



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

**JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA**

**EFEITOS DA MITOMICINA-C TÓPICA EM QUEIMADURA DE  
CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA  
2010**

JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA

**EFEITOS DA MITOMICINA-C TÓPICA EM QUEIMADURA DE  
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia.

**Orientador:** Prof. Dr. José Alberto Dias Leite

**Coorientador:** Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru

**Pesquisador:** Charles Jean Gomes de Mesquita

R672e Rocha, José Lima de Carvalho  
Efeitos da mitomicina –C tópica em queimaduras de  
camundongos /José Lima de Carvalho Rocha. 2010.  
53 f.; Il. Color. Enc.

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite  
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará,  
Departamento de Cirurgia, Fortaleza, 2010

1. Cicatrização
2. Queimadura
3. Mitomicina-C I. Leite,  
José Alberto Dias (orientador) II. Universidade Federal do  
Ceará – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em  
Cirurgia III. Título

CDD 617.11061

JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA

## **EFEITOS DA MITOMICINA- C TÓPICA EM QUEIMADURA DE CAMUNDONGOS**

Esta Dissertação foi submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Cirurgia, outorgado pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Aprovada em: 26/02/2010

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Alberto Dias Leite (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Antônio Ribeiro da Silva Filho  
Faculdade de Medicina Christus

---

Prof. Dr. Antônio Wilson Vasconcelos  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

*Aos meus pais, Roberto e Maria Lúcia, que sempre me incentivaram no hábito da leitura e a ter a curiosidade de procurar e encontrar respostas para as diversas situações que a vida oferece.*

*Para Valéria, minha esposa, meus filhos e meus irmãos que estimularam e possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, muitas pessoas deram sua contribuição; citar a todas não é possível. Algumas são citadas representando todas as outras, que têm minha gratidão.

Ao **Professor Doutor José Alberto Dias Leite**, orientador desta dissertação, que desde o início mostrou-se incansável no estímulo, orientação e procura pelas verdades científicas aqui existentes.

Ao **Pesquisador e Mestre Charles Jean Gomes de Mesquita**, por todos os ensinamentos brilhantemente passados, por todo incentivo e por ser, além de tudo, meu amigo.

Ao **Professor Doutor Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru**, por me ensinar a usar o programa genialmente desenvolvido por ele, por ajudar na análise dos resultados, e em aceitar participar da Banca Examinadora deste trabalho.

À **Professora Doutora Maria Luzete Costa Cavalcante**, por todo o apoio, por sua essencial contribuição, em ter aceitado participar do exame de qualificação desta pesquisa, por ter-me orientado, especialmente nos momentos em que mais precisei.

Ao **Professor Doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela competência com que desenvolve suas atividades.

Ao **Professor Doutor José Telmo Valença Júnior**, Patologista, pesquisador, que ajudou a avaliar os cortes histológicos desta pesquisa.

Ao **Professor Antônio Edson de Alencar Libório**, que prontamente e com muita competência fez a revisão ortográfica e traduziu para o inglês esta Dissertação.

À Bibliotecária Sra. Tuscelda Barbosa Coutinho, chefe da biblioteca da Faculdade Christus, que muito ajudou na preparação das referências bibliográficas e na revisão desta Dissertação.

À Sra. Maria José Raposo Rodrigues, Coordenadora dos Laboratórios de Saúde e Biotério da Faculdade de Medicina Christus pelo apoio, disponibilidade e dedicação com que executa suas atividades.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Christus, em especial ao técnico de laboratório Francisco Wellington da Silva, por toda a paciência e dedicação, por ter-me ensinado tudo o que foi possível a respeito dos laboratórios, ao José Erinaldo Gomes de Sousa, por preparar as lâminas histológicas com o desejado esmero.

Aos acadêmicos de Medicina, José Alberto Dias Leite Filho e Janaína Gonçalves da Silva Leite, que, espontaneamente, ajudaram na confecção das fotos das lâminas, parte tão essencial do trabalho.

Às senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, pela prestimosa ajuda no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

À Sra. Sheila Peixoto dos Santos Furtado que, com boa vontade e paciência, digitou e formatou este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, pelos ensinamentos ministrados.

A todos os amigos, que me incentivaram, entenderam muitas vezes minha ausência, que torceram para que este projeto, tão importante para mim, fosse efetivado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo importante apoio financeiro na realização desta pesquisa.

À Faculdade Christus, pela infraestrutura cedida, cujo apoio tornou possível a realização deste estudo.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.

“Uma descoberta consiste em ver o que todo mundo já viu e pensar o que ninguém pensou”.

Albert Von Szent-Györgyi Nagrapolt.  
Prêmio Nobel de Medicina, 1937.

## RESUMO

### EFEITOS DA MITOMICINA- C TÓPICA EM QUEIMADURA DE CAMUNDONGOS

JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite. Coorientador: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru. Pesquisador: Charles Jean Gomes de Mesquita.

Atualmente, grande parte das investigações são dirigidas para a análise de mediadores da resposta imuno-inflamatória local e sistêmica após a agressão térmica. A Mitomicina-C (MMC), um antibiótico isolado do *Streptomyces caespitosus*, é utilizado clinicamente para diminuir o processo de cicatrização de feridas, devido a sua ação antiproliferativa em fibroblastos *in vitro*. Produziram-se queimaduras dérmicas em quarenta e oito camundongos *Swiss albino* utilizando-se um ferro de solda modificado, aplicado à pele por nove segundos. No primeiro dia (D0) a queimadura foi submetida a tratamento tópico, em dose única, com SF 0,9% (controle) ou Mitomicina-C (MMC). Avaliaram-se os efeitos da MMC na cicatrização de queimaduras utilizando-se métodos macroscópicos, microscópicos e computacionais no 4º dia (D4), 7º (D7), 14º (D14) e 21º pós-queimadura (D21PQ). Na análise macroscópica, utilizou-se escala visual analógica (EVA), e planimetria digital; nas microscópicas, as amostras de pele foram coradas pela *picrosirius red* (PR) analisadas à microscopia de luz polarizada, quantificando-se a densidade do colágeno tipo I e tipo III. Os parâmetros biométricos não evidenciaram efeitos deletérios sobre o estado nutricional dos animais. A EVA demonstrou que as feridas do grupo MMC exibiram melhor aparência significativa que as do grupo controle no D14PQ com  $p=0,0002$ . A taxa média de migração das margens das feridas (TMM) evidenciou menor valor no grupo MMC, sendo diferença bastante significativa ( $p=0,0033$ ). A morfometria do processamento de imagem assistida por computador evidenciou que o colágeno tipo I teve um comportamento decrescente de deposição no grupo controle; já no grupo tratado com MMC, foi crescente entre D4 e D14, decrescendo entre D14 e D21. Da mesma forma constatou-se uma diferença significativa entre os grupos no D14 e bastante significativa no D21 na quantidade de colágeno tipo III das feridas do grupo MMC, o que evidencia a capacidade da MMC de retardar a transformação do colágeno imaturo (tipo III) em maturo (tipo I). A MMC foi eficaz em retardar a maturação da ferida por queimadura térmica, gerando menor quantidade de fibrose.

**Palavras-chave:** Cicatrização de feridas, queimadura, Mitomicina-C, colágeno, fibroblasto, processamento de imagem assistida por computador.

## ABSTRACT

**EFFECTS OF TOPICAL MITOMYCIN-C IN THERMAL BURNS OF MICE.** JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA. Master's thesis. *Stricto Sensu* Post-Graduation Programme in Surgery. The Federal University in the State of Ceará, Brazil. Advisor: Professor Doctor José Alberto Dias Leite. Co-Guide teacher: Professor Doctor Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru. Researcher: Charles Jean Gomes de Mesquita.

Many research works which are currently being carried out are driven towards the analysis of the mediators of the local and systematical immune inflammatory response after episodes of thermal aggression. Mitomycin-C (MMC), an insulated antibiotic of the *Streptomyces caespitosus* kind is used clinically in order to shorten the wound healing process due to its anti-proliferation action in fibroblasts *in vitro*. Dermal burns were produced on forty eight *Swiss albino* mice as a result of using an adapted iron-welding device which inflicted burns upon the back dorsum of the cavies for a lapse of time of nine seconds. On the first day the burns received topical treatment in a single dose with 0.9% sterile isotonic saline (control) or Mitomycin-C (MMC). The effects of MMC in the healing process of the burns were evaluated by using macroscopic, microscopic and computerized methods on the 4<sup>th</sup> day (PBD 4), 7<sup>th</sup> (PBD 7), 14<sup>th</sup> (PBD 14) and on the 21<sup>st</sup> post-burn day (PBD 21). For the macroscopic analysis an analogical visual scale (AVS) and a digital planimetry were used. On the microscopic analysis, the samples of the skin were colored by picrosirius red (PR) and analyzed at a microscope under a polarized light and the quantification of the collagen type I and III was carried out. The biometric parameters did not evidence any harmful effects over the nutritional conditions of the animals. The AVS evidenced that the wounds of the MMC group presented a significant better look than those of the control group in the PBD 14 ( $p= 0.0002$ ). The wound edge migration rates (WEMR) evidenced a smaller rate in the MMC group than those of the control group, with significant difference ( $p =0.0033$ ). The morphometry of the image processing, computer-assisted showed that the collagen type I presented a decreasing behavior in the process of healing in the control group, whereas in the group which was treated with MMC there was growth between PBD 4 and PBD 14 and a decrease between PBD 14 and PBD 21. Likewise, there was a significant difference among the groups on PBD 14 and a quite significant difference on PBD 21 in the amount of collagen type III on the wounds of the MMC, which evidences the capacity of MMC in slowing down the transformation of the immature collagen (type III) into a mature one (type I). MMC has proved to be efficacious in slowing the maturation of the wounds caused by thermal burns, thus generating a minor amount of fibrosis.

**Key-words:** Wound healing, burns, Mitomycin-C, collagen, fibroblast, image processing, computer-assisted.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	- Medicamentos e seringas utilizadas para indução anestésica.....	21
<b>FIGURA 2</b>	- Molde vazado para marcação das áreas a serem submetidas à queimadura .....	22
<b>FIGURA 3</b>	- Delimitação das áreas a serem submetidas à queimadura .....	22
<b>FIGURA 4</b>	- Ferro de soldar modificado e termostato .....	23
<b>FIGURA 5</b>	- Escala Visual Analógica (EVA) .....	25
<b>FIGURA 6</b>	- Demarcação na tela do computador para mensuração da área e perímetro das feridas utilizando programa de análise de imagem	26
<b>FIGURA 7</b>	- Microfotografia exemplificando os pontos selecionados para realizar o exame histológico e morfométrico da área cruenta.....	27
<b>FIGURA 8</b>	- Aspecto das fibras colágenas coradas pelo <i>picrossirius red</i> antes e após a polarização .....	28
<b>FIGURA 9</b>	- Quantificação do colágeno tipo I em imagens capturadas de lâminas sob picrossirius-polarização pelo Sistema de Análise Morfométrica .....	29
<b>FIGURA 10</b>	- Quantificação do colágeno tipo III em imagens capturadas de lâminas sob picrossirius-polarização pelo Sistema de Análise Morfométrica .....	30
<b>FIGURA 11</b>	- Curva de evolução ponderal dos camundongos <i>Swiss albino</i> nos dias D0 e D4, D7, D14 e D21 pós-queimadura conforme o grupo de tratamento .....	33
<b>FIGURA 12</b>	- Feridas no D4PQ evidenciando zona de coagulação central, edema e uma área de isquemia ainda mal definida .....	34
<b>FIGURA 13</b>	- Feridas no D7PQ. Notar a maior definição da zona de necrose central após a remoção das crostas .....	34
<b>FIGURA 14</b>	- Camundongo do grupo CTRL no D14PQ. Nota-se uma fase de cicatrização mais avançada das feridas, que já exibem repilificação .....	35
<b>FIGURA 15</b>	- Camundongo do grupo MMC no D14PQ. Nota-se uma cicatrização mais retardada das feridas, que ainda exibem hiperemia e necrose central .....	35
<b>FIGURA 16</b>	- Camundongo do grupo CTRL no D21PQ. Nota-se uma cicatrização mais avançada das feridas, praticamente indistinguível da pele normal .....	36
<b>FIGURA 17</b>	- Camundongo do grupo MMC no D21PQ. Nota-se uma cicatrização mais retardada das feridas, em particular da mais cranial .....	36
<b>FIGURA 18</b>	- Evolução temporal da Escala Visual-Analógica (EVA) das feridas dos grupos CTRL e MMC .....	37

