIÉ – GRUPO TAXONÔMICOS (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Biotério - PUCPR	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

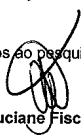
O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelos CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR em reunião de **18.03.2013**.

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. Dra. Marta Luciane Fischer
Coordenadora
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; 187^º da Independência e 120^º da República.

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA

Tarso Genro

Reinhold Stephanes

José Gomes Temporão

Miguel Jorge

Luiz Antonio Rodrigues Elias

Carlos Minc

ANEXO 3



ROTINA PARA COLORAÇÃO HE

Recebidos blocos com seções de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina:

- 1- Xilol 5 min.
- 2- xilol 5 min.
- 3- Álcool 5 min.
- 4- Álcool 5 min.
- 5- Álcool 90% 5 min.
- 6- Lavar 3 vezes em água destilada.
- 7- Incubar com a solução A por 30 min.
- 8- Lavar 3 vezes em água destilada.
- 9- Incubar com a solução B por 1 min.
- 10- Lavar 3 vezes em água destilada.
- 11- 3 banhos de álcool.
- 12- 3 banhos de xilol.
- 13- Montagem com Entellan (Merck®). e cobertura com laminula.

ANEXO 4

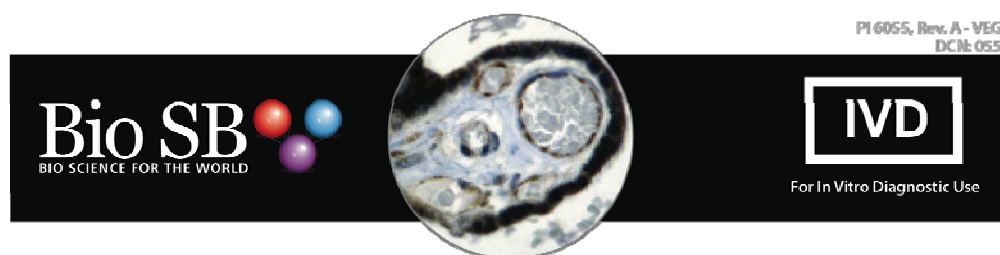


ROTINA PARA COLORAÇÃO PICROSSIRIUS

Recebidos blocos com seções de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina:

- 1- Xilol 5 min.
- 2- xilol 5 min.
- 3- Álcool 5 min.
- 4- Álcool 5 min.
- 5- Álcool 90% 5 min.
- 6- Lavar 3 vezes em água destilada.
- 7- Incubar com a solução A por 30 min.
- 8- Lavar 3 vezes em água destilada.
- 9- Incubar com a solução B por 1 min.
- 10- Lavar 3 vezes em água destilada.
- 11- 3 banhos de álcool.
- 12- 3 banhos de xilol.
- 13- Montagem com Entellan (Merck®). e cobertura com lamínula.

ANEXO 5



VEGF

IHC of VEGF on an FFPE Placenta Tissue

Intended Use For In Vitro Diagnostic Use

Summary and Explanation Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important signaling protein involved in both vasculogenesis (the de novo formation of the embryonic circulatory system) and angiogenesis (the growth of blood vessels from pre-existing vasculature). As its name implies, VEGF activity is restricted mainly to cells of the vascular endothelium, although it has an effect on a limited number of other cell types (e.g., stimulation monocyte/macrophage migration).

VEGF has been implicated with poor prognosis in breast cancer. The overexpression of VEGF may be an early step in the process of metastasis, a step involved in the "angiogenic" switch. Although VEGF has been correlated with poor survival, its exact mechanism of action in the progression of tumors remains unclear. VEGF is also released in rheumatoid arthritis in response to TNF-alpha, increasing endothelial permeability and swelling and also stimulating angiogenesis (formation of capillaries). Once released, VEGF may elicit several responses. It may cause a cell to survive, move, or further differentiate. Hence, VEGF is a potential target for the treatment of cancer. The first anti-VEGF drug, a monoclonal antibody named bevacizumab, was approved by the FDA in 2004.

