

Efeitos da biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) em pele de ratos Wistar submetidos à lesão térmica corporal por escaldamento

Effects of the natural latex biomembrane (Hevea brasiliensis) in Wistar rat skin submitted to body thermal injury by scalding

Regina de Sousa Bolina-Matos¹, Paulo Henrique de Matos Alves², Rose Eli Grassi Ricci¹, Phelipe Oliveira Favaron¹, Edson Aparecido Liberti²

RESUMO

Objetivo: As implicações cosméticas para o tratamento de queimaduras têm levado à busca de estratégias farmacêuticas que otimizem em tempo e qualidade o processo de reparação do tecido comprometido. Nesse sentido, a proposta deste estudo foi investigar os efeitos da biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) em pele de ratos com lesão térmica por escaldamento. **Método:** No total, 18 ratos Wistar foram divididos em três grupos (GI, controle; GII, com lesão térmica sem tratamento; e GIII, tratado com biomembrana de látex natural). Os animais foram eutanasiados no período de 4 e 14 dias pós-lesão. Amostras coletadas do tegumento dorsal de todos os animais foram analisadas por microscopia de luz e eletrônica de varredura, histomorfometria e estereologia para quantificação da densidade de volume das fibras elásticas, do tecido de granulação e do colágeno ali presente. **Resultados:** Os resultados macro e microscópicos demonstraram que o grupo III apresentou melhor cicatrização comparada ao grupo GII. Foi observado que as fibras colágenas e elásticas, embora estivessem com densidade de volume menor no grupo III, apresentaram-se em uma rede organizada, assim como notou-se incidência de folículos pilosos, novos vasos sanguíneos e aumento do tecido de granulação. **Conclusão:** Os dados permitiram concluir que a biomembrana de látex natural favoreceu a cicatrização em áreas queimadas e a neoangiogênese, sugerindo que o biomaterial utilizado é um recurso terapêutico promissor para a cicatrização da pele.

DESCRITORES: Pele. Queimaduras. Membranas Artificiais. Cicatrização. Colágeno. Látex.

ABSTRACT

Purpose: The cosmetic implications for burn treatment, has led to the search of pharmaceutical strategies that optimize in time and quality the repair process of the affected tissue. Due this fact, the purpose of this study was to investigate the effects of natural latex biomembrane (*Hevea brasiliensis*) in the skin of rats with body thermal injury by scalding. **Method:** Totally, 18 Wistar rats were allocated into three groups (GI, control; GII, scalded without treatment; and GIII, treated with natural latex biomembrane). Individuals were euthanized at 4 and 14 days post-burn. Then, samples of the dorsal region of all animals were assessed by means of light and scanning electron microscopy, histomorphometry and stereology to quantify the volume density of elastic fibers, granulation tissue and collagen fibers inside it. **Results:** According to the gross and microscopic results, the group III showed better healing compared to GII. Although the collagen and elastic fibers had lower volume density in the group III, they were organized in a network of fibers. In addition, were observed hair follicles, blood vessels, and increase of granulation tissue. **Conclusion:** According to the results, the natural latex biomembrane helped the healing and neoangiogenesis in burned areas, suggesting that the biomaterial is a promising therapeutic tool for healing the skin.

KEYWORDS: Skin. Burns. Membranes, Artificial. Healing. Collagen. Latex.

1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
2. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Correspondência: Phelipe Oliveira Favaron
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil – CEP - 05508-270
E-mail: phelipe.favaron@yahoo.com.br
Artigo recebido: 5/10/2013 • Artigo aceito: 16/11/2013

INTRODUÇÃO

As queimaduras estão entre as condições mais graves encontradas na Medicina, sendo um problema que atinge todos os grupos etários e classes sociais, com variações na extensão, profundidade e etiologia¹⁻³. Dados da incidência de queimaduras de pele no mundo são raros e pouco precisos, devido às muitas variações relacionadas à extensão, grau e busca de serviços hospitalares. No Brasil, anualmente cerca de 2 milhões de pessoas sofrem queimaduras, o que representa um gasto anual de R\$ 55 milhões para o SUS (Sistema Único de Saúde). Destes, 100.000 pacientes procuram atendimento hospitalar e cerca de 2.500 falecem direta ou indiretamente por conta das lesões. Estima-se que cerca de 50% de todas as vítimas de queimaduras são crianças e, destas, cerca de 70% de todas as mortes poderiam ser evitadas⁴.

Uma característica marcante da lesão térmica é a ampla destruição de tecidos, levando à ativação de processos catabólicos pelo organismo, a fim de reparar a área afetada. A resposta hipermetabólica para o trauma, causado por queimadura grave e sepse, está associada ao aumento da energia consumida e ao substrato energético liberado das reservas de proteína e gordura do organismo⁵. O desenvolvimento de um edema e um progressivo dano vascular são características de ferimentos por queimaduras.

O processo de reparação tecidual compreende dois mecanismos: a regeneração e a cicatrização. A regeneração ocorre com reposição tecidual. As células epidérmicas, das margens da ferida e das invaginações epidérmicas dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas começam a proliferar e migrar no leito da ferida, ocluindo rapidamente sua superfície⁶. A cicatrização visa à restauração dos tecidos lesados, e é composta de uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, incluindo fases de inflamação, proliferação, formação de tecido conjuntivo, contração e, finalmente, de remodelação^{7,8}.