<b>FIGURA 19-</b>	Evolução temporal das áreas das feridas mensuradas por planimetria digital nos grupos CTRL e MMC .....	38
<b>FIGURA 20-</b>	Evolução temporal dos perímetros médios das queimaduras dos grupos CTRL e MMC .....	39
<b>FIGURA 21-</b>	Taxa média de migração das margens (TMM) dos grupos CTRL e MMC entre D0 e D21PQ .....	39
<b>FIGURA 22-</b>	Aspecto das fibras colágenas coradas pelo picosirius red antes e após a polarização nos D4, D7, D14, D21 .....	40
<b>FIGURA 23-</b>	Evolução temporal da densidade do colágeno tipo I nas feridas do grupo CTRL e MMC .....	41
<b>FIGURA 24 -</b>	Evolução temporal da densidade do colágeno tipo III nas feridas do grupo CTRL e MMC .....	42

## LISTA DE TABELAS

- 1 - Valores das medidas descritivas dos parâmetros biométricos e área da superfície corporal queimada inicial dos 24 camundongos Swiss *albino* do grupo controle, tratados com solução salina 0,9% no início do estudo ..... 32
- 2 - Valores das medidas descritivas dos parâmetros biométricos e área da superfície corporal queimada inicial dos 24 camundongos Swiss *albino* tratados com Mitomicina-C 0,5% no início do estudo ..... 32
- 3 - Variação ponderal dos camundongos nos dias D0 inicial, D4, D7, D14 e D21 pós-queimadura conforme grupo ..... 33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IFN	Interferon
MMC	Mitomomicina-C
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
UFC	Universidade Federal do Ceará
FMC	Faculdade de Medicina Christus
CTRL	Controle
CRA	Comprimento Rostro-Anal
ASCT	Área de Superfície Corporal Total
EVA	Escala Visual Analógica
TMM	Taxa Média de Migração das Margens
PP	Picrosirius-Polarização
SAMM	Sistema de Análise Morfométrica
SF	Soro Fisiológico
BMP	Bitmap
RGB	Red Green Blue
ASQ	Área de Superfície Queimada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Aspectos éticos</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Caracterização da amostra</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Ambiente de experimentação</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Anestesia e analgesia</b>	<b>21</b>
<b>3.5</b>	<b>Preparo pré-operatório</b>	<b>21</b>
<b>3.6</b>	<b>Produção de queimaduras</b>	<b>22</b>
<b>3.7</b>	<b>Distribuição dos grupos e aplicação dos tratamentos</b>	<b>23</b>
<b>3.8</b>	<b>Obtenção de fotografias</b>	<b>23</b>
<b>3.9</b>	<b>Análise biométrica</b>	<b>24</b>
<b>3.10</b>	<b>Análise macroscópica</b>	<b>24</b>
3.10.1	Escala Visual Analógica	24
3.10.2	Planimetria Digital	25
<b>3.11</b>	<b>Análise microscópica</b>	<b>26</b>
<b>3.12</b>	<b>Cronograma</b>	<b>30</b>
<b>3.13</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Parâmetros biométricos e percentagem de áreas queimadas iniciais</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação macroscópica das queimaduras</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise morfométrica do colágeno</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>48</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As queimaduras estão entre as condições mais devastadoras encontradas na Medicina, acompanhando a história do homem desde que ele aprendeu a controlar o fogo, há cerca de quinhentos mil anos. O termo “queimaduras”, no sentido amplo, denota tipos diferentes de lesões teciduais resultantes de processos físico-químicos diversos, tais como aquelas causadas por agentes térmicos, químicos, elétricos ou outros meios físicos como substâncias corrosivas ou radiações. Estima-se em 11 milhões as cicatrizes quelóidianas e hipertróficas e em 4 milhões as resultantes; de queimaduras e, destas, cerca de 70% em crianças (FERGUSON *et al.*, 1996). Segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, no Brasil acontece um milhão de casos de queimaduras a cada ano; destes, cerca de 200 mil são atendidos em serviços de emergência, e 40 mil demandam hospitalização. As queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no Brasil, perdendo apenas para outras causas violentas, que incluem acidentes de transporte e homicídios (VALE, 2005). Cicatrizes anormais podem provocar sintomas desagradáveis como dor, queimação, prurido e/ou serem desfigurantes e esteticamente inaceitáveis gerando consequências psicológicas, emocionais, sociais e financeiras que podem provocar deterioração da qualidade de vida (BAYAT; MCGROUTHER; FERGUSON, 2003).

O foco das pesquisas em queimaduras tem mudado consideravelmente nas últimas décadas: nos anos 60 e 70 elas eram centradas na fisiopatologia e no tratamento do choque hipovolêmico pós-queimadura, resultando em abordagem mais precoce e em métodos mais efetivos de controle de danos. Atualmente, grande parte das investigações é dirigida para a análise de mediadores da resposta imuno-inflamatória local e sistêmica, precoce e/ou tardia, subsequentes à agressão térmica, buscando identificá-los e avaliar o seu papel na modificação desta resposta. Uma vez superada a fase de ressuscitação inicial, a infecção é, hoje em dia, como no passado, a principal causa de morte em pacientes grandes queimados. Paralelamente, têm sido estudadas várias abordagens no tratamento de queimaduras de espessura parcial ou total, buscando prevenir sequelas e prover uma cura mais rápida. A maioria destas pesquisas, por razões técnicas e éticas, não

prescindem do uso de animais e, conseqüentemente, a busca de modelos animais adequados ao estudo da cicatrização persiste.

Uma das características primordiais durante o desenvolvimento de um modelo experimental de queimadura é tentar minimizar as variáveis que possam interferir na obtenção de resultados mais precisos e completos além de buscar a reprodução das condições fisiopatológicas da agressão, com o intuito de analisar suas repercussões locais e sistêmicas.

A pele é o principal órgão atingido pela queimadura térmica, servindo de barreira à transferência de energia para tecidos mais profundos, sofrendo lesões decorrentes do calor pelo contato direto e pela isquemia progressiva causada pela lesão. O nível de destruição tecidual está relacionado, dentre outros fatores, à temperatura, ao tempo de exposição, à espessura e irrigação da pele. O dano celular direto imediato resulta da desnaturação protéica e danos mais tardios resultam da resposta imuno-inflamatória ao trauma. Com relação à profundidade, as queimaduras podem ser classificadas da maneira clínica habitual em graus: sendo a de 1º grau, superficial, lesionando apenas a epiderme; de 2º grau superficial, lesão de espessura parcial superficial, atingindo a epiderme e as camadas mais superficiais da derme; de 2º grau profunda, lesão de espessura parcial profunda, atingindo a epiderme e as camadas profundas da derme, de 3º grau ou de espessura total, lesionando a epiderme, derme e tecido subjacente, e finalmente de 4º grau, atingindo estruturas mais profundas. A queimadura de 2º grau é considerada ideal para o estudo propriamente dito da cicatrização (LIMA JÚNIOR; SERRA, 2004).

O processo cicatricial é uma otimização evolucionária caracterizada por uma resposta inflamatória e imunológica rápida e compensatória que favoreceria a cura rápida das feridas, de forma a prevenir infecções, deiscência e a reparar o tecido lesado. A cicatriz é a resultante final da reparação tecidual ocorrendo em qualquer órgão ou sistema (AZULAY, 2008; BAYAT; MCGROUTHER; FERGUSON, 2003). A cicatrização deve ser vista como um processo dinâmico, interativo e não linear, arrolando mensageiros humorais e celulares que desencadeiam coagulação, inflamação, deposição e diferenciação da matriz extracelular, angiogênese, tecido de granulação, fibroblasia, epitelização, contração, remodelamento e maturação que

surge em resposta a uma agressão/trauma (ROBSON, 2003). Cicatrização sem cicatriz acontece apenas nas primeiras semanas de embriões mamíferos e a regeneração tecidual completa apenas em vertebrados inferiores, como as salamandras e em invertebrados (FERGUSON *et al.*, 1996; BERMAN; VILLA; RAMIREZ, 2004). Em mamíferos, a cicatrização se expressa em uma ampla gama de fenótipos clínicos, desde a cicatriz normal e fina até cicatrizes alargadas, atróficas, hipertróficas, quelóides e contraturas na pele. Estas três últimas podem ser agrupadas em um grupo que denominaremos “supercicatrização”. A hiperproliferação tecidual ocorre em outras condições como cirrose hepática, glomerulonefrite, estenose de vias biliares ou de traquéia, bridas intestinais e aderências tendinosas (ROBSON, 2003). Embora tais exemplos possam nos indicar o insulto inicial, hiperproliferação ocorre também na doença de Peyronie, contratura de Dupuytren, rinofima e encapsulamento periprotético, dentre outros nos quais não se pode traçar um caminho até o elemento desencadeador (ROBSON, 2003; HILMER; MACLEOD, 2002).

Existe uma miríade de opções terapêuticas para abordar a supercicatrização, que podemos dividir esquematicamente em não-invasivas e invasivas. No primeiro grupo podem ser utilizadas desde vestes e bandagens compressivas, faixas de gel de silicone, imobilizações mecânicas (talas, gesso) ou químicas (toxina botulínica), aplicação de óleos, loções e cremes, anti-histamínicos, hidroterapia, massagens até aconselhamento psicossocial (KELLY, 2004). A maioria dessas técnicas é de caráter empírico, carecendo de evidências fortemente embasadas em amplos ensaios clínicos bem desenhados que possam quantificar objetivamente seu benefício (BIGBY, 1998; BERMAN; VILLA; RAMIREZ, 2004). Dentre os tratamentos invasivos, a excisão e sutura intralesional ou extralesional, são os mais utilizados, de modo isolado ou associado a técnicas adjuvantes tais como injeção intralesional de corticóide de longa duração (Acetonido de Triancinolona) anti- inflamatórios não esteróides como a Pentoxifilina, bloqueadores dos canais de cálcio como o Verapamil®, quimioterápicos como a Bleomicina e 5-Fluorouracil (5-FU), Interferon (IFN), e outras ferramentas como radioterapia, laserterapia e criocirurgia (KELLY, 2004; BOUTLI-KASAPIDUO *et al.*, 2005; BERMAN; VILLA; RAMIREZ, 2004).

Mais recentemente o uso tópico de imunomoduladores como o Imiquimod e de quimioterápicos como a Mitomicina-C (MMC) vem sendo investigado experimental e clinicamente (MESQUITA *et al.*, 2010). A MMC é um antibiótico isolado do *Streptomyces caespitosus* por Wakaki e colaboradores em 1958 (MIYAMURA *et al.*, 1967; OBOSHI *et al.*, 1967). Solúvel em água e solventes orgânicos, sua molécula possui três grupos reconhecidamente carcinostáticos: um anel de aziridina, o grupo quinona e o grupo octano. É utilizado comumente em oncologia por meio de injeções intravenosas no tratamento de corioepiteliomas, sarcomas, seminomas e por contato direto em tumores de bexiga ou em derrames pleurais neoplásicos recidivados (RIBEIRO *et al.*, 2003). Trabalhos *in vitro* e *in vivo* demonstraram sua ação antiproliferativa em fibroblastos, sendo, atualmente, seu uso amplamente difundido em oftalmologia para controle da recidiva de pterígio, trabeculectomia e glaucoma e em otorrinolaringologia na prevenção e tratamento de estenose traqueal e em miringotomias (RIBEIRO *et al.*, 2003; PARK; BARBUL, 2004; MARNEROS; KRIEG, 2004). Na cirurgia plástica, cirurgia de cabeça e pescoço e dermatológica tem sido utilizada em estudos clínicos, porém com resultados conflitantes (TALMI *et al.*, 2005; SANDERS; GAGE-WHITE; STUCKER, 2005; KORMAN *et al.*, 2005).

A pele, enquanto maior órgão do corpo possui características biomecânicas, de elasticidade, de resistência tênsil e de regeneração que lhe são únicas (HABIF, 2009). Um fator de alto valor preditivo para o desenvolvimento de fibrose dérmica é a persistência de inflamação crônica nas queimaduras (MEDEIROS *et al.* 2010). Uma das lesões que mais induzem a hiperproliferação fibroblástica e, na maioria das vezes, a cicatrizes hipertróficas, quelóides, bridas e contraturas cutâneas, é a queimadura por hipertermia (BARBOSA *et al.* 2003). A padronização de um modelo animal ideal e capaz de mimetizar satisfatoriamente o quelóide, que é próprio da espécie humana (CABRAL *et al.*, 2003) encoraja-nos a realizar um trabalho *in vivo* utilizando Mitomicina-C tópica em camundongos submetidos a este tipo de lesão.

## **2 OBJETIVO**

Estudar o efeito da Mitomicina-C tópica na cicatrização de queimaduras térmicas em camundongos.

## **3 MATERIAL E MÉTODO**

### **3.1 Aspectos Éticos**

O estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA-UFC), Protocolo N<sup>o</sup> 51/07. Na redação do manuscrito foram aplicadas as regras do Guia Para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da UFC de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (COSTA *et al.*, 2007).

### **3.2 Caracterização da Amostra**

Foram utilizados quarenta e oito animais adultos, machos, de linhagem não-isogênica de camundongos *Swiss albino (Mus musculus)*, com aproximadamente 80 dias de idade pós-natal, pesando em média 32,28g e com comprimento médio de 9,5cm, bem nutridos, vermifugados e livres de ectoparasitas, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Christus (FMC), Fortaleza-CE.