Antibody Type	Rabbit Monoclonal	Clone	RBT-VEGF
Isotype	IgG	Reactivity	Paraffin, Frozen
Localization	Cytoplasmic, Cell Surface	Control	Angiosarcoma, Angioma

Presentation VEGF is a rabbit monoclonal antibody derived from cell culture supernatant that is concentrated, dialyzed, filter sterilized and diluted in buffer pH 7.5, containing BSA and sodium azide as a preservative.

Availability	Catalog No.	Antibody Type	Dilution	Volume/QTY
	BSB 6050	Prediluted	Ready-To-Use	3.0 ml
	BSB 6051	Prediluted	Ready-To-Use	7.0 ml
	BSB 6052	Prediluted	Ready-To-Use	15.0 ml
	BSB 6053	Concentrated	1:25-1:100	0.1 ml
	BSB 6054	Concentrated	1:25-1:100	0.5 ml
	BSB 6055	Concentrated	1:25-1:100	1.0 ml
	BSB 6056	Control Slides		5

Note: For concentrated antibodies, please centrifuge prior to use to ensure recovery of all product.

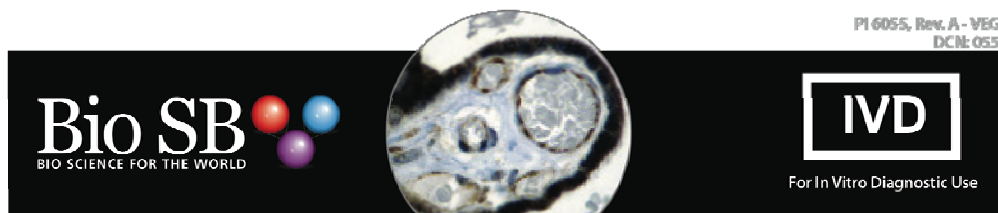
Storage Store at 2°-8°C **Stability** 3 years

For long-term storage of the concentrated antibody, it is recommended that aliquots of the antibody be frozen at -20°C in glycerol 50% (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Dilute using an antibody diluent such as ImmunoDetector Protein Block/Antibody Diluent (BSB-0040 and BSB-0041) or ImmunoDNA Background Blocker (BSB 0103-BSB 0107).



The sodium azide (NaN₃) used as a preservative, is toxic if ingested.

Protocol Suggested protocol on reverse



VEGF

IHC of VEGF on an FFPE Placenta Tissue

Intended Use For In Vitro Diagnostic Use

Summary and Explanation Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important signaling protein involved in both vasculogenesis (the de novo formation of the embryonic circulatory system) and angiogenesis (the growth of blood vessels from pre-existing vasculature). As its name implies, VEGF activity is restricted mainly to cells of the vascular endothelium, although it has an effect on a limited number of other cell types (e.g., stimulation monocyte/macrophage migration).

VEGF has been implicated with poor prognosis in breast cancer. The overexpression of VEGF may be an early step in the process of metastasis, a step involved in the "angiogenic" switch. Although VEGF has been correlated with poor survival, its exact mechanism of action in the progression of tumors remains unclear. VEGF is also released in rheumatoid arthritis in response to TNF-alpha, increasing endothelial permeability and swelling and also stimulating angiogenesis (formation of capillaries). Once released, VEGF may elicit several responses. It may cause a cell to survive, move, or further differentiate. Hence, VEGF is a potential target for the treatment of cancer. The first anti-VEGF drug, a monoclonal antibody named bevacizumab, was approved by the FDA in 2004.

Antibody Type	Rabbit Monoclonal	Clone	RBT-VEGF
Isotype	IgG	Reactivity	Paraffin, Frozen
Localization	Cytoplasmic, Cell Surface	Control	Angiosarcoma, Angioma

Presentation VEGF is a rabbit monoclonal antibody derived from cell culture supernatant that is concentrated, dialyzed, filter sterilized and diluted in buffer pH 7.5, containing BSA and sodium azide as a preservative.