Diferentes produtos têm sido utilizados na tentativa de melhorar o processo de reparação tecidual e as condições de cicatrização. Dentre eles, o látex natural de seringueira (*Hevea brasiliensis*) vem sendo utilizado para diferentes propósitos, tais como: reconstrução de defeitos experimentais como substituto ou promotor da formação de órgãos e tecidos⁹, substituição parcial de pericárdio¹⁰, tratamento de úlceras flebopáticas¹¹, arterioplastia experimental¹², meringoplastia¹³, epitelização e renovação da cavidade mastoideia¹⁴ e indutor da cicatrização conjuntiva¹⁵.

Uma vez que a literatura tem mostrado que o látex natural da seringueira e comporta induzindo a formação de uma base de tecido conjuntivo-fibroso^{16,17}, estando suas propriedades relacionadas à presença de um possível fator de crescimento na sua composição, o qual atuaria promovendo a neovascularização, adesão celular e formação de matriz extracelular^{11,13}, a proposta deste estudo foi investigar os efeitos quanto ao uso de biomembrana obtida a partir deste biopolímero, confeccionada pela extração de látex vegetal oriundos da árvore da borracha, *Hevea brasiliensis*, em ratos submetidos à lesão térmica corporal por escaldamento (LTE).

MÉTODO

Animais e realização da lesão térmica

Foram utilizados 18 ratos Wistar, machos, com 2 meses de idade e peso variando de 200-300g. Os animais foram mantidos individualmente, em gaiolas metabólicas do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB III) da Universidade de São Paulo (USP). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, sob nº 1451/2008 e Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob nº 014/03.

Após o período de adaptação, os animais foram divididos em três grupos (GI, controle, n = 6; GII, com lesão térmica sem tratamento, n = 6; e GIII, com lesão térmica tratada com biomembrana de látex natural – BLN, n = 6), sendo que três animais foram eutanasiados no período de 4 dias pós-lesão térmica e três animais após 14 dias da lesão térmica.

Os animais foram previamente anestesiados, por via intraperitoneal, com Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepan em dose de 1 mL/Kg. Após serem pesados, foi realizada a tricotomia dorsal de todos os animais. Então, os animais dos grupos II e III foram colocados em calha, permitindo a exposição do dorso em água a 87°C por 10 segundos. O tempo de exposição para a LTE foi calculado de acordo com a massa corporal dos animais (18% da área corporal = 10. W2/3, onde W = massa corporal – correspondente a uma área retangular de aproximadamente 26 cm²)¹⁸.

Após a lesão térmica, o grupo III foi tratado com a biomembrana de látex natural. O biopolímero (BLN) foi colocado em toda lesão e fixado com sutura simples. Os animais receberam por via subcutânea Morfina (2,0mg/Kg) e opioide a cada 6 horas, durante 3 dias consecutivos e uma vez ao dia Flunixin-Meglumine (2,5 mg/kg) via oral durante o mesmo período. As lesões térmicas tratadas e não tratadas foram fotodocumentadas (Sony MVC-CD500).

Nos dois períodos determinados (4 e 14 dias), os animais foram pesados e em seguida eutanasiados em câmara de dióxido de carbono. Após a eutanásia, amostras do tegumento dorsal foram retiradas com uma margem de 1cm de tecido normal preservando as quatro camadas: epiderme, derme, hipoderme e camada muscular – *panniculus carnosus*, para posterior processamento de microscopia de luz e eletrônica de varredura.

Microscopia de luz e eletrônica de varredura (MEV)

Para microscopia de luz, os cortes foram realizados em criostato (25°C), com espessura de 10µm e armazenados em freezer -20°C. Utilizou-se a coloração de hematoxilina-eosina para avaliar os aspectos gerais do tegumento e do tecido de granulação. Para avaliação das fibras colágenas, os cortes foram corados pelo método de Picro-sirius e analisados sob luz polarizada para tipificação e quantificação das fibras colágenas presentes no tecido de granulação. Para as fibras elásticas maduras, as secções foram coradas com Verhoeff. As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio

de luz Olympus BX40 microscope (Zeiss KS400 image analysis system 3.4; Carl Zeiss vision, Munich, Germany).

Para as análises de MEV, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky por um período de 48 horas a 4°C. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, desidratadas em série crescente de etanol (de 70% a 100%). Após seco em aparelho de ponto crítico BALZERS CPD20, as amostras foram montadas em bases metálicas, metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO VP435; Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany).

Histomorfometria e Estereologia

Em todos os grupos, foram avaliadas as espessuras totais das camadas do tegumento, da derme e do tecido de granulação, utilizando-se o sistema de imagem computadorizada com objetiva de 5x. Foram realizadas, aleatoriamente, cinco medidas em cinco secções diferentes apresentadas em micrômetros (μm). O estudo da espessura total engloba todo o processo inflamatório da área lesada até a aponeurose profunda da musculatura esquelética dorsal (*panniculus carnosus*).

A densidade de volume (Vv) do sistema elástico e do colágeno presente no tecido de granulação foi determinada em oito amostras de cada animal, correspondentes a todos os grupos, de modo que as secções obtidas em cada amostra foram distribuídas seriadamente nas diferentes lâminas¹⁹.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software estatístico Minitab. Utilizou-se o teste oneway ANOVA seguido por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O teste *t-Student* foi usado para determinar estatisticamente a significância entre os GII-14 e GIII-14 relacionados ao tecido de granulação. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%, os valores foram considerados como significativos quando a probabilidade e índice de significância (p) foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Características macroscópicas

Imediatamente após a realização da lesão térmica, a área do tegumento correspondente apresentou-se elevada, esbranquiçada e circundada por uma zona hiperêmica. As Figuras 1A, 1G, 1D e 1J ilustram, respectivamente, as características das superfícies externa e profunda da pele dos animais do grupo controle (GI) com 4 e 14 dias.