### **3.3 Ambiente de Experimentação**

Os animais foram previamente submetidos a um período de adaptação de sete dias, sendo alojados em gaiolas individuais de polipropileno de 0,15 m<sup>2</sup> sob condições de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12h), temperatura (20-24°C), e ruídos controlados no Laboratório de Cirurgia Experimental da FMC. Os animais receberam ração comercial apropriada e tiveram livre acesso à água potável durante todo o experimento, que ocorreu no Laboratório de Cirurgia Experimental da FMC.

### 3.4 Anestesia e Analgesia

Nos diversos tempos do experimento, os animais foram submetidos à anestesia utilizando-se uma associação de Cetamina (50mg/kg) (Vetanarcol®, König do Brasil) e Xilazina (5mg/Kg) (Kensol®, König do Brasil) diluídos em soro fisiológico 0,9% (SF) estéril. A solução foi administrada por via intraperitoneal (IP) utilizando seringa com capacidade de 0,3 ml (BD Ultrafine® II) munida de agulha com 12,7 mm de comprimento e calibre 29G (Figura 1). O animal foi considerado anestesiado quando se apresentava imóvel ao manuseio com ausência de resposta a estímulos nociceptivos (*pick test*, reflexo córneo-palpebral) enquanto mantinha frequência e amplitude respiratórias normais. Para analgesia, utilizou-se uma associação de 500mg de paracetamol e 30mg de fosfato de codeína (Tylex® 30mg, Janssen Cilag Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP, Brasil) na proporção de um comprimido triturado e dissolvido em 500 ml de água potável, consumida por via oral durante as primeiras 72h de pós-operatório.

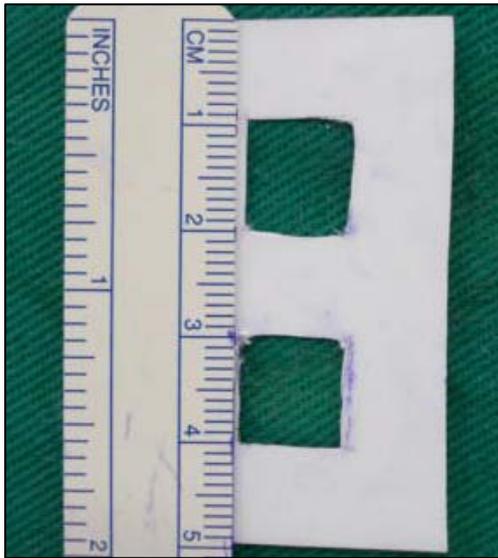


FIGURA 1– Medicamentos e seringas utilizadas para indução anestésica.

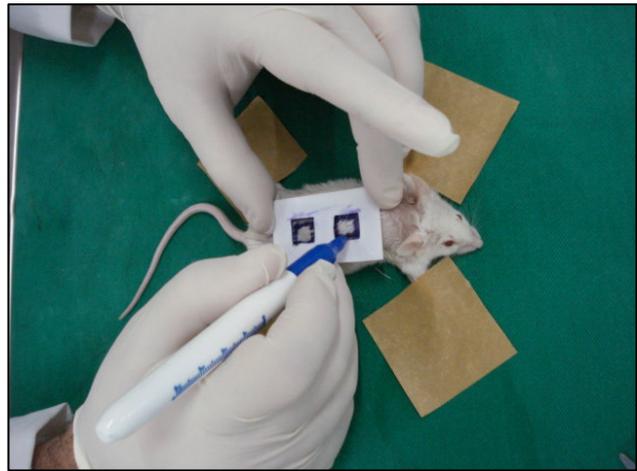
### 3.5 Preparo Pré-operatório

Três dias antes da indução da queimadura, os animais tiveram o dorso depilado do pescoço à raiz da cauda, incluindo flancos, utilizando barbeador elétrico. Imediatamente antes da realização da queimadura, os animais foram novamente tricotomizados, na extensão e maneira acima descritas, sendo a seguir colocados

em decúbito ventral sobre pranchetas cirúrgicas de aço inoxidável, previamente limpas com álcool, secas e protegidas por campo cirúrgico, fazendo-se em seguida antissepsia da pele com clorexidina a 2% (Riohex®, Ind. Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) e secagem com compressa de gaze. Demarcou-se na linha média dorsal do animal duas áreas de 10 x 10 mm, laterais, guardando a distância entre si de 10 mm, mediante a utilização de caneta dermográfica e de molde vazado confeccionado em plástico (Figuras 2 e 3).



**FIGURA 2** - Molde vazado para marcação das áreas a serem submetidas à queimadura.



**FIGURA 3** - Delimitação das áreas a serem submetidas à queimadura.

### 3.6 Produção das Queimaduras

Um ferro de soldar (Hikari®, 40 W) foi especialmente preparado para a produção das queimaduras. Na extremidade da haste do ferro foi acoplada uma placa fina quadrada de cobre com superfície de contato de 100 mm<sup>2</sup> e implantado um termossensor preparado para manter uma temperatura constante de 100°C (Figura 4). A extremidade do conjunto (ferro de soldar + cabo elétrico+ cabo do sensor, peso total de 90 g) foi colocada verticalmente em contato com a pele previamente demarcada, sem pressão adicional por 9 segundos cronometrados, sendo os cabos sustentados pelo pesquisador (MESQUITA *et al.*,2006). Imediatamente após cada queimadura, a área foi resfriada por 1 min utilizando gaze umedecida com SF estéril à temperatura ambiente (22-24 °C).



**FIGURA 4** – Ferro de soldar modificado e termostato.

### **3.7 Distribuição dos Grupos e Aplicação dos Tratamentos**

Mediante sorteio, os animais foram designados para tratamento tópico, em dose única, com SF a 0,9% com 1,5ml ou Mitomicina-C na concentração de 0,5mg/ml com 1,5ml, constituindo o grupo controle (CTRL) e experimento (MMC), respectivamente. As substâncias foram embebidas em gaze estéril e aplicadas diretamente na ferida durante 5 minutos, findos os quais, as feridas foram lavadas com SF em gotejamento intermitente por 5 minutos. A ferida foi mantida descoberta. O dia da queimadura foi denominado D0 e as aferições foram realizadas no 4<sup>o</sup> dia (D4), 7<sup>o</sup> (D7), 14<sup>o</sup> (D14) e 21<sup>o</sup> pós-queimadura (D21PQ). Nestas ocasiões foi feita escarotomia mecânica de todas as feridas utilizando-se gaze embebida em SF, procurando retirar apenas as crostas e preservar o tecido de granulação. Tal método de tratamento é considerado úmido-seco, não oclusivo, e de cicatrização dirigida por segunda intenção.

### **3.8 Obtenção de Fotografias**

Nos respectivos tempos (D4, D7, D14 e D21), os animais foram posicionados em decúbito ventral na mesa cirúrgica protegida por campo verde junto a uma régua milimetrada, opaca, e a seguir fotografados para análise macroscópica. As fotografias foram obtidas com câmera digital (SonyCybershot® DSC-W55, 7.1

Megapixels, Japão), no formato VGA (tamanho=640x480 *pixels*), montada sobre tripé com distância padronizada de 35 cm do dorso do animal.

### 3.9. Análise Biométrica

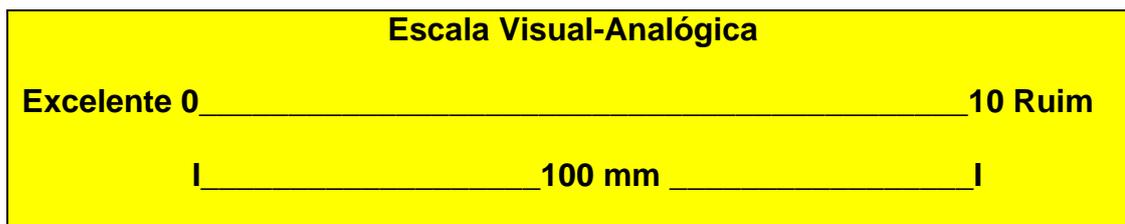
Foram sorteados seis animais e obtidos parâmetros biométricos no D0 e D21PQ. Nestas ocasiões, os animais anestesiados foram submetidos à aferição da massa (*p*) em gramas utilizando balança eletrônica digital de precisão (Toledo do Brasil, modelo 9094-1). O comprimento rostro-anal (CRA) em mm foi medido utilizando paquímetro analógico. A partir destes dados, calculou-se o índice de massa corpórea para camundongos ou índice de Lee:  $LEE = \text{peso (g)}^{1/3}/\text{CRA (cm)}$  (MESQUITA, 2008). Também foi calculada a área de superfície corporal total (ASCT) pela fórmula de Meeh:  $ASCT = k \times p^{2/3}$ , em que ASCT se expressa em  $\text{cm}^2$ ,  $k = 9,1$  e é uma constante adequada a camundongos (MEYER; SILVA, 1999). Estas mensurações foram utilizadas para avaliar se houve ganho ou perda de massa dos animais no decorrer do experimento.

### 3.10 Análise Macroscópica

Nos respectivos tempos (D4, D7, D14 e D21), as queimaduras foram analisadas clinicamente quanto à qualidade e à extensão da cicatrização, por meio de Escala Visual Analógica (EVA) adaptada de Beausang *et al.*(1998) e de planimetria digital computadorizada, utilizando-se de fotografias.

#### 3.10.1 Escala Visual Analógica

A EVA consiste de um segmento de reta medindo 100 mm sem identificação dos traços milimetrados, sendo estabelecido o ponto inicial (0) como o de melhor aparência e o final (10) como o de pior aparência. As fotografias das lesões foram analisadas por um cirurgião plástico, um cirurgião ortopédico e um estudante de medicina, todos “cegos” quanto ao tipo e tempo de tratamento, obtendo-se uma média das avaliações (Figura 5).



**FIGURA 5** – Escala Visual Analógica (EVA). Adaptada de Beausang *et al.* (1998)

### 3.10.2 Planimetria Digital

As imagens digitais foram enviadas a um computador Toshiba *Sattelite*, processador Pentium® *Dual Core* de 1,6 GHz, memória RAM de 2GB, HD de 160 GB, e foram transformadas em *bitmap*. As áreas de interesse foram determinadas e processadas utilizando-se o programa Image Tool 3.0 (UTHCSA. USA). Com o auxílio das ferramentas do programa, foi realizada a planimetria digital das fotografias importadas. As figuras foram submetidas à calibração para mm, sendo realizado o traçado do contorno de cada ferida/cicatriz utilizando-se o *mouse*. Por meio das ferramentas *Area* e *Distance* foram determinadas área (A) e perímetro (P) de cada queimadura (figura 6). Para quantificar a reparação, utilizou-se da taxa média de migração das margens (TMM) das feridas. A TMM que engloba os parâmetros reepitelização, contração e remodelação, independentemente do formato das feridas é obtida pela Equação de Gilman modificada:

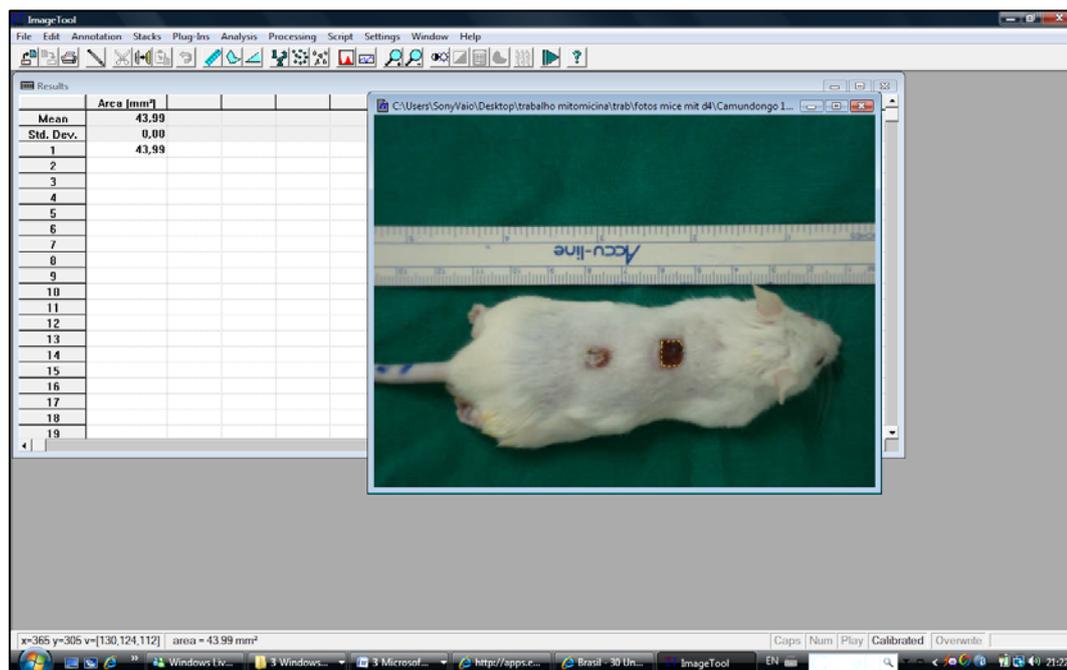
$$\text{TMM (mm}^2/\text{dia)} = \frac{\{(A_a - A_b) / [(P_a + P_b) / 2]\}}{(b - a)}$$

onde **A**= área da ferida (mm<sup>2</sup>)