Availability	Catalog No.	Antibody Type	Dilution	Volume/QTY
	BSB 6050	Prediluted	Ready-To-Use	3.0 ml
	BSB 6051	Prediluted	Ready-To-Use	7.0 ml
	BSB 6052	Prediluted	Ready-To-Use	15.0 ml
	BSB 6053	Concentrated	1:25-1:100	0.1 ml
	BSB 6054	Concentrated	1:25-1:100	0.5 ml
	BSB 6055	Concentrated	1:25-1:100	1.0 ml
	BSB 6056	Control Slides		5

Note: For concentrated antibodies, please centrifuge prior to use to ensure recovery of all product.

Storage Store at 2°-8°C **Stability** 3 years

For long-term storage of the concentrated antibody, it is recommended that aliquots of the antibody be frozen at -20°C in glycerol 50% (fruit-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Dilute using an antibody diluent, such as ImmunoDetector Protein Block/Antibody Diluent (BSB 0040 and BSB 0041) or ImmunoDNA Background Blocker (BSB 0103-BSB 0107).



The sodium azide (NaN₃) used as a preservative, is toxic if ingested.

Protocol Suggested protocol on reverse

ANEXO 6

BIOCARE
M E D I C A L

Ki-67
Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
Control Number: 901-325-011615

ISO
9001&13485
CERTIFIED

Catalog Number:	CRM 325 A,B,C	PRM 325 AA
Description:	0.1, 0.5, 1.0 ml, concentrated	6.0 ml, prediluted
Dilution:	1:100-1:200	Ready-to-use
Diluent:	Van Gogh Yellow	N/A

Intended Use:

For In Vitro Diagnostic Use

Summary and Explanation:

The Ki-67 nuclear antigen is associated with cell proliferation. It is found throughout the cell cycle in the G1, S, G2, and M phases; but not the (GO) phase. It is used to grade proliferation rates of tumors. The high affinity and/or binding capacity of rabbit antibodies provide superior staining results and less chance for technical false negatives.

Principle of Procedure:

Antigen detection in tissues and cells is a multi-step immunohistochemical process. The initial step binds the primary antibody to its specific epitope. After labeling the antigen with a primary antibody, an enzyme labeled polymer is added to bind to the primary antibody. This detection of the bound antibody is evidenced by a colorimetric reaction.

Source: Rabbit monoclonal

Species Reactivity: Human, cat, cow, dog, mouse, pig, rat and sheep.

Clone: SP6

Isotype: Rabbit IgG

Total Protein Concentration: ~10 mg/ml. Call for lot specific Ig concentration.

Epitope/Antigen: Ki-67

Cellular Localization: Nuclear

Positive Control: Tonsil or breast cancer

Known Applications:

Immunohistochemistry (formalin-fixed paraffin-embedded tissues)

Supplied As: Buffer with protein carrier and preservative.

Storage and Stability:

Store at 2°C to 8°C. Do not use after expiration date printed on vial. If reagents are stored under conditions other than those specified in the package insert, they must be verified by the user. Diluted reagents should be used promptly; any remaining reagent should be stored at 2°C to 8°C.

Protocol Recommendations:**Peroxide Block:**

Block for 5 minutes with Biocare's Peroxidized 1.

Pretreatment Solution: Diva, Reveal or Rodent Decloaker.

Pretreatment Protocol:**Heat Retrieval Method:**

Retrieve sections under pressure using Biocare's Decloaking Chamber followed by a wash in distilled water. Alternatively, steam tissue sections for 45-60 minutes. Allow solution to cool for 10 minutes then wash in distilled water.

Protein Block (Optional): Incubate for 5-10 minutes at RT with Biocare's Background Punisher.

Primary Antibody: Incubate for 30-60 minutes at RT.

Probe: N/A

Polymer: Incubate for 30 minutes at RT with a polymer.

Protocol Recommendations Cont'd:**Chromogen:**

Incubate for 5 minutes at RT when using Biocare's DAB. - OR - Incubate for 5-7 minutes at RT when using Biocare's Warp Red.

Counterstain:

Counterstain with hematoxylin. Rinse with deionized water. Apply Tacha's Bluing Solution for 1 minute. Rinse with deionized water.