As análises realizadas com 4 dias após a lesão térmica permitiram observar a formação de um tecido espesso, escuro e com poucos pelos na superfície externa do tegumento nos animais do GII (Figura 1B). Por outro lado, no GIII observou-se uma superfície amarelada, umedecida e maleável (Figura 1C). Ao analisar a face profunda da pele notou-se em ambos os grupos analisados uma acentuada coloração rosada (Figuras 1E e 1F).

Após 14 dias, notou-se que o tecido formado no local da lesão térmica dos animais do GII continuava espesso e com coloração

avermelhada, com tendência a desprendimento (Figura 1H). No grupo GIII, ficou evidente uma superfície amarelada, intumescida, úmida e com total ausência de revestimento piloso (Figura 1I). Na face profunda desses grupos, observou-se uma coloração intensamente avermelhada sugestiva de intensa irrigação local, principalmente em GIII (Figuras 1K e 1L).

Características microscópicas

A epiderme no grupo controle, tanto com 4 quanto com 14 dias de experimento, apresentou-se composta de quatro camadas. Assim, a camada córnea queratinizada exibiu uma considerável espessura, quando comparada à camada granulosa, delgada e constituída por, no máximo, dois estratos celulares. Subjacente, evidenciou-se a camada espinhosa composta por aproximadamente quatro estratos de células pavimentosas e a camada basal com apenas um estrato celular. Na região da epiderme, foram detectados espaços (fendas) entre as fibras do tecido conjuntivo denso não modelado (Figuras 2A e B). A membrana basal apresentou-se delicada limitando inferiormente a epiderme e superiormente a derme. Ainda com relação a esse grupo, como característica dessa região, notou-se a presença de folículos pilosos e glândulas sebáceas com citoplasma claro e vacuolizado, porém, consideravelmente volumoso (Figura 2A).

Na MEV, tanto a disposição e a organização do colágeno, bem como a vascularização, puderam ser avaliados. Relativamente ao aspecto celular da epiderme e a sua sintopia com a camada subjacente muscular, notou-se que as fibras orientavam-se longitudinalmente, bem como a presença de vasos sanguíneos (Figura 2C). As fibras elásticas foram detectadas em grande quantidade na região subepidérmica, orientadas em diferentes direções no terço profundo da derme. Essas fibras exibiram menor densidade e estavam dispersas pelo tecido colágeno espesso. No entorno do bulbo dos folículos pilosos e entre estes, verdadeira rede de fibras elásticas foi detectada, orientadas em várias direções (Figuras 3A e B).

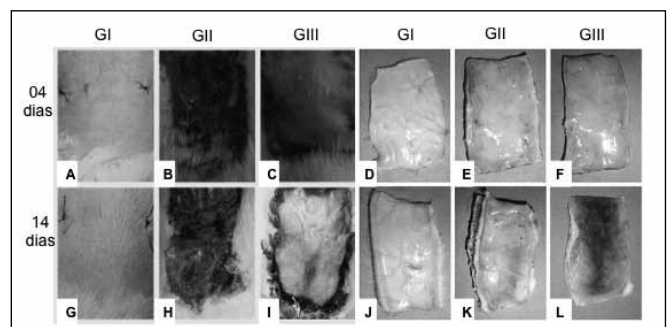


Figura 1 – Características macroscópicas das superfícies externa e profunda do tegumento. (A, D, G e J): Controle. Notar no grupo I a formação de um tecido escuro, espesso e ressecado que manteve-se do 4º ao 14º dia, assim como a baixa incidência de pelos na superfície externa (B e H). No grupo tratado com a biomembrana de látex natural, entre o 4º e 14º dia a superfície externa apresentou-se amarelo-esbranquiçada e umedecida (C e I). Na superfície profunda, há um aspecto róseo intenso nos animais dos grupos II (E e K) e III (F e L). Especialmente no grupo tratado com a biomembrana após 14 dias (L), há uma coloração avermelhada da região, devido ao aumento da vascularização.

Nos animais do GII, com 4 dias após a lesão térmica, observou-se o terço superficial da derme, a estrutura dos folículos pilosos como o aspecto celular das glândulas sebáceas desorganizadas (Figuras 2D e E). Sob MEV, confirmou-se o aspecto desorganizado e compacto dos tecidos (Figuras 2F e G). Houve adensamento das fibras elásticas no terço médio da derme. Os espaços anteriormente observados entre as fibras do tecido conjuntivo denso não modelado, nos animais do grupo I, encontravam-se no GII preenchidos por uma aparente fusão das fibras colágenas, sugerindo desnaturação proteica (Figura 3C). Nessa fase, ainda não foi possível detectar a presença de tecido de granulação. No entanto, aos 14 dias pós-lesão foi facilmente identificado na região do terço médio da derme um tecido relativamente espesso de coloração mais clara que o restante da derme, de aspecto granuloso, totalmente celular, desprovido de fibras elásticas e/ou colágenas, folículos pilosos e glândulas sebáceas. As fibras elásticas mostraram-se mais espessas, porém, mais esparsas, sem o aspecto nítido de uma camada elástica típica, como observado no 4º dia (Figura 3D).