**P**= perímetro da ferida (mm)

**a**= dia inicial

**b**= dia da observação final



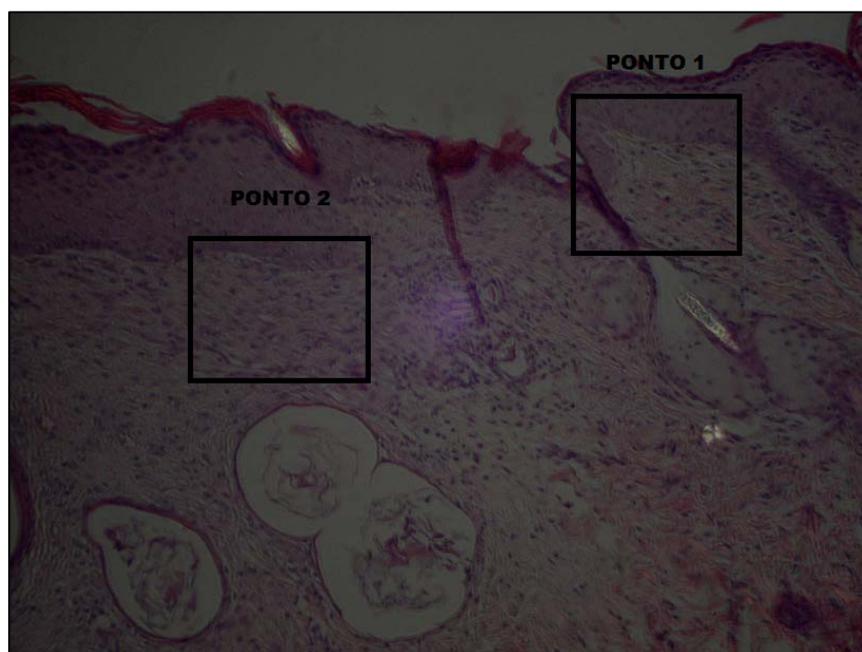
**FIGURA 6-** Demarcação na tela do computador para mensuração da área e perímetro das feridas utilizando programa de análise de imagem (Image Tool 3.0, UTHCSA,USA).

### 3.11 Análise Microscópica

Aleatoriamente, seis animais de cada grupo foram anestesiados e sacrificados com injeção intracardíaca de 2 ml de KCL a 19,1%, para coleta de amostras de pele no D4, D7, D14 e D21 PQ, de modo que se pudesse avaliar o curso da cicatrização. Foram retirados fragmentos de pele (20x20mm) incluindo a porção central de tecido contendo a ferida ou cicatriz circundada por tecido são, interessando pele, *paniculum carnosum* e gordura subcutânea com bisturi lâmina 15. Após remoção, as amostras foram divididas igualmente e agrupadas de acordo com os tipos e tempos de tratamento, sendo fixadas em formaldeído tamponado a 10% e enviadas para processamento histológico. Após inclusão em parafina, as peças foram levadas ao micrótomo e submetidas a cortes de 5 micrômetros de espessura. Uma vez montadas as lâminas foram coradas pelo vermelho da síria (*Sirius red*), acidificados pelo ácido pícrico (*picrossirius red*) e submetidos à análise da densitometria do colágeno pela picrossirius-polarização (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

### Análise microscópica pela picrossirius-polarização

As amostras coradas pelo *picrossirius red* (CUTTLE, *et al.*, 2005) foram submetidas a exame da birrefringência do colágeno por meio da picrossirius-polarização (PP). A técnica de coloração foi realizada de acordo com a rotina do laboratório de histopatologia da FMC. Das lâminas preparadas, oito delas foram selecionadas aleatoriamente e examinadas por grupo e dia de tratamento. Nestas lâminas, foram selecionados dois pontos para observação: Ponto 1 - início da área cruenta, transição entre a pele íntegra e o tecido de granulação; Ponto 2 – campo de observação mais superficial no leito da área cruenta. A figura 7 mostra estes pontos, na coloração *picrossirius red*.

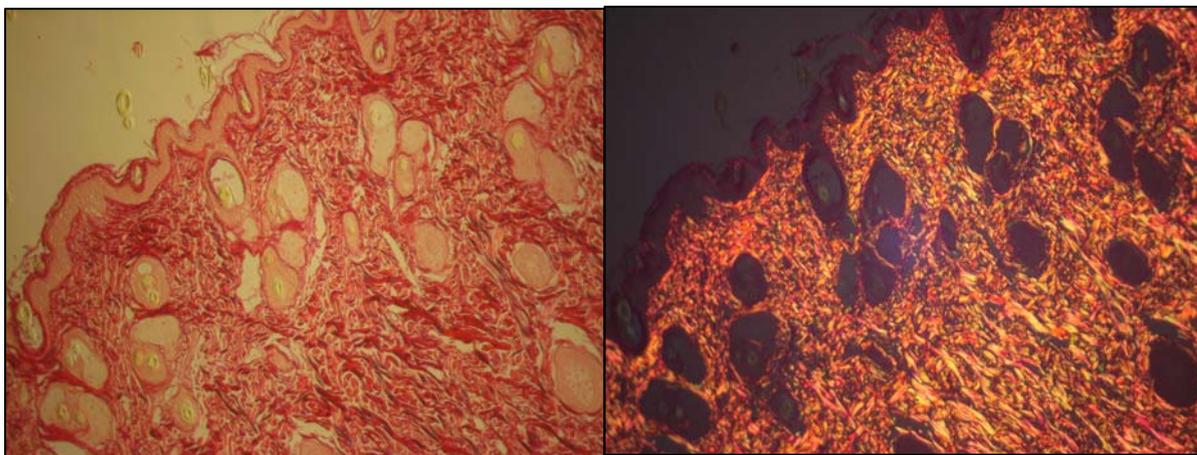


**FIGURA 7**– Microfotografia exemplificando os pontos selecionados para realizar o exame histológico e morfométrico da área cruenta (coloração *picrossirius red*, 100X).

Com o auxílio de programa analisador de imagens (Sistema de Análise Morfométrica, SAMM), um programa de computador desenvolvido especificamente para tal finalidade por Fecine (2006) foram realizadas medidas computadorizadas da quantidade e coloração dos feixes que apresentavam birrefringência em cada lâmina, sendo tais medidas transformadas em *pixels*. Essas medidas foram obtidas por meio da diferença de coloração detectada pelo programa analisador. As medidas foram executadas no tecido de granulação logo abaixo do epitélio em proliferação

(períodos iniciais, D4 e D7 PQ) e abaixo do epitélio imaturo (nos períodos mais avançados, D14 e D21PQ), sempre evitando áreas de tecido adiposo. A partir da execução das medidas, obteve-se a média em cada grupo de feridas pela análise estatística. Sob luz polarizada, as fibras de colágeno tipo I (maduro) foram identificadas por sua coloração vermelho-alaranjada e as fibras tipo III (imaturo) por sua coloração esverdeada (Figuras 8, 9 e 10).

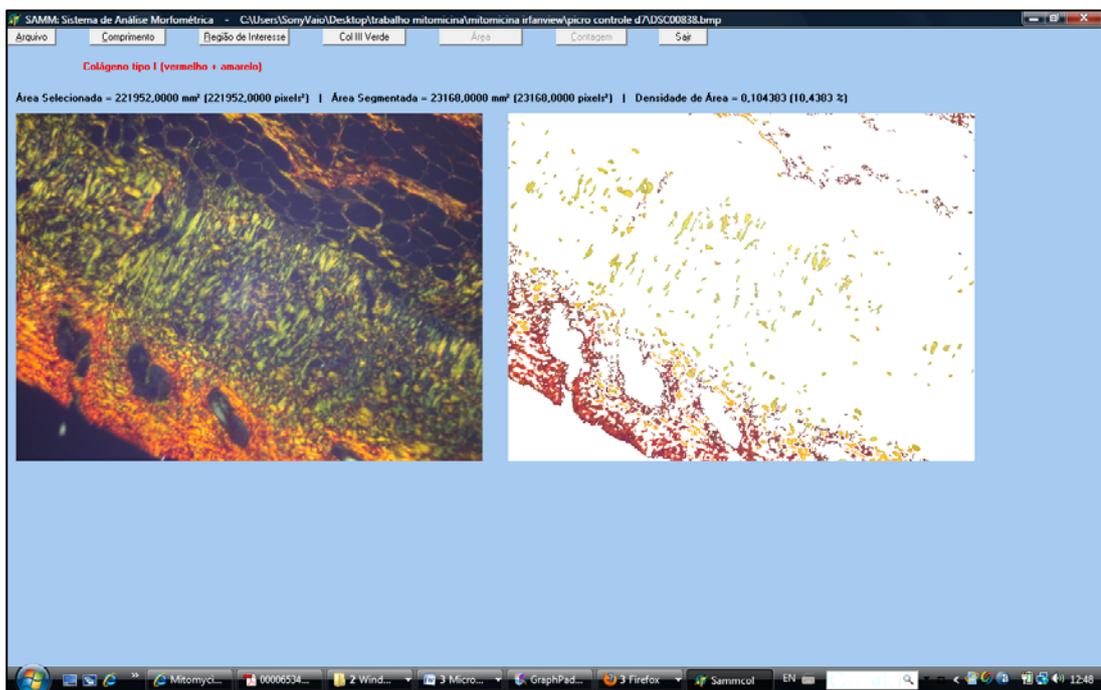
Imagens digitais das peças histológicas foram obtidas de forma padronizada mediante o uso de um microscópio óptico (N-200 T, Coleman, São Paulo, Brasil) equipado com um filtro de polarização e uma câmera digital (Cyber-shot DSC-W55, Sony Corp. Japão). Para evitar variações decorrentes do processo de captura das imagens, fixaram-se as configurações da câmera, assim como a intensidade da iluminação do microscópio. Os campos estudados corresponderam à fronteira de crescimento de pele nova e tecido subjacente ao leito da ferida. Imagens digitais dessas regiões foram capturadas com uma magnificação de 400 vezes e armazenadas no formato Windows<sup>®</sup> Bitmap (BMP), com as dimensões de 544 x 408 *pixels*, cada *pixel* correspondendo a 24 *bits*, de acordo com o modelo de cores RGB (*Red, Green, Blue*).



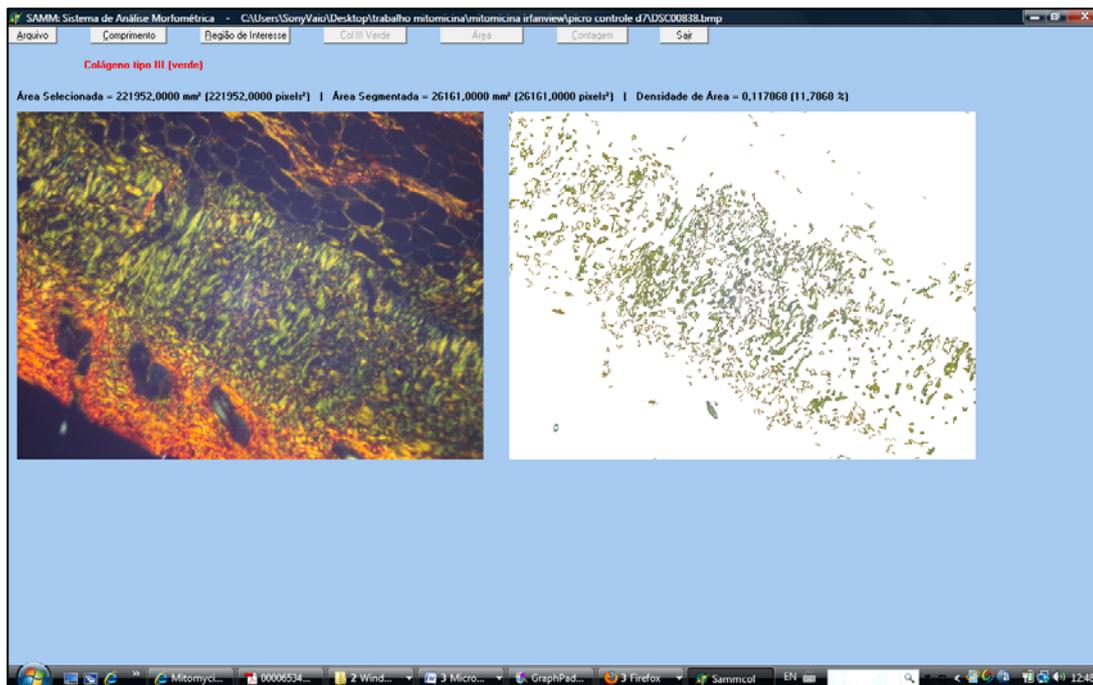
**FIGURA 8** – Aspecto das fibras colágenas coradas pelo *picosirius red* antes (imagem à esquerda) e após a polarização (imagem à direita) (aumento de 400X)

Para a quantificação do colágeno, o sistema foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores relativo à estrutura de interesse (fibras colágenas do tipo I e III), de acordo com a técnica histoquímica empregada (*picosirius red*). Tal procedimento habilitava o programa a identificar e segmentar

automaticamente as estruturas de interesse, separando-as dos demais componentes da cena. Todavia, uma segmentação interativa era também disponibilizada, possibilitando, assim, que o operador definisse novos parâmetros de segmentação, caso julgasse como inadequado o resultado do procedimento automático. Concluída a segmentação, o programa realizava a quantificação da estrutura de interesse em toda a imagem. Para tanto, determinava-se a densidade de área, que é definida pelo quociente entre a área ocupada pela estrutura de interesse e a área total do campo estudado, sendo expressa em termos percentuais (Figuras 9 e 10).