Technical Note:

1. This antibody has been standardized with Biocare's MACH 2 detection system. It can also be used on an automated staining system and with other Biocare polymer detection kits. Use TBS buffer for washing steps.
2. For mouse and rat tissue, Rodent Block M (RBM961) & R (RBR962) is recommended. If background staining is observed, XM (XMF963) or XR (XRF964) Factor may be added to detection. For details, see product datasheet.
3. For mouse and rat tissue, Rabbit-on-Rodent Detection (RMR622/RMR625) is recommended. For dog and cat tissue, Rabbit-on-Canine detection (RC542/BRR4004) is recommended. For detection protocol please see detection datasheet.
4. Use TBS for washing steps.

Limitations:

The optimum antibody dilution and protocols for a specific application can vary. These include, but are not limited to: fixation, heat-retrieval method, incubation times, tissue section thickness and detection kit used. Due to the superior sensitivity of these unique reagents, the recommended incubation times and titers listed are not applicable to other detection systems, as results may vary. The data sheet recommendations and protocols are based on exclusive use of Biocare products. Ultimately, it is the responsibility of the investigator to determine optimal conditions. These products are tools that can be used for interpretation of morphological findings in conjunction with other diagnostic tests and pertinent clinical data by a qualified pathologist.

Quality Control:

Refer to CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2). CLSI Wayne, PA, USA (www.clsi.org). 2011

Precautions:

This antibody contains less than 0.1% sodium azide. Concentrations less than 0.1% are not reportable hazardous materials according to U.S. 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard communication and EC Directive 91/155/EC.

Sodium azide (NaN₃) used as a preservative is toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build-up in plumbing. (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976)

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions. Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.

Microbial contamination of reagents may result in an increase in nonspecific staining. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. The user must validate any such change. The MSDS is available upon request and is located at <http://biocare.net/support/msds/>.

 Biocare Medical
4040 Pike Lane
Concord, CA 94520
USA



Page 1 of 2

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands

BIOCARE
M E D I C A L

Ki-67
Concentrated and Prediluted Rabbit Monoclonal Antibody
Control Number: 901-325-011615

ISO
9001&13485
CERTIFIED

Catalog Number:	CRM 325 A,B,C	PRM 325 AA
Description:	0.1, 0.5, 1.0 ml, concentrated	6.0 ml, prediluted
Dilution:	1:100-1:200	Ready-to-use
Diluent:	Van Gogh Yellow	N/A

Intended Use:

For In Vitro Diagnostic Use

Summary and Explanation:

The Ki-67 nuclear antigen is associated with cell proliferation. It is found throughout the cell cycle in the G1, S, G2, and M phases; but not the (GO) phase. It is used to grade proliferation rates of tumors. The high affinity and/or binding capacity of rabbit antibodies provide superior staining results and less chance for technical false negatives.

Principle of Procedure:

Antigen detection in tissues and cells is a multi-step immunohistochemical process. The initial step binds the primary antibody to its specific epitope. After labeling the antigen with a primary antibody, an enzyme labeled polymer is added to bind to the primary antibody. This detection of the bound antibody is evidenced by a colorimetric reaction.

Source: Rabbit monoclonal

Species Reactivity: Human, cat, cow, dog, mouse, pig, rat and sheep.

Clone: SP6

Isotype: Rabbit IgG

Total Protein Concentration: ~10 mg/ml. Call for lot specific Ig concentration.

Epitope/Antigen: Ki-67

Cellular Localization: Nuclear

Positive Control: Tonsil or breast cancer

Known Applications:

Immunohistochemistry (formalin-fixed paraffin-embedded tissues)

Supplied As: Buffer with protein carrier and preservative.

Storage and Stability:

Store at 2°C to 8°C. Do not use after expiration date printed on vial. If reagents are stored under conditions other than those specified in the package insert, they must be verified by the user. Diluted reagents should be used promptly; any remaining reagent should be stored at 2°C to 8°C.

Protocol Recommendations:

Peroxide Block:

Block for 5 minutes with Biocare's Peroxidized 1.

Pretreatment Solution: Diva, Reveal or Rodent Decloaker.