No GIII, com 4 dias notou-se a preservação do terço superficial da derme, com formação de pequena quantidade de tecido de granulação (Figuras 2H e I). Sob a MEV, foi possível observar maior vascularização e um arranjo colágeno mais frouxo e melhor organizado nos terços superficial e médio da derme, quando comparados aos animais do GII (Figura 2). Tais aspectos foram mais evidentes no 14º dia, notando-se um tecido de granulação bem desenvolvido, mais maduro, constituído por uma malha pantográfica de tecido conjuntivo frouxo,

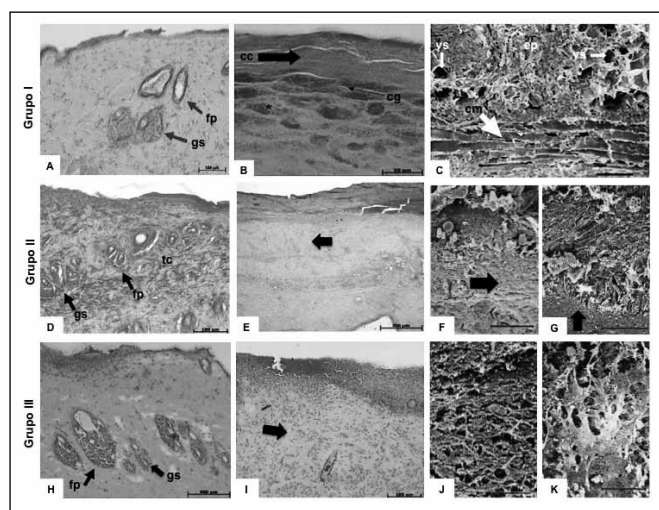


Figura 2 – Microscopia de luz e eletrônica de varredura (MEV) da derme dos animais dos grupos I (A-C), II (D-G) e III (H-K). No grupo controle (GI), notar a característica dos folículos pilosos (fp), glândulas sebáceas (gs), camada córnea (cc), camada granulosa (cg), camada espinhosa (*), camada muscular (cm), epiderme (ep) e vasos sanguíneos (vs). No grupo II (4º dia) (D), notam-se folículos pilosos (fp) e glândulas sebáceas (gs) alterados, bem como tecido conjuntivo desorganizado (tc). No 14º dia (E-G), nota-se tecido de granulação com aspecto compacto (seta). Amostras do grupo III com 4 dias (H) apresentam folículos pilosos (fp) também desorganizados, porém mais semelhantes ao GI, assim como as glândulas (gs). No 14º dia (I-K), há uma tendência à reorganização tecidual da derme, bem como evidencia-se colágeno no tecido de granulação (seta) e, sob a MEV, vasos sanguíneos estavam dispersos (setas) entre as fibras colágenas.

infiltrada por vasos sanguíneos e presença de colágeno neoformado (Figura 2K). Com relação ao sistema elástico, verificou-se um tecido com aspecto mais celular, com fibras entremeadas ao tecido colágeno assemelhando-se ao encontrado nos animais do grupo I (Figura 3E). Com 14 dias, foi nítida a invasão do tecido colágeno no tecido de granulação e, eventualmente, presença de glândulas sebáceas e folículos pilosos. Nessa fase, ocorreu uma tendência à organização da região subepidérmica (Figura 2I). Relativamente às fibras elásticas, sua densidade foi maior do que aquela encontrada nas amostras de 4 dias, sugestivo de intensa proliferação desse tecido nessa fase (Figura 3F).

A tipificação das fibras colágenas através da luz polarizada permitiu verificar que tanto no terço superficial quanto no terço profundo da derme do GI houve equilíbrio entre a distribuição das fibras colágenas dos tipos I (amarela, laranja ou vermelha) e III (verde) (Figuras 4A e B). No GII com 4 e 14 dias, notou-se um aumento considerável das fibras colágenas do tipo I, principalmente no terço superficial da derme (Figuras 4C e D). No GIII, ocorreu um predomínio das fibras do tipo I nas amostras de 4 dias e, muito embora tenha sido detectada uma proliferação das fibras do tipo III no 14º dia, seu aspecto não foi compatível com o verificado no grupo controle (Figuras 4E e F).

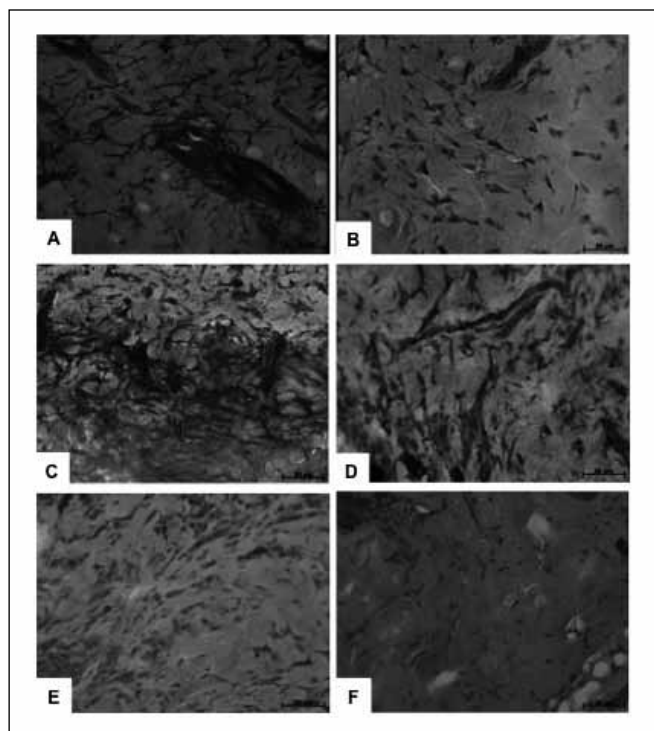


Figura 3 – Histologia da derme dos animais analisados com 4 e 14 dias do grupo I (A, B, respectivamente), grupo II (C, D, respectivamente) e grupo III (E e F, respectivamente) coradas pela técnica de Verhoeff. Nos animais do grupo I, as fibras elásticas formam uma rede no terço superficial da derme, encontrando-se dispersas entre o tecido colágeno do terço profundo da derme. No grupo II, nota-se adensamento das fibras elásticas no terço médio da derme. Nos animais tratados com membrana de látex natural, há proliferação do tecido elástico em meio ao tecido conjuntivo, principalmente no terço profundo da derme.