**Figura 9** - Quantificação do colágeno tipo I em imagens capturadas de lâminas sob picrossirius-polarização pelo Sistema de Análise Morfométrica (SAMM).



**Figura 10** – Quantificação do colágeno tipo III em imagens capturadas de lâminas sob picrossirius-polarização pelo Sistema de Análise Morfométrica (SAMM).

### 3.12 Cronograma

A composição dos grupos, cronograma de tratamentos, avaliações e coleta de amostras estão sumarizadas no quadro 1.

<b>CRONOGRAMA</b>			
<b>-3D- preparo pré-operatório</b>			
<b>D0 - Produção das queimaduras e aplicação dos tratamentos</b>			
<b>GRUPOS</b>			
<b>Grupo controle (CTRL) (n=24)</b>		<b>Grupo Mitomicina-C (MMC) (n=24)</b>	
Tratamento c/ soro fisiológico 0,9% 48 queimaduras na região dorsal Duas queimaduras/animal		Tratamento c/ Mitomicina-C 48 queimaduras na região dorsal Duas queimaduras/animal	
<b>Avaliação macroscópica</b>			
EVA (escala visual analógica) Planimetria digital			
<b>Eutanásia e dias de recolha de amostras</b>			
<b>Avaliação microscópica</b>			
PP (picrossirius-polarização)			
<b>D4</b>	<b>D7</b>	<b>D14</b>	<b>D21</b>

**QUADRO 1** – Composição dos grupos, cronograma de tratamentos, avaliações e coleta de amostras.

### 3.13 Análise Estatística

Para análise das variáveis quantitativas, realizou-se inicialmente o teste Kolmogorov-Smirnov, que verifica a normalidade da distribuição. Constatando-se a distribuição normal, calcularam-se para a estatística descritiva, a média e o desvio padrão, assim como foram empregados testes paramétricos para análise dos dados.

Comparações entre os grupos MMC e CTRL foram efetuadas mediante o uso do teste  $t$  de Student para amostras emparelhadas. No caso de variáveis ordinais, para comparação utilizou-se o teste U de Mann-Whitney ou o de Wilcoxon. A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada a um teste de comparações múltiplas (teste de Tukey) foi utilizada para comparar os grupos de tratamento.

Em todos os casos, fixou-se em 0,05% (5%) a probabilidade alfa do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como significativo estatisticamente um valor de  $p$  bicaudal menor que 0,05. Utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 for Windows® (GraphPad Software, INC., USA, 2007) para análise e elaboração dos gráficos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros Biométricos e Percentagem de Áreas Queimadas Iniciais

Entre os dois grupos de camundongos – controle (CTRL), tratado com solução salina 0,9%, e o grupo tratado com Mitomicina-C 0,5% (MMC), não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros biométricos [peso, comprimento rostro-anal (CRA), índice de massa corpórea (índice de Lee), área de superfície corporal total (ASCT)] nem entre o percentual da área submetida a queimadura (ASQ) no momento inicial (D0), quando avaliadas pelo teste t de Student ( $p > 0,05$ ). As medidas relativas dos parâmetros biométricos e ASQ dos animais dos grupos CTRL e MMC nesta fase do experimento estão representadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

**TABELA 1** - Valores das medidas descritivas dos parâmetros biométricos e área da superfície corporal queimada inicial dos 24 camundongos Swiss *albino* do grupo controle, tratados com solução salina 0,9% (grupo CTRL) no início do estudo.

VALORES	PESO (g)	CRA* (cm)	LEE* (g/cm <sup>2</sup> )	ASCT* (cm <sup>2</sup> )	ASQ* (%)
<b>Média</b>	32,28	9,4	33,88	101,20	1,99
<b>Desvio padrão</b>	4,34	0,55	2,10	8,9656	0,175
<b>Mediana</b>	30,8	9,4	33,64	98,26	2,04
<b>Mínimo</b>	26,8	8,6	30,73	89,55	1,65
<b>Máximo</b>	42	10,4	38,25	120,83	2,23

\* CRA = comprimento rostro-anal; LEE = índice de massa corpórea para camundongos ( $\text{peso (g)}^{1/3} / \text{CRA (mm)} \times 1000$ ); ASCT = área da superfície corporal total ( $K \cdot \text{peso}^{1/3}$ ,  $k=10$ ); ASQ = percentual da área de superfície corporal total queimada.

**TABELA 2** - Valores das medidas descritivas dos parâmetros biométricos e área da superfície corporal queimada inicial dos 24 camundongos Swiss *albino* tratados com Mitomicina-C 0,5% (grupo MMC) no início do estudo.

VALORES	PESO (g)	CRA* (cm)	LEE* (g/cm <sup>2</sup> )	ASCT* (cm <sup>2</sup> )	ASQ* (%)
<b>Média</b>	32,71708	9,6	33,37	102,85	1,96
<b>Desvio padrão</b>	4,206154	0,57	2,858	8,85	0,173
<b>Mediana</b>	33,46	9,7	33,52	104,54	1,91
<b>Mínimo</b>	25,15	8,7	29,09	85,84	1,68
<b>Máximo</b>	41,08	10,5	38,24	119,07	2,33

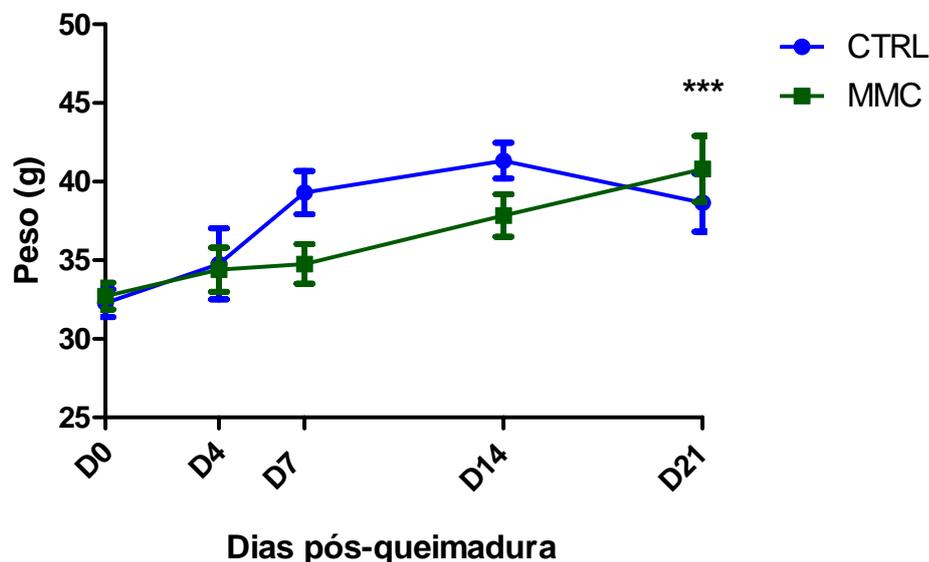
\* CRA = comprimento rostro-anal; LEE = índice de massa corpórea para camundongos ( $\text{peso}^{1/3} \cdot \text{CRA}$ ); ASCT = área da superfície corporal total ( $K \cdot \text{peso}^{1/3}$ ,  $k=10$ ); ASQ = percentual da área de superfície corporal total queimada.

Quanto à evolução ponderal, ambos os grupos tiveram aumento do peso durante o decorrer do experimento, o que se refletiu no índice de LEE. O peso médio inicial (D0PQ) dos animais do grupo CTRL foi de  $32,28 \pm 4,38$  g e o do grupo MMC de  $32,72 \pm 4,21$  g. Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ , *one-way* ANOVA e teste de comparação múltipla de Tukey) com aumento ponderal em ambos os grupos no D21PQ comparados com D0PQ (Tabela 3, e figura 11, abaixo).

**TABELA 3** – Variação ponderal (média  $\pm$  erro padrão da média) dos camundongos nos dias D0 (inicial), D4, D7, D14 e D21 pós-queimadura (PQ) conforme grupo.

Dia pós-queimadura (DxPQ)	GRUPOS	
	CTRL <sup>1</sup>	MMC <sup>2</sup>
	Variação ponderal (g)	
D0 (inicial)	$32,28 \pm 4,38$	$32,72 \pm 4,21$
D4PQ	$34,77 \pm 5,06$	$34,40 \pm 3,15$
D7PQ	$39,31 \pm 3,07$	$34,76 \pm 2,81$
D14PQ	$41,32 \pm 2,55$	$37,85 \pm 3,03$
D21PQ	$38,66 \pm 4,12$ ***	$40,81 \pm 4,67$ ***

1= CTRL: Grupo controle, tratado com solução salina 0,9%, local, dose única, D0; 2= MMC: Grupo tratado com Mitomicina-C, tópica, dose única em D0; \*\*\* Aumento ponderal em ambos os grupos no D21PQ comparados com D0 ( $p < 0,001$ , *one-way* ANOVA e teste de comparação múltipla de Tukey).



**FIGURA 11** – Curva de evolução ponderal dos camundongos *Swiss albino* nos dias (D) D0 (inicial), D4, D7, D14 e D21 pós-queimadura (PQ) conforme grupo de tratamento grupo (CTRL), controle, tratado com solução salina 0,9%, local, dose única e grupo tratado topicamente com Mitomicina-C 0,5%, (MMC). Aumento ponderal significativo em ambos os grupos no D21PQ, comparados com D0 ( $p < 0,001$ , *one-way* ANOVA e teste de comparação múltipla de Tukey). Dados expressos como média e erro padrão da média.

## 4.2 Avaliação Macroscópica das Queimaduras

Não se verificou sangramento, infecção, morte ou autocanibalismo em nenhum animal. No D4PQ as feridas apresentaram três zonas de lesão concêntricas bem definidas: uma área pálida mais periférica (isquemia) circundando uma zona de edema intermediária e pequena área necrótica mais central (Figura 12).



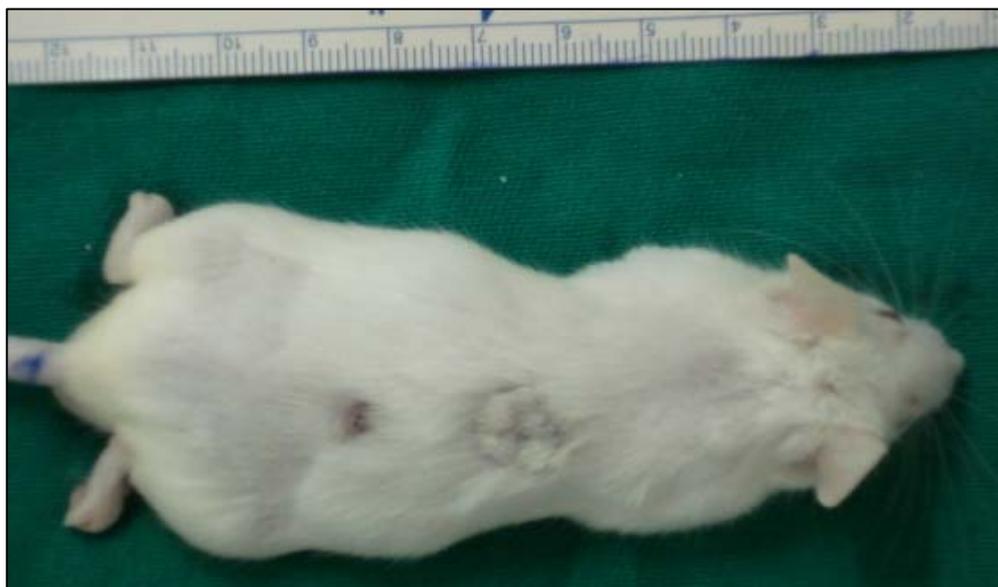
**FIGURA 12** - Feridas no D4PQ evidenciando zona de coagulação central, edema e uma área de isquemia.