Pretreatment Protocol:

Heat Retrieval Method:

Retrieve sections under pressure using Biocare's Decloaking Chamber followed by a wash in distilled water. Alternatively, steam tissue sections for 45-60 minutes. Allow solution to cool for 10 minutes then wash in distilled water.

Protein Block (Optional): Incubate for 5-10 minutes at RT with Biocare's Background Punisher.

Primary Antibody: Incubate for 30-60 minutes at RT.

Probe: N/A

Polymer: Incubate for 30 minutes at RT with a polymer.

Protocol Recommendations Cont'd:

Chromogen:

Incubate for 5 minutes at RT when using Biocare's DAB. - OR - Incubate for 5-7 minutes at RT when using Biocare's Warp Red.

Counterstain:

Counterstain with hematoxylin. Rinse with deionized water. Apply Tacha's Bluing Solution for 1 minute. Rinse with deionized water.

Technical Note:

1. This antibody has been standardized with Biocare's MACH 2 detection system. It can also be used on an automated staining system and with other Biocare polymer detection kits. Use TBS buffer for washing steps.
2. For mouse and rat tissue, Rodent Block M (RBM961) & R (RBR962) is recommended. If background staining is observed, XM (XMF963) or XR (XRF964) Factor may be added to detection. For details, see product datasheet.
3. For mouse and rat tissue, Rabbit-on-Rodent Detection (RMR622/RMR625) is recommended. For dog and cat tissue, Rabbit-on-Canine detection (RC542/BRR4004) is recommended. For detection protocol please see detection datasheet.
4. Use TBS for washing steps.

Limitations:

The optimum antibody dilution and protocols for a specific application can vary. These include, but are not limited to: fixation, heat-retrieval method, incubation times, tissue section thickness and detection kit used. Due to the superior sensitivity of these unique reagents, the recommended incubation times and titers listed are not applicable to other detection systems, as results may vary. The data sheet recommendations and protocols are based on exclusive use of Biocare products. Ultimately, it is the responsibility of the investigator to determine optimal conditions. These products are tools that can be used for interpretation of morphological findings in conjunction with other diagnostic tests and pertinent clinical data by a qualified pathologist.

Quality Control:

Refer to CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2). CLSI Wayne, PA, USA (www.clsi.org). 2011

Precautions:

This antibody contains less than 0.1% sodium azide. Concentrations less than 0.1% are not reportable hazardous materials according to U.S. 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard communication and EC Directive 91/155/EC.

Sodium azide (NaN₃) used as a preservative is toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build-up in plumbing. (Center for Disease Control, 1976, National Institute of Occupational Safety and Health, 1976)

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions. Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.

Microbial contamination of reagents may result in an increase in nonspecific staining. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. The user must validate any such change. The MSDS is available upon request and is located at <http://biocare.net/support/msds/>.

 Biocare Medical
4040 Pike Lane
Concord, CA 94520
USA



Page 1 of 2

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands

ANEXO 7

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

MMP-2 (K-20): sc-8835



The Power to Question

BACKGROUND

The matrix metalloproteinases (MMP) are a family of peptidase enzymes responsible for the degradation of extracellular matrix components, including collagen, gelatin, fibronectin, laminin and proteoglycan. Transcription of MMP genes is differentially activated by phorbol ester, lipopolysaccharide (LPS) or staphylococcal enterotoxin B (SEB). MMP catalysis requires both calcium and zinc. MMP-2 (also designated type IV collagenase) cleaves collagen types IV, V, VII and X and gelatin type I. Activation of MMP-2 secretion requires the Ras signaling pathway.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: MMP2 (human) mapping to 16q12.2; Mmp2 (mouse) mapping to 8 C5.

SOURCE

MMP-2 (K-20) is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping near the C-terminus of MMP-2 of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-8835 P, (100 µg peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

APPLICATIONS

MMP-2 (K-20) is recommended for detection of MMP-2 of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500), immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

MMP-2 (K-20) is also recommended for detection of MMP-2 in additional species, including equine, canine, bovine and porcine.

Suitable for use as control antibody for MMP-2 siRNA (h): sc-29398, MMP-2 siRNA (m): sc-37264, MMP-2 shRNA Plasmid (h): sc-29398-SH, MMP-2 shRNA Plasmid (m): sc-37264-SH, MMP-2 shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-29398-V and MMP-2 shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-37264-V.