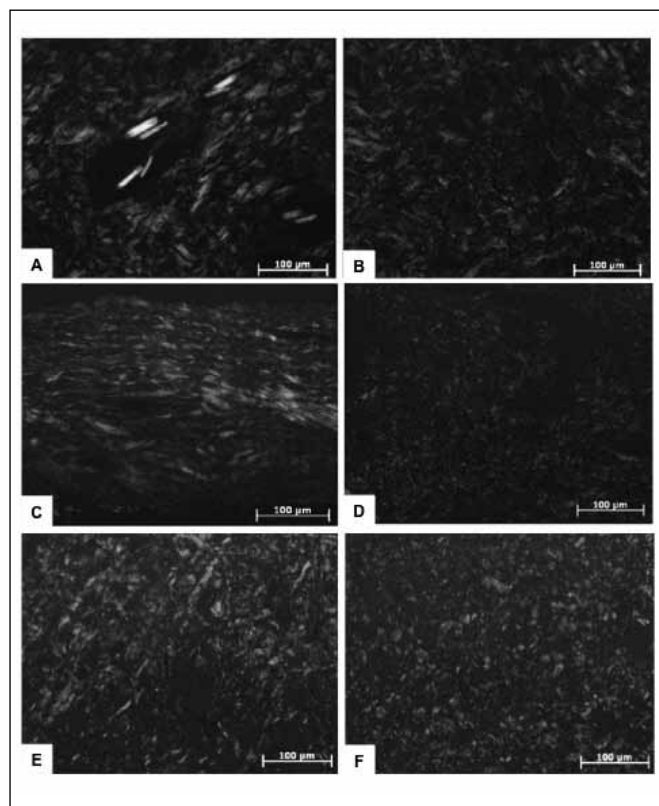


Figura 4 – Imagens da derme dos animais analisados com 4 e 14 dias do grupo I (A,B, respectivamente), II (C,D, respectivamente) e III (E,F, respectivamente) coradas pelo Picro-sirius. Nos animais controle (GI), nota-se um equilíbrio entre as fibras colágenas dos tipos I e III, sendo (A) o terço superficial da derme e (B) o terço profundo. Nas amostras do grupo II, há predomínio das fibras colágenas tipo I, principalmente no terço superficial da derme (C). Os animais tratados com a biomembrana de látex natural (GIII) exibiram ligeiro predomínio de fibras colágenas do tipo I, tanto no terço superficial (E) quanto no terço profundo da derme (F).

Análise Quantitativa

Os diferentes parâmetros determinados na presente pesquisa estão expressos na Tabela I. Desta forma, durante o período experimental, todos os animais ganharam peso. Do mesmo modo, observou-se que a massa final dos animais, nos três grupos, foi maior que a inicial. Observou-se, ainda, que com 4 dias, a variação de peso entre os grupos foi visivelmente diferente, enquanto no 14º dia notou-se uma tendência ao equilíbrio de peso entre os grupos.

Na análise histomorfométrica, notou-se aumento da espessura da derme no GIII com 4 dias de lesão, quando comparada ao GI no mesmo período de avaliação. Os animais do GII não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação aos animais do GI e GIII. Da mesma maneira, no 14º dia, a espessura da derme foi maior nos animais do GIII quando comparado aos GI e GII.

Quanto à espessura total do tegumento, essa foi maior nos animais do GIII com 4 dias, quando comparada ao GI no mesmo período. Apesar da espessura total do tegumento no GII ter sido semelhante ao GIII, estatisticamente não houve diferenças significativas. O mesmo foi observado na avaliação do 14º dia.

O tecido de granulação somente foi evidenciado nos animais do GII e GIII com 14 dias de lesão térmica, sendo sua espessura maior no GIII quando comparado ao GII.

Quanto à quantificação esteriológica, os resultados mostraram que a Vv das fibras elásticas foi maior nos animais do GII em relação ao grupo III no 4º dia, não havendo diferenças significativas quando comparada a densidade obtida com o grupo I.

Conforme observado na histomorfometria, igualmente verificou-se aumento do Vv do tecido de granulação nos animais do GIII em relação ao GII no 14º dia de lesão.

Não foram realizadas comparações estatísticas entre o Vv do colágeno presente no tecido de granulação do GII e GIII no 14º dia,

TABELA I

Dados quantitativos obtidos de amostras do tegumento dorsal de ratos submetidos à lesão térmica por escaldamento. Grupo I – controle, Grupo II – com lesão térmica, sem tratamento e Grupo III – tratado com biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*).