No D7PQ houve um aumento relativo da área necrótica e diminuição do edema. Constatou-se a presença de crostas visíveis em todas as feridas. A transição zona de necrose-isquemia se apresentava bem delimitada. As crostas se destacavam mais facilmente, revelando hiperemia reativa na ferida. Não se constatou, a olho desarmado, grandes diferenças entre as feridas do grupo CTRL e aquelas do grupo MMC (Figura 13).

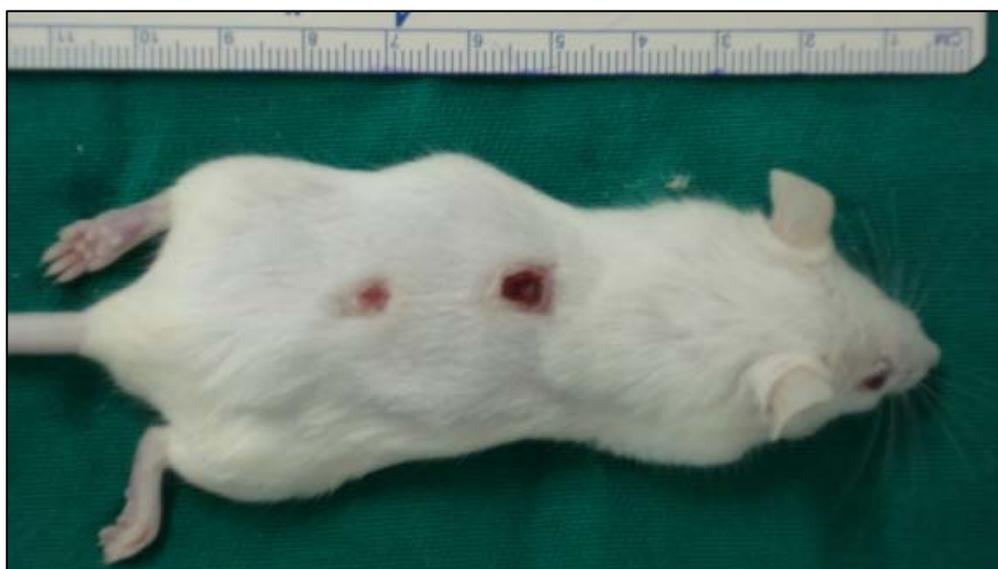


**FIGURA 13** - Feridas no D7PQ. Notar a maior definição da zona de necrose central após a remoção das crostas.

No D14PQ houve regressão bastante acentuada da área de queimadura, em ambos os grupos de feridas. Havia um retardo mais marcante no grupo MMC. Algumas feridas do grupo CTRL já exibiam crescimento de pelos, apresentando-se plenamente cicatrizadas. A maioria das feridas do grupo MMC apresentava um leve grau de hiperchromia, ainda com uma zona de necrose discretamente maior (Figuras 14 e 15).

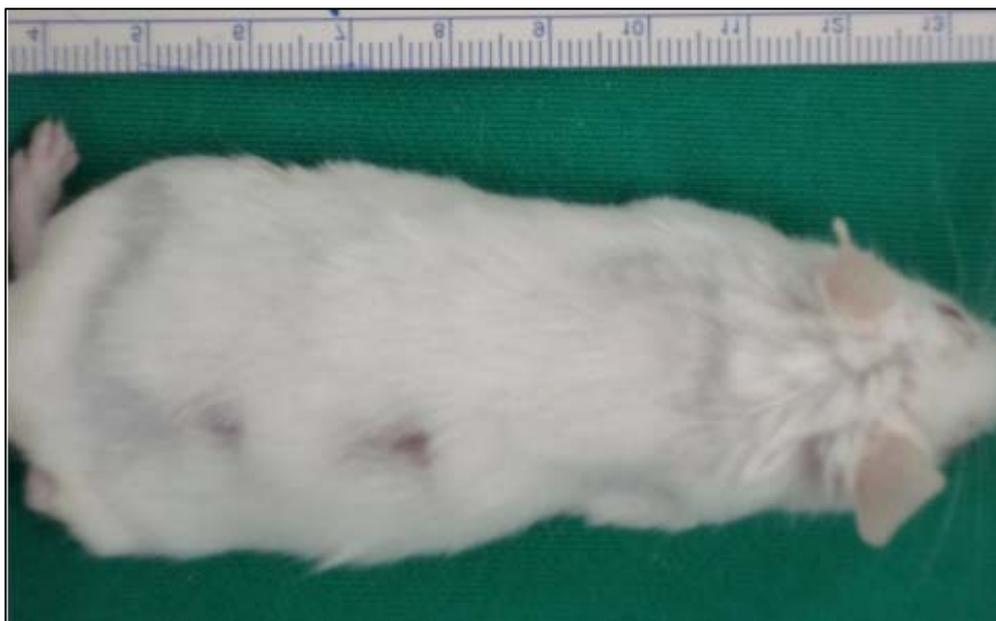


**FIGURA 14** - Camundongo do grupo CTRL no D14PQ. Nota-se uma fase de cicatrização mais avançada das feridas, que já exibem repilificação.

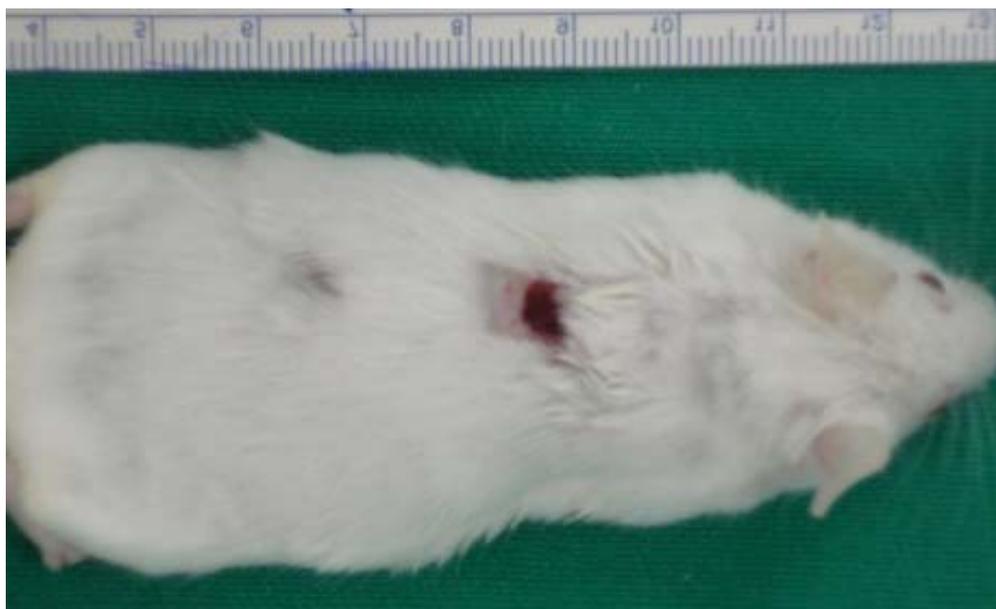


**FIGURA 15** - Camundongo do grupo MMC no D14PQ. Nota-se uma cicatrização mais retardada das feridas, que ainda exibem hiperchromia e necrose central.

No D21PQ praticamente todas as feridas do grupo CTRL estavam cicatrizadas e hipocrômicas com relação à pele circunjacente, com algumas indistinguíveis da pele normal. Algumas do grupo MMC ainda se apresentavam hiperocrômicas (Figuras 16 e 17).



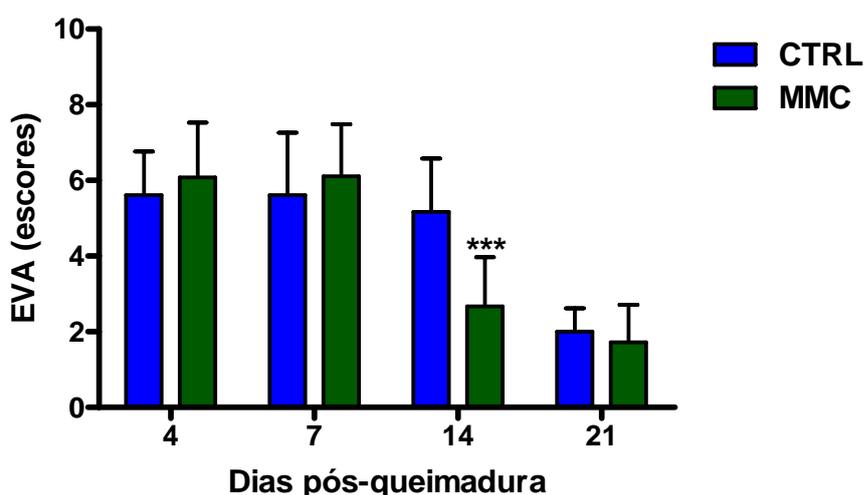
**FIGURA 16** - Camundongo do grupo CTRL no D21PQ. Nota-se uma cicatrização mais avançada das feridas, praticamente indistinguível da pele normal.



**FIGURA 17** - Camundongo do grupo MMC no D21PQ. Nota-se uma cicatrização mais retardada das feridas, em particular da mais cranial.

## Escala visual-analógica (EVA)

A comparação intergrupos dos escores da EVA evidenciou diferença extremamente significativa no D14PQ ( $p=0,0002$ , teste t de Student), com as feridas do grupo tratadas com Mitomicina-C (MMC) exibindo melhor aparência macroscópica que as do grupo controle (CTRL). A comparação intragrupos evidenciou uma influência significativa do fator tempo, resultando numa melhor aparência das feridas no D21PQ com relação ao D4PQ em ambos os grupos ( $p<0,0001$ , ANOVA). Houve uma variação maior nos escores do grupo de feridas tratadas com Mitomicina-C. A distribuição dos escores da EVA está plotada na figura abaixo.

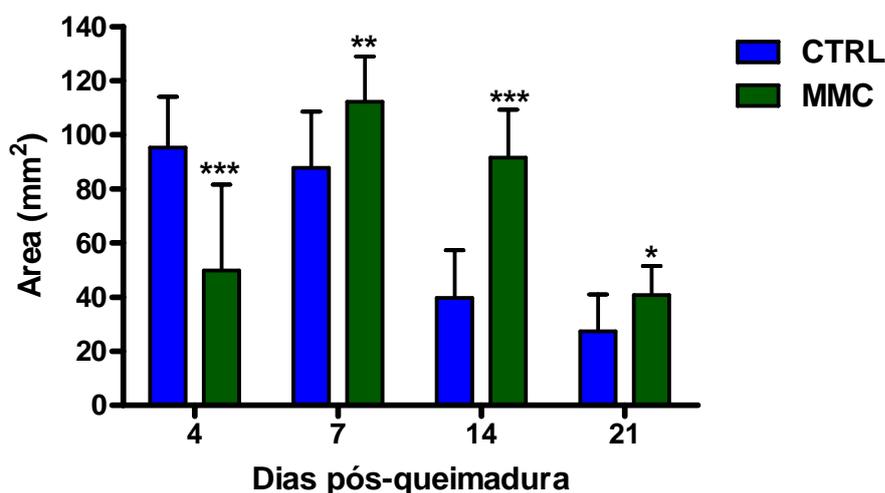


**FIGURA 18** – Evolução temporal da Escala Visual-Analógica (EVA) das feridas dos grupos controle (CTRL) e Mitomicina-C (MMC). As feridas do grupo MMC exibiram melhor aparência que as do grupo CTRL no D14PQ. A comparação intergrupos evidenciou diferença extremamente significativa nesta fase do experimento (\*\* $p=0,0002$ , teste t de Student).