Molecular Weight of pro-MMP-2: 72 kDa.

Molecular Weight of cleaved MMP-2: 63 kDa.

Positive Controls: ECV304 cell lysate: sc-2269, RAT2 whole cell lysate: sc-364198 or A-375 cell lysate: sc-3811.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

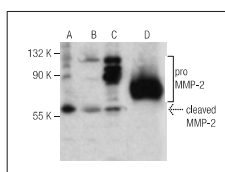
PROTOCOLS

See our web site at www.scbt.com or our catalog for detailed protocols and support products.

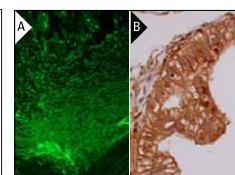
STORAGE

Store at 4° C, **DO NOT FREEZE** . Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

DATA



MMP-2 (K-20): sc-8835-R. Western blot analysis of MMP-2 expression in ECV304 (A), A-375 (B) and RAT2 (C) whole cell lysates and human recombinant MMP-2 (D).



MMP-2 (K-20): sc-8835. Immunofluorescence staining of formalin-fixed, paraffin-embedded canine digital flexor tendon, twenty-one days after injury. Note staining in areas of active remodeling and scar formation. Kindly provided by Dr. Timothy Ritty from Washington University School of Medicine (A). Immunoperoxidase staining of formalin fixed, paraffin-embedded human epididymis tissue showing membrane and cytoplasmic staining of glandular cells (B).

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Yang, K., et al. 2007. Matrix-metallo-proteinases and their tissue inhibitors in radiation-induced lung injury. *Int. J. Radiat. Biol.* 83: 665-676.
- Wright, J.L., et al. 2007. Cigarette smoke upregulates pulmonary vascular matrix metalloproteinases via TNF- α signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292: L125-L133.
- Cheng, C.C., et al. 2010. Effects of Shugan-Huayu powder, a traditional Chinese medicine, on hepatic fibrosis in rat model. *Chin. J. Physiol.* 53: 223-233.
- Mata, K.M., et al. 2010. Combining two potential causes of metalloproteinase secretion causes abdominal aortic aneurysms in rats: a new experimental model. *Int. J. Exp. Pathol.* 92: 26-39.
- Cheng, C.C., et al. 2011. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in Swine associated with porcine circovirus type 2 infection. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011: 245728.
- Kim, J.H., et al. 2011. Developmental arrest of scNT-derived fetuses by disruption of the developing endometrial gland as a result of impaired trophoblast migration and invasiveness. *Dev. Dyn.* 240: 627-639.
- Schuler, P.J., et al. 2012. Urokinase plasminogen activator, uPAR, MMP-2, and MMP-9 in the C6-glioblastoma rat model. *In Vivo* 26: 571-576.
- Janssens, E., et al. 2013. Matrix metalloproteinase 14 in the zebrafish: an eye on retinal and retinotectal development. *PLoS ONE* 8: e52915.
- Saran, W.R., et al. 2013. Castor oil polymer induces bone formation with high matrix metalloproteinase-2 expression. *J. Biomed. Mater. Res. A*. E-published.
- Verslegers, M., et al. 2013. Identification of MMP-2 as a novel enhancer of cerebellar granule cell proliferation. *Mol. Cell. Neurosci.* 57C: 63-72.

ANEXO 8

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

MMP-9 (C-20): sc-6840



The Power to Question

BACKGROUND

The matrix metalloproteinases (MMP) are a family of peptidase enzymes responsible for the degradation of extracellular matrix components, including collagen, gelatin, fibronectin, laminin and proteoglycan. Transcription of MMP genes is differentially activated by phorbol ester, lipopolysaccharide (LPS) or staphylococcal enterotoxin B (SEB). MMP catalysis requires both calcium and zinc. MMP-9 (also designated 92 kDa type IV collagenase or gelatinase B) has been shown to degrade bone collagens in concert with MMP-1 (also designated interstitial collagenase, fibroblast collagenase or collagenase-1), and cysteine proteases and may play a role in bone osteoclastic resorption. MMP-1 is down-regulated by p53, and abnormality of p53 expression may contribute to joint degradation in rheumatoid arthritis by regulating MMP-1 expression.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: MMP9 (human) mapping to 20q13.12; Mmp9 (mouse) mapping to 2 H3.