Parâmetros	4 dias			14 dias		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Varição entre peso final e inicial do animal (g)	16 ± 1,41*	3,3 ± 0,58*	10,6 ± 1,14*	97,7 ± 4,16*	67,3 ± 1,53*	79,6 ± 2,70*
Espessura da derme (µm)	851,31 ± 187,42*	885,36 ± 100,19	1136,20 ± 379,58	1103,31 ± 85,75*	1112,29 ± 155,71	1443,54 ± 118,64
Espessura total do tegumento (µm)	1216,17 ± 102,89*	1676,63 ± 150,46	1681,62 ± 611,13	1463,40 ± 12,74*	1792,17 ± 341,15	2180,70 ± 175,13
Espessura do tecido de granulação (µm)	-	-	-	-	423,83 ± 43,80	514,74 ± 51,10*
Vv das fibras elásticas (%)	30 ± 5,29	37,33 ± 3,21*	27,80 ± 2,86	27,67 ± 3,79	33 ± 4,58	32 ± 1,58
Vv do tecido de granulação (%)	-	-	-	-	39,67 ± 7,64	51,20 ± 4,97*
Vv do colágeno no tecido de granulação (%)	-	-	-	-	-	21 ± 3,87

* Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

uma vez que não foram encontradas neoformações colágenas nos animais do GII.

DISCUSSÃO

As lesões térmicas, popularmente chamadas de queimaduras, provocam um tipo de lesão de origem física, através do calor, resultando em ablação com desnudamento da epiderme e exposição da derme, além de desnaturação proteica com necrose de coagulação do colágeno dérmico. Estas lesões determinam o desencadeamento dos mecanismos de reação inflamatória, sendo os primeiros sinais a congestão, manifestada pelo eritema, e edema dos tecidos lesados²⁰.

Pesquisas realizadas com animais de experimentação mostram que lesões térmicas em diferentes regiões corpóreas respondem de maneira diferente, tanto do ponto de vista patológico quanto fisiológico²¹. No presente estudo, padronizou-se a realização de uma lesão térmica apenas na região dorsal do animal, a fim de realizar uma análise comparativa das alterações que ocorrem, tanto na superfície externa, submetidos ou não ao tratamento com biomembrana de látex natural.

Por meio dos resultados, verificou-se que o protocolo utilizado para LTE comprometeu toda a epiderme, a derme papilar e o terço superior e médio da derme reticular. O tempo e a temperatura de eleição (10 segundos; 85°C) promoveram alterações graves nessas regiões, caracterizando uma queimadura de segundo grau, com reparação tecidual do tipo crônico e extensão do dano considerado como "ferida com perda parcial"²².

Clinicamente, a aparência imediata do ferimento de queimadura pode fornecer um indicativo da profundidade da lesão. Assim, uma área pós-escaldamento rosada é indicativo de um ferimento mais superficial; por outro lado, um ferimento cuja área mostra-se esbranquiçada, mas não empalidecida, indica uma lesão mais profunda²³. No caso do modelo aqui utilizado, este último aspecto foi observado quando, imediatamente após a LTE, a área em questão apresentou-se elevada e esbranquiçada, circundada por uma zona hiperêmica, reforçando ainda mais a hipótese da formação de um ferimento de segundo grau. Diversos eventos são notados imediatamente após a LTE, tais como uma vasoconstrição por 5 (cinco) a 10 minutos, retração e perda de conexões das células endoteliais, e aumento da permeabilidade vascular (permitindo a passagem, para a ferida, de plasma, eritrócitos e leucócitos)⁶.

No presente estudo, a área lesada dos animais do GII que, do segundo ao quarto dia, exibiu um aumento progressivo de flictenas com eliminação de uma secreção levemente viscosa corrobora com a afirmação de que elementos sanguíneos extravasam para a ferida. À medida que as camadas mais superficiais da epiderme são eliminadas, restauram-se as camadas mais profundas por divisão celular^{20,24,25}. Tais características foram aqui verificadas por meio das análises por MEV, detectando-se uma descamação da camada mais superficial da epiderme (córneia), corroborando com as descrições

dos autores mencionados anteriormente, os quais descrevem a contínua renovação da epiderme, à medida que as células superficiais esfacelam em flocos.

A junção entre a epiderme e a derme é irregular. As papilas dérmicas que se encaixam em reentrâncias da epiderme (cristas epidérmicas) possuem função de aumentar a coesão entre ambas²⁶. Tais características não foram verificadas nitidamente na pele do rato. Além disso, a profundidade da LTE lesou gravemente o terço superficial da derme nos animais do GII, exibindo um tecido com aparência necrótica, como descrito na literatura²².

Histologicamente, a derme de roedores é constituída por tecido conjuntivo denso formado por fibras colágenas dos tipos I e III e pequena quantidade de fibras elásticas²⁴. Apresenta, ainda, um estrato superficial (camada papilar) e outro profundo (camada reticular), onde não se observa, nesses animais, uma divisão clara entre ambas, por meio de métodos histológicos convencionais. Nossos resultados mostraram uma reorganização da derme muito mais rápida e melhor nos animais tratados com a biomembrana de látex natural, quando comparados aos animais do GII. A histomorfometria e estereologia levaram a uma avaliação positiva acerca da maior espessura do tecido de granulação no GIII (após 14 dias), por apresentar maior densidade de vasos neoformados e um equilíbrio entre as fibras colágenas dos tipos I e III, aspectos estes semelhantes ao verificado nos animais controle, assim como aos efeitos terapêuticos descritos com o uso dessa membrana^{6,26}.