## Planimetria Digital

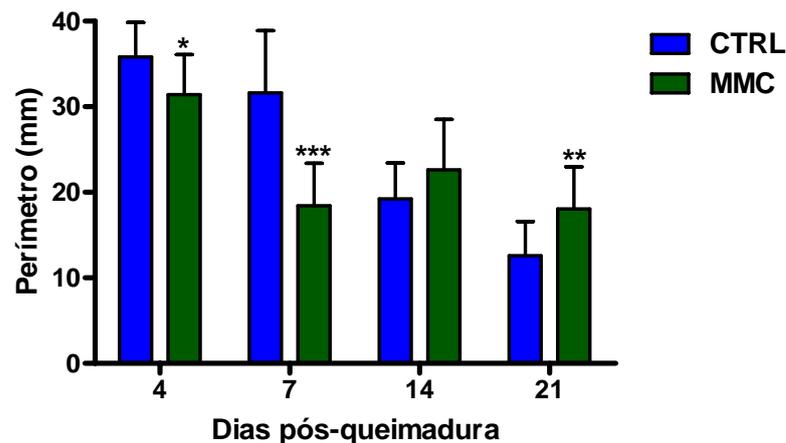
Houve diferença estatística significativa entre as áreas das queimaduras em cicatrização em todos os tempos do experimento (teste t de Student). As feridas do grupo Mitomicina-C (MMC) apresentaram menor área apenas no D4PQ e uma área maior nos demais tempos quando comparadas ao grupo controle (CTRL). No D4PQ houve diferença estatística bastante significativa ( $p=0,0003$ ) entre a área das

feridas do grupo CTRL quando comparadas àquelas tratadas com Mitomicina-C:  $95.25 \pm 18.78 \text{ mm}^2$  versus  $49.89 \pm 31.71 \text{ mm}^2$ . No D7PQ ocorreu um aumento relativo da superfície queimada em ambos os grupos, verificando-se uma área de  $87,74 \pm 20,81 \text{ mm}^2$  para o grupo CTRL e de  $112,2 \pm 16,79 \text{ mm}^2$  para o grupo MMC, ocorrendo diferença estatística bastante significativa entre as médias das áreas das feridas nesta fase do estudo ( $p=0,0044$ ). No 14º PQ, o mesmo se repetiu, sendo a diferença bastante significativa retornando um valor de ( $p<0,0001$ ), com a área média das feridas dorsais do grupo MMC muito maiores ( $91,47 \pm 17,84 \text{ mm}^2$ ) que as do grupo CTRL ( $39,77 \pm 17,62 \text{ mm}^2$ ). No D21PQ verificou-se diferença estatística significativa (valor de  $p=0,0134$ ) entre a área das feridas do grupo MMC ( $40,80 \pm 10,69 \text{ mm}^2$ ) quando comparadas às do grupo CTRL ( $27,34 \pm 13,65 \text{ mm}^2$ ) (Figura 19).



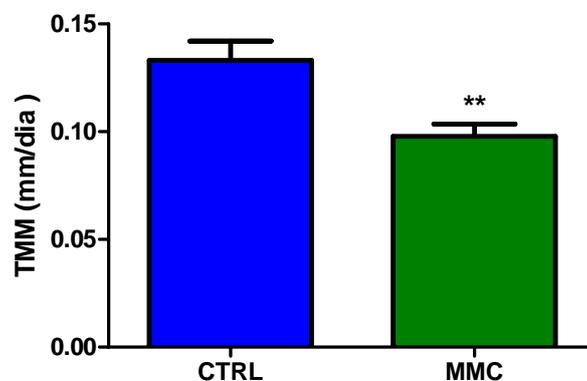
**FIGURA 19** - Evolução temporal das áreas das feridas mensuradas por planimetria digital nos grupos CTRL e MMC. Dados expressos como média e desvio padrão das medidas efetuadas em 12 feridas de cada grupo nos respectivos tempos. O teste *t* bi-caudado para amostras não-emparelhadas mostrou diferença estatisticamente significativa no D4, D7 e D14PQ ( $p=0,0003^{***}$ ,  $p=0,0044^{**}$  e  $p<0,0001^{***}$ , respectivamente). No D21PQ verificou-se um valor de  $p=0,0134^*$ .

Excetuando-se o D14PQ, a planimetria digital mostrou diferenças significativas entre o perímetro médio das queimaduras do grupo MMC com relação ao grupo CTRL nos demais tempos. O teste *t* de Student evidenciou diferença extremamente significativa no D7PQ ( $p < 0,0001$ ). Embora significativa, a diferença foi menos acentuada no D4PQ ( $p = 0,0219$ ). Novamente a diferença foi bastante significativa no D21PQ ( $p = 0,0070$ ) (Figura 20).



**FIGURA 20** - Evolução temporal dos perímetros médios das queimaduras dos grupos CTRL e MMC. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 feridas de cada grupo/fase do experimento. Para comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student. O perímetro mensurado no grupo MMC foi significativamente menor que o verificado no grupo CTRL nos dias 4 (\* $p = 0,0219$ ) e 7 (\*\* $p < 0,0001$ ) pós-queimadura. Contrariamente, no dia 21PQ, o perímetro observado no grupo MMC foi significativamente maior (\*\* $p = 0,0070$ ) que o medido no grupo CTRL.

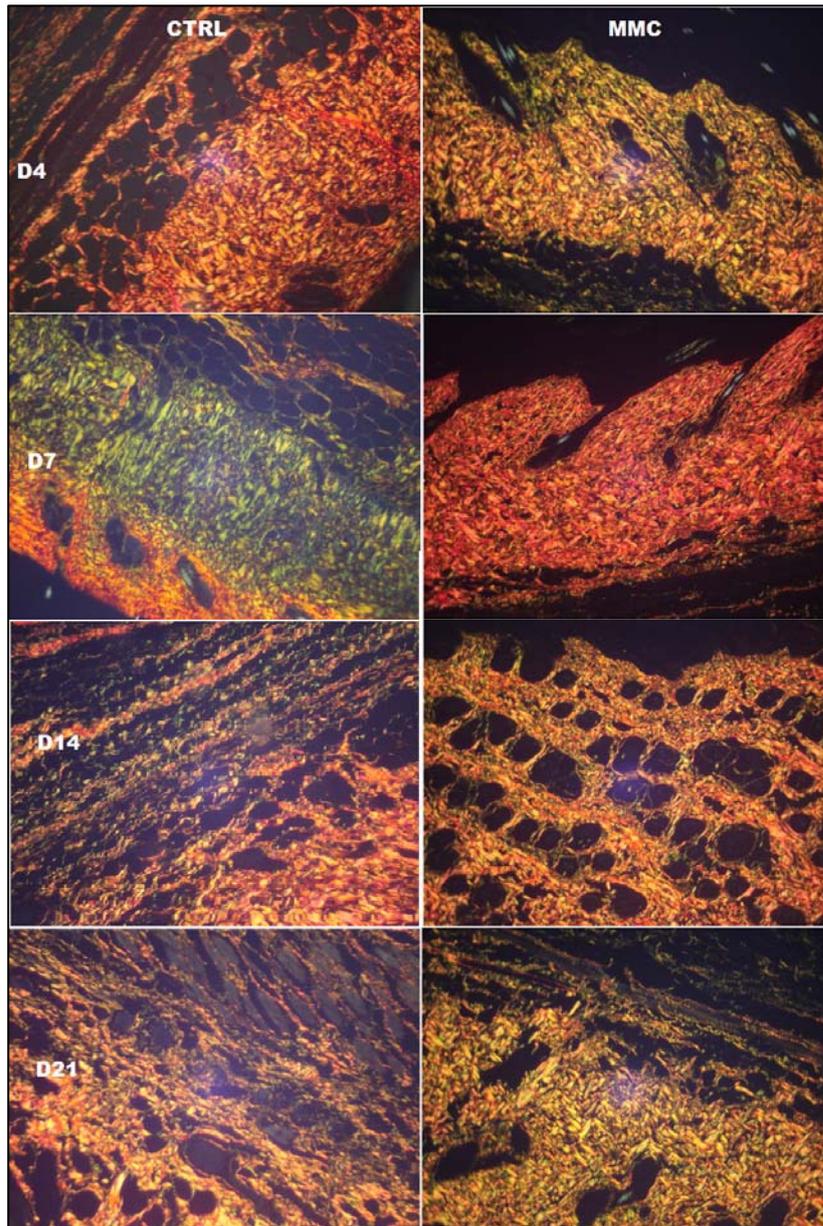
Utilizando-se das medidas das áreas e perímetros obtidos pela planimetria digital obteve-se a taxa média de migração das margens das feridas (TMM) de D0 a D21PQ, medida pela equação de Gilman modificada. A TMM foi significativamente menor nas feridas do grupo MMC (TMM =  $0,09785 \pm 0,01979$  mm/dia) quando comparadas ao do grupo controle (TMM =  $0,1330 \pm 0,03130$  mm/dia). O teste *t* bi-caudado com a correção de Welch para amostras não emparelhadas retornou a um valor de  $p = 0,0033$  (Figura 21).



**FIGURA 21** - Taxa média de migração das margens (TMM) dos grupos controle (CTRL) e Mitomicina-C (MMC) entre D0 e D21PQ. A TMM foi significativamente menor nas feridas do grupo MMC. O teste t de Student revelou diferença bastante significativa (\*\* $p = 0,0033$ ).

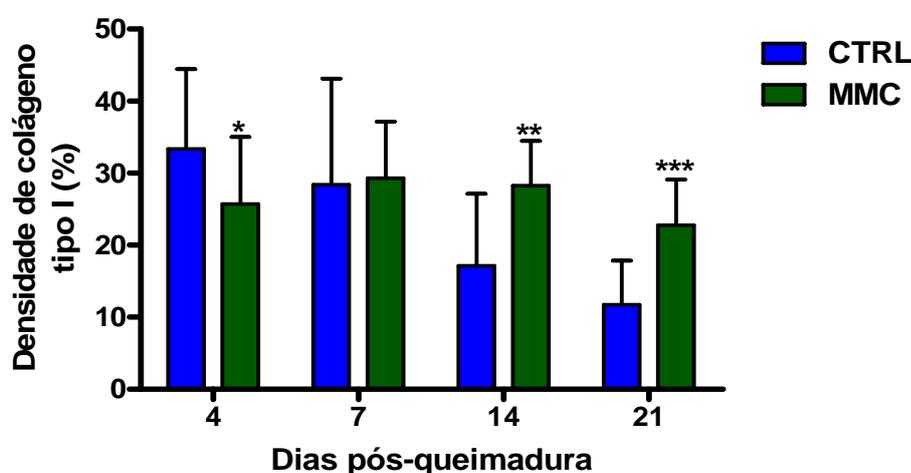
### 4.3 Análise Morfométrica do Colágeno

As fotomicrografias realizadas por microscopia de polarização aplicada nas lâminas coradas histoquimicamente pelo *Picrosirius red* demonstram de maneira clara a birrefringência do colágeno e a trama de fibras de colágeno formadas na reparação tecidual da região nos dois grupos nos dias analisados (Figura 22).



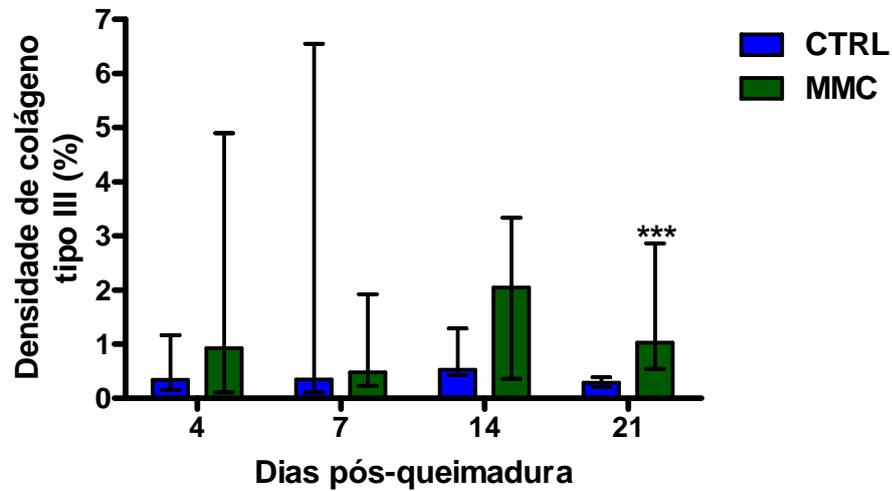
**FIGURA 22** - Aspecto das fibras colágenas coradas pelo *picrosirius red* com polarização nos D4, D7, D14, D21 (aumento de 400X), nos dois grupos.

A análise da evolução temporal da densidade de colágeno tipo I mostrou um comportamento decrescente da deposição deste tipo de colágeno nas feridas do grupo CTRL. Existiu diferença significativa no D4PQ ( $p = 0,0497$ ). No D7PQ não existiu diferença significativa. Nas feridas do grupo MMC a deposição de colágeno tipo I foi crescente entre D4 e D7PQ, decrescendo entre D14 e D21PQ. O teste t de Student para variáveis independentes mostrou diferença bastante significativa entre os grupos no D14PQ ( $p = 0,0010$ ) e extremamente significativa no D21PQ ( $p < 0,0001$ ) (figura 23).



**FIGURA 23** - Evolução temporal da densidade do colágeno tipo I nas feridas do grupo CTRL e MMC. Dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 imagens em cada tempo. No dia 4PQ, constatou-se que a densidade de colágeno tipo I mensurada no grupo MMC foi significativamente menor ( $*p = 0,0497$ ) que a verificada no grupo CTRL. Contrariamente, o tratamento com Mitomicina-C aumentou significativamente a deposição de colágeno tipo I nos dias 14PQ ( $**p = 0,0010$ ) e 21PQ ( $***p < 0,0001$ ).

A análise da deposição do colágeno tipo III por meio do estudo da evolução temporal da densidade deste tipo de colágeno, pelo SAMM, a partir das imagens obtidas de lâminas coradas pelo *picrossirius red* sob picrossirius-polarização, mostrou um comportamento irregular da deposição nas feridas de ambos os grupos. Embora o teste *t* de Student não tenha mostrado diferença significativa entre os grupos em nenhum dos períodos estudados, o teste de Mann-Whitney evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos no dia 21PQ ( $p = 0,004$ ). Nos outros dias, embora não significativa, também existiu maior densidade de colágeno tipo III (figura 24).