SOURCE

MMP-9 (C-20) is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the C-terminus of MMP-9 of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-6840 P, (100 µg peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

APPLICATIONS

MMP-9 (C-20) is recommended for detection of MMP-9 of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 µg per 100-500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)], immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500), immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

MMP-9 (C-20) is also recommended for detection of MMP-9 in additional species, including canine.

Suitable for use as control antibody for MMP-9 siRNA (h): sc-29400, MMP-9 siRNA (m): sc-29401, MMP-9 shRNA Plasmid (h): sc-29400-SH, MMP-9 shRNA Plasmid (m): sc-29401-SH, MMP-9 shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-29400-V and MMP-9 shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-29401-V.

Molecular Weight of MMP-9: 92 kDa.

Positive Controls: A-431 whole cell lysate: sc-2201.

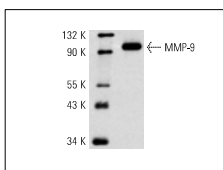
RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

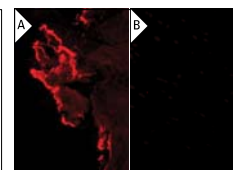
STORAGE

Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

DATA



MMP-9 (C-20): sc-6840. Western blot analysis of human recombinant MMP-9.



MMP-9 (C-20): sc-6840. Immunofluorescence staining of formalin-fixed, paraffin-embedded canine digital flexor tendon, failed repair injury (A) and uninjured (B). Note staining in areas of active remodeling and scar formation. Kindly provided by Dr. Timothy Ritty from Washington University School of Medicine.

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Hauck, C.R., et al. 2001. Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promotion the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res.* 61: 7079-7090.
- Hu, Q., et al. 2011. Functional differentiation of uterine stromal cells involves cross-regulation between bone morphogenetic protein 2 and Krüppel-like factor (KLF) family members KLF9 and KLF13. *Brain Res.* 1367: 347-359.
- Cheng, C.C., et al. 2011. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in Swine associated with porcine circovirus type 2 infection. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011: 245728.
- Suryawanshi, A., et al. 2011. Ocular neovascularization caused by herpes simplex virus type 1 infection results from breakdown of binding between vascular endothelial growth factor A and its soluble receptor. *J. Immunol.* 186: 3653-3665.
- Vidya Priyadarsini, R., et al. 2012. Aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway contributes to the sequential progression of DMBA-induced HBP carcinomas. *Oral Oncol.* 48: 33-39.
- Toledo, A.C., et al. 2012. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur. Respir. J.* 39: 254-264.
- Vidya Priyadarsini, R., et al. 2012. Gene expression signature of DMBA-induced hamster buccal pouch carcinomas: modulation by chlorophyllin and ellagic acid. *PLoS ONE* 7: e34628.
- Tsai, S.J., et al. 2012. Overexpression of myeloid zinc finger 1 suppresses matrix metalloproteinase-2 expression and reduces invasiveness of SiHa human cervical cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425: 462-467.
- Wan, X.B., et al. 2012. Molecular prognostic prediction for locally advanced nasopharyngeal carcinoma by support vector machine integrated approach. *PLoS ONE* 7: e31989.

ANEXO 9

site: www.tonederm.com.br

Autorização de Funcionamento na ANVISA n°: 1.04.115-2

Responsável Técnico: Sidney Gonçalves de Oliveira Sobrinho CREA RJ-135403/D.

Informações do Equipamento

Registro do equipamento na ANVISA n°: 10411520022

Validade: Indeterminada

Lote: Vide etiqueta indelével fixada no equipamento

O equipamento não possui proteção contra penetração de líquido.

O equipamento e suas partes não devem ser descartados no meio ambiente e sim devolvidos ao fabricante.

MANUAL RD