Nos animais do GIII (após 14 dias), o tecido de granulação mostrou-se mais basófilo, sendo facilmente distinguido dos demais tecidos da derme, inclusive por apresentar uma aparência mais celular, conforme descrito no modelo suíno com queimadura hipertrófica²². Por volta do segundo ou terceiro dia pós-LTE, ocorre uma reparação do tecido conjuntivo, com a migração e divisão das células endoteliais e a formação do tecido de granulação constituído por colágeno, fibronectina e ácido hialurônico, com densa infiltração de macrófagos, células endoteliais capilares e, principalmente, fibroblastos. As primeiras fibras de colágeno produzidas pelos fibroblastos surgem após quatro a cinco dias e o espaço da ferida é preenchido rapidamente por pequenos feixes orientados ao acaso, que aumentam gradativamente, dando origem a uma estrutura densa e consistente, que une firmemente os tecidos lesados²⁷, de modo que, no décimo dia pós-lesão já se apresenta metade do número total de células.

Dois ou três dias após o ferimento, continuando nas próximas duas a três semanas, diferencia-se no tecido de granulação os miofibroblastos, os quais apresentam capacidade contrátil, reduzindo a área cruenta da lesão facilitando a epitelização²⁸. Por meio da MEV, principalmente nos animais do GIII (após 14 dias), observou-se uma neovascularização acentuada, bem como proliferação de tecido colágeno, com predomínio e aumento da espessura da área tratada, corroborando com os dados da literatura acerca dos processos de reepitelização com relação à utilização da biomembrana de látex natural.

Os resultados mostraram, ainda, que a LTE provocou uma interrupção do crescimento dos folículos pilosos, com atrofia folicular e alopecia. Interessante é que, apesar da LTE ter alterado o crescimento dos folículos pilosos, os animais do GIII, tiveram discreta retomada do crescimento folicular, o que pode ter sido uma resposta ao tratamento realizado com a biomembrana de látex natural, provocando maturação mais rápida do tecido conjuntivo e, assim, estimulando o crescimento folicular.

Em estudo com a técnica de Picro-sirius sob luz polarizada, sobre o efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação tecidual em ratos²⁹, verificou-se, após o 14º dia, processos de remodelação das estruturas de epiderme e derme mostrando fibras de colágeno em fase de reorganização e aparente neoformação de vasos sanguíneos, características importantes para a cicatrização de feridas. Outro estudo com a mesma técnica avaliando a morfologia e histoquímica da pele de ratas hipotireóideas castradas e não castradas, mostrou, claramente, as alterações do colágeno em razão da LTE. Houve diminuição, desarranjo e até mesmo o desaparecimento de determinados tipos de colágeno, o que comprova a inibição da síntese, maturação e renovação do mesmo devido às alterações hormonais provocadas pela queimadura²⁴.

Os dados apresentados demonstraram que na região da derme papilar dos animais do GI, as fibras colágenas seguem paralelas à superfície epitelial. Em todas as regiões da derme reticular, foram verificadas fibras colágenas mais espessas (tipo I) orientadas em todos os ângulos e entrelaçadas em um arranjo tridimensional. Na derme dos animais do GI, as fibras colágenas preencheram quase toda a matriz extracelular de forma bastante homogênea, cedendo espaço apenas para os folículos pilosos e glândulas sebáceas. Nos animais do GII, estas fibras estavam estruturalmente alteradas, compactadas e mais delgadas. Os aspectos referentes ao tecido colágeno, principalmente no GIII (após 14 dias), onde houve um espessamento da derme papilar e reticular superficial, se deve à neoformação colágena, corroborando com as descrições relativas ao processo de reparação tecidual e amadurecimento do colágeno, o qual é responsável pelo espessamento das áreas lesadas no período de cicatrização^{20,30}.

Nos animais do GII e GIII após 14 dias, verificou-se aumento do espessamento do tegumento, porém, este mostrou-se mais acentuado nos animais tratados com a biomembrana de látex natural. Especificamente neste grupo, observou-se aumento de fibras colágenas do tipo III, sugerindo maturação do tecido de granulação e intensa produção de colágeno. Contrariamente, nos animais do GII, embora a pele tenha se espessado, na região correspondente ao tecido de granulação, as fibras colágenas estavam praticamente ausentes. A área superficial de colágeno coagulado presente nas lesões é mais endurecida, de difícil fixação, processamento e corte, inviabilizando, por vezes, alguns preparos histológicos²⁰, fato este também observado durante a preparação das amostras aqui estudadas.

Os resultados mostraram ainda uma homogeneização do colágeno da derme reticular superficial e perda da sua afinidade tintorial à hematoxilina e eosina, bem como em outros corantes, assim como reportado na literatura analisada²⁰. O colágeno, por ser o tipo mais abundante de proteína do organismo, representando 30% do seu peso seco, certamente sofre com lesões físicas provocadas pelo calor. Desta forma, principalmente na derme dos animais queimados, estas fibras apresentaram-se com aspecto fundido e compactado, provavelmente devido à desnaturação proteica que estas fibras sofreram devido à LTE, corroborando com estudos anteriores²⁹.

Os animais do GIII apresentaram padrão semelhante em relação ao surgimento da birrefringência dos tecidos, indicando que o tecido nesses animais atingiu maturação e orientação macromolecular precocemente em relação aos animais do GII, o que permite inferir um atraso na reparação tecidual deste último grupo. Este fato foi anteriormente descrito em estudos com radioproteção²⁹. Nos animais do GII após 4 dias da lesão, as fibras elásticas adensaram-se no terço médio da derme, a ponto de ser possível considerar a formação de uma verdadeira camada constituída por essas fibras. Com o aumento da temperatura, tanto as fibras colágenas como as fibras elásticas se deterioram. Todavia, o importante a ser ressaltado é que, com a utilização da biomembrana de látex natural, ficou evidente a regeneração do tecido colágeno e do sistema de fibras elásticas, que se mostraram mais celular no quarto dia e quase completamente regenerado no décimo quarto dia, assemelhando-se ao final do período analisado à estrutura da pele dos animais controle.

REFERÊNCIAS

1. Moreira SS, Macedo AC, Nunes BB, Brasileiro FF, Guarizzo J, Gozzano R, et al. Implantação de nova tecnologia para otimização do atendimento em ambulatório de queimados, sem adição de custos. *Rev Bras Queimaduras*. 2013;12(2):87-102.
2. Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns. Introduction. *BMJ*. 2004;328(7452):1366-8.
3. Costa DM, Abrantes MM, Lamounier JA, Lemos ATO. Estudo descritivo de queimaduras em crianças e adolescentes. *J. Pediatr (Rio de J)*. 1999;75(3):181-6.
4. Oliveira KC, Penha CM, Macedo JM. Perfil epidemiológico de crianças vítimas de queimaduras. *Arq Med ABC*. 2007;32(supl. 2):555-8.
5. Oliveira F. Características histoquímicas das fibras musculares do músculo gastrocnêmico de ratos Wistar desnutridos submetidos à lesão térmica por escaldamento [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas; 2006. 140p.
6. Ablá LEF, Ishizuka MMA. Fisiopatologia das Feridas. In: Ferreira LM. Manual de cirurgia plástica. São Paulo: Atheneu; 1995. p.5-11.
7. Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG, Shepherd JP. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995;53(4):442-7.
8. Cesaretti IUR. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. *Pelle Sana*. 1998;2:10-2.
9. Mrué F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães [Tese de doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2000. 112p.
10. Sader SL, Coutinho Netto J, Barbieri Neto J, Mazzetto AS, Alves Junior P, Vanni JC, et al. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2000;15(4):338-44.

11. Frade MA, Valverde RV, de Assis RV, Coutinho-Netto J, Foss NT. Chronic phlebotopic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *Int J Dermatol*. 2001;40(3):238-40.
12. Freitas MAS. Avaliação da prótese de látex natural como remendo em arterioplastias femorais. Estudo experimental em cães [Tese doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina; 2001. 90p.
13. Oliveira JAA, Hyppolito MA, Coutinho-Netto J, Mrué F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69(5):649-55.
14. Alves de Sousa LC, Ribeiro de Toledo Piza M, Coutinho-Netto J, Ruiz DB, Schmidt VB. Latex biomembrane: a new method to coat the open cavity in tympanomastoidectomies. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007;73(3):331-6.
15. Pinho ECCM, Sousa SJF, Schaud F, Lachat JJ, Coutinho-Netto J. Experimental use of latex biomembrane in conjunctival reconstruction. *Arq Bras Oftalmol*. 2004;67(1):27-32.
16. Azôr AF. Tratamento de peritoniotomia com biomembrana de látex natural – Estudo experimental em coelhos [Tese doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2004. 96p.
17. Paulo NM, Júnior JTS, Fleury LFF, Santana FJF, Oliveira LF, Lima FG, Borges AC, Theles TC. Látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*) sem polilissina e tela de marlex na reconstrução da parede abdominal de ratos. Resumos do 1º Congresso de Cirurgia da Zona da Mata Mineira. Juiz de Fora; 2004.
18. Walker HL, Mason AD Jr. A standard animal burn. *J Trauma*. 1968;8(6):1049-51.
19. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987;147(Pt 3):229-63.
20. de Noronha L, Chin EW, Menini CM, Knopfholz J, Rampazzo JC, Graf R. Histopathologic and morphometric evaluation of the skin abnormalities induced by erbium:YAG and carbon dioxide lasers in 10 patients. *Plast Surg*. 2001;108(5):1380-8.
21. Hinrichsen N, Birk-Sørensen L, Gottrup F, Hjortdal V. Wound contraction in an experimental porcine model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1998;32(3):243-8.
22. Cuttle L, Kempf M, Phillips GE, Mill J, Hayes MT, Fraser JF, et al. A porcine deep dermal partial thickness burn model with hypertrophic scarring. *Burns*. 2006;32(7):806-20.
23. Papp A, Kiraly K, Härmä M, Lahtinen T, Uusaro A, Alhava E. The progression of burn depth in experimental burns: a histological and methodological study. *Burns*. 2004;30(7):684-90.
24. Ferreira E, Serakides R, Nunes VA, Gomes MG, Silva CM, Ocarino NM, Ribeiro AFC. Morfologia e histoquímica da pele de ratas hipotireóideas castradas e não castradas. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2003;55(1):51-60.
25. Eurell JA, Frappier BL. *Dellmann's textbook of veterinary histology*. Ames: Blackwell Publishing; 2006.
26. Mendes Júnior ECS, Viterbo F, Rosa CS. Análise histológica e morfométrica da área cruenta tratada com membrana de silicone: estudo em ratos. *Rev Assoc Med Bras*. 2007;53(5):395-400.
27. Majno G. Maude Abbott Lecture--1991. The capillary then and now: an overview of capillary pathology. *Mod Pathol*. 1992;5(1):9-22.
28. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-28.
29. Tujji FM, Almeida SM, Bóscolo FN, Manzi FR. Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação tecidual em ratos. *Radiol Bras*. 2005;38(5):359-64.
30. Hallock GG, Rice DC. Comparison of the contact neodymium:YAG and carbon dioxide lasers for skin deepithelialization. *Plast Reconstr Surg*. 1993;91(6):1134-9.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.