**FIGURA 24** - Evolução temporal da densidade do colágeno tipo III nas feridas do grupo CTRL e MMC. Dados correspondem à mediana e intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75) das medições efetuadas em 15 imagens em cada tempo. Ocorreu uma deposição irregular do colágeno tipo III em ambos os grupos de feridas. O teste de Mann-Whitney evidenciou diferença estatisticamente significativa, entre os grupos, apenas no dia 21PQ (\*\* $p = 0,004$ ), ou seja, nesse dia, houve uma deposição de colágeno significativamente maior no grupo MMC, quando comparado ao grupo CTRL.

## 5 DISCUSSÃO

A Mitomicina-C reduz a formação da cicatriz, sendo seu mecanismo de ação a inibição e bloqueio da síntese do DNA, prevenindo a proliferação do fibroblasto em área cirúrgica (ELIASHAR *et al.*, 1999). Esta característica faz que haja menor formação de tecido cicatricial na área em que a substância é aplicada (IHNAT *et al.*, 1997). A Mitomicina-C na concentração de 0,5 mg/ml não traz nenhum comprometimento do local em que foi topicamente usada nem sinal de aplasia medular (RIBEIRO *et al.*, 2003). Este estudo foi realizado para verificar os efeitos *in vivo* da Mitomicina-C de uso tópico em camundongos submetidos a lesão térmica.

Os animais selecionados foram camundongos *Swiss albino* (*Mus musculus*) de linhagem não-isogênica, por serem animais de pequeno porte, de fácil aquisição e padronização no que diz respeito à idade, peso, estado de saúde, alojamento, alimentação, cuidados com a limpeza, manipulação, resistência a infecções e por apresentarem um baixo índice de mortalidade. Optou-se pelo sexo masculino por não haver as variações hormonais, como são encontradas nas fêmeas.

Observou-se ausência de significância estatística em relação ao aumento ponderal entre os grupos estudados. A pré-determinação do peso e do CRA dos animais teve o objetivo de tornar a amostra mais homogênea possível, já que a massa influencia na determinação da área de superfície corpórea (Índice de Meeh). O tamanho e o peso do animal influenciam diretamente o índice de massa corpórea (Índice de Lee) e indiretamente a área de superfície queimada (ASQ). O índice de Lee indica o estado nutricional dos ratos, porém ele não faz a correlação adequada com o percentual de gordura (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). O aumento ponderal dos camundongos foi também observado em ratos por Mesquita *et al.*, (2010), contrariando o que acontece com grandes queimados.

A via empregada na anestesia foi a intraperitoneal. Os fármacos foram de fácil obtenção; cálculos complicados para a dose anestésica não foram necessários; não utilizamos grandes volumes de fármacos e a indução foi realizada com facilidade.

Para reduzir os pelos a um tamanho que não causasse danos ao procedimento cirúrgico, mas mantivesse a proteção da pele do animal, a epilação foi realizada com um aparelho de barbear elétrico de forma que se obteve uma retirada uniforme de pelos produzindo uma maior homogeneidade na textura e espessura da pele três dias antes da indução da queimadura. A epilação prévia visa à sincronização da pilificação, isto é, que a pele entre na mesma fase de crescimento (anágena), tornando-se mais espessa e facilitando a obtenção de uma queimadura mais uniforme. A epilação foi realizada antes da queimadura para facilitar a execução do procedimento.

O tamanho da área de contato, o número e a espessura das queimaduras foram previamente selecionados. A área de queimadura foi padronizada com molde vazado confeccionado em plástico; a intensidade com um ferro de soldar com superfície de contato de 100 mm<sup>2</sup> e temperatura constante de 100°C. O procedimento em todos os animais foi realizado por um único pesquisador. A técnica empregada na execução da queimadura foi a mesma realizada por Mesquita (2008), em ratos da linhagem Wistar. Ela possibilita padronizar queimaduras com espessura parcial usando o tempo de 6 segundos e total com 12 segundos; optamos, por 9s de contato com o aparelho modificado que resulta em queimadura de espessura parcial que preserva a maior parte dos anexos dérmicos que influenciam no processo de reparação cutânea (BÖHM; LUGER, 1998).

Neste trabalho, o dia da queimadura foi denominado D0 e as aferições foram realizadas no 4<sup>o</sup> dia (D4), 7<sup>o</sup> (D7), 14<sup>o</sup> (D14) até 21<sup>o</sup> dia (D21PQ), porque no 21<sup>o</sup> dia na ferida, existe equilíbrio entre a produção e degradação do colágeno (HENRY; GARNER, 2003). No terceiro dia após um ferimento, há proliferação de tecido de granulação e angiogênese precoce, iniciando um processo natural de depósito de fibroblastos e ácido hialurônico que coincide com a fibrogênese do colágeno. Na segunda semana, o tecido de granulação está completamente formado com suas características de contração, proteção e proliferação de neovasos no leito do ferimento. Inicia-se, então, rápida queda da força de contração da ferida em torno da quarta semana (SINGER; CLARK, 2004; MODOLIN; BEVILACQUA; RUY, 1985).

Segundo Tennyson *et al.* (2007) as vantagens da Escala Visual Analógica (EVA) são o seu baixo custo, a não invasividade, a reprodutibilidade e a facilidade

de revisar os dados; e as principais desvantagens, a subjetividade, a possibilidade de vieses do método em si; ou dos analisadores. Neste trabalho, as lesões foram analisadas por um cirurgião plástico, um cirurgião ortopédico e um estudante de medicina, todos “cegos” quanto ao tipo e tempo de tratamento e obtivemos diferença significativa na aparência dos grupos de feridas no 14<sup>o</sup> dia pós-queimadura. Estes dados estão de acordo com Mesquita *et al.* (2010) que mostraram uma melhora gradual da aparência de ambos os grupos de queimaduras, sendo que, ao final do experimento de Mesquita *et al.* (2010), o grupo controle mostrava aparência significativamente melhor em detrimento do Imiquimode. A Mitomicina-C usada topicamente em feridas cirúrgicas em ratos retarda seu processo de cicatrização até a 4<sup>a</sup> semana. Quando usada intradermicamente, causa necrose tecidual apenas em concentrações elevadas (RIBEIRO *et al.*, 2003). Na concentração de 0,5 mg/ml a Mitomicina-C é aplicada na cirurgia do canal externo do ouvido. A concentração de 0,5 mg/ml foi escolhida baseada na literatura, para evitar necrose no local do tratamento (GARRETT *et al.*, 2001; RAHBAR; SHAPSHAY; HEALY, 2001; BANTHIA; SELESNICK, 2003).

Nossas observações em camundongos usando a planimetria digital mostraram diferenças entre o perímetro médio das queimaduras da pele do grupo MMC com relação ao grupo CTRL, sendo uma diferença bastante significativa estatisticamente no sétimo dia pós-queimadura e menos acentuada no 21<sup>o</sup> dia.

Para a avaliação da razão entre a variação da área e o perímetro médio com relação a um período de tempo estipulado, Gilman (1990) e Tallman *et al.* (1997) recomendam o cálculo da Taxa Média de Migração das Margens (TMM). Desta forma, Mesquita *et al.* (2010), demonstraram a capacidade do Imiquimode em modular a reparação de queimaduras nas diversas etapas da cicatrização. Detectamos uma TMM menor nas feridas do grupo MMC, com diferença estatisticamente bastante significativa.

A quantificação computadorizada da deposição do colágeno, por meio da soma da área corada pelo picosirius red após polarização, é um método bem estabelecido pela literatura. Junqueira, Cossermelli, Brentani (1978) demonstraram que o corante picosirius red aumentava a birrefringência das fibras colágenas, quando estudadas em microscópio de polarização apresentando importante

sensibilidade e especificidade, sendo, portanto, um método simples para localizar as fibras colágenas. Rabau; Dayan (1994) e Cuttle *et al.* (2005), sugeriram que as diferentes birrefringências observadas durante a polarização após o uso do picrosirius red, permitem avaliar a fase do processo cicatricial, em que o colágeno se encontra esverdeado ou amarelo esverdeado (colágeno tipo III) na fase de cicatrização e altamente birrefringente de cor laranja ou vermelha (colágeno tipo I) no processo fibrótico inativo. A escolha dessa técnica nos permitiu avaliar qualitativa e quantitativamente a birrefringência intrínseca (própria) dos feixes de colágeno em microscopia de polarização e acompanhar a evolução da reparação, assim como a morfologia do tecido de granulação e a maturação das fibras colágenas. A derme queimada pode apresentar-se mais fina ou mais grossa que a pele sã, dependendo da etapa da cicatrização. Pereira (2006), estudando o efeito da Mitomicina-C tópica sobre o depósito total de colágeno na submucosa das pregas vocais íntegras de suíno, acredita que sua ação somente se faz em tecido com injúria, e em fase de cicatrização. Esta também é a opinião de Bradner (2001).

Mesquita *et al.* (2010) relataram uma maior deposição do colágeno tipo I na cicatrização das queimaduras realizadas em ratos do grupo controle comparadas com as do Imiquimode em todas as fases (D4, D7, D14 e D21), sugerindo sua menor capacidade fibroblástica nas feridas tratadas com este imunomodulador. Em nosso estudo, utilizando a mesma metodologia em camundongos, constatamos que o colágeno tipo I mostrou um comportamento decrescente de deposição no grupo controle. No grupo tratado com MMC a deposição de colágeno tipo I foi crescente entre D4 e D7, decrescendo entre D14 e D21. Da mesma forma com o colágeno tipo III, existe diferença entre os grupos no D14 e diferença bastante significativa no D 21, mostrando maior quantidade deste colágeno, no grupo MMC. Estes resultados evidenciam a capacidade da MMC em retardar a transformação do colágeno imaturo (tipo III) em maturo (tipo I).

Os resultados deste estudo experimental sugerem que a Mitomicina-C pode ser utilizada como tratamento adicional em cicatrização hipertrófica e quelóides. Futuros estudos em animais com queimaduras de espessura total em vez de queimaduras de espessura parcial e estudos clínicos dos efeitos da Mitomicina-C são necessários para estabelecer dosagem segura e intervalo de aplicação.

## **6 CONCLUSÃO**

No modelo estudado, a ação da Mitomicina-C foi eficaz em retardar a maturação das queimaduras, gerando menor quantidade de fibrose.

## REFERÊNCIAS

AZULAY, D. R.; AZULAY, R. D.; AZULAY-ABULÁFIA, L. **Dermatologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BANTHIA, V.; SELESNICK, S. H. Mitomycin-C in the postsurgical ear canal. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, Rochester, v.128, n.6, p.882-886, Jun. 2003.

BARBOSA, R. C. C.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; CHAVES, C. R.; VASCONCELOS, P. R. L. Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura). **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.18, n.6, p.537-541, dez. 2003.

BAYAT, A.; MCGROUTHER, D. A.; FERGUSON, M. W. Skin scarring. **BMJ (Clinical research ed.)**, London, v.326, n.7380, p. 88-92, Jan. 2003.

BEAUSANG, E.; FLOYD, H.; DUNN, K.; ORTON, C.; FERGUSON, M. A new quantitative scale for clinical scar assessment. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v.102, n.6, p.1954-1961, nov.1998.

BERMAN, B.; VILLA, A. M.; RAMIREZ, C. C. Novel opportunities in the treatment and prevention of scarring. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, New York, v.8, n.3, p. 32-36, Dec. 2004. Suppl.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, London, v. 40, n.4, p. 527-528, Apr. 1968.

BIGBY, M. Snake oil for the 21st century. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 134, n.12, p.1512-1514, Dec. 1998.

BÖHM, M.; LUGER, A. The pilosebaceous unit is part of the skin immune system. **Dermatology**, Basel, v. 196, n.1, p. 75-79, 1998.

BOUTLI-KASAPIDOU, F.; TSAKIRI, A.; ANAGNOSTOU, E.; MOURELLOU, O. Hypertrophic and keloidal scars: an approach to polytherapy. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v.44, n.4, p. 324-327, Apr. 2005.

BRADNER, W. T. Mitomycin- C a clinical up date. **Cancer Treatment Reviews**, New York, v. 27, n. 2, p. 35-50, Fev. 2001.

CABRAL, L. M.; FERREIRA, L. M.; SIMÕES, M. J.; MORA, O. A. Experimental model of double wounds on the rats back , in order to study the skin cicatrization process on rat treated with cellulose coat. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.18, p.65-68. 2003. Edição especial.

COSTA, R.; MELO, A. C.; MOURA, E.; ANSELMO, G.; MESQUITA, M.; AQUINO, M. **Normas para Apresentação de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal do Ceará**. 2007.

CUTTLE, L.; NATAATMADJA, M.; FRASER, J. F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R. M.; HAYES, M. T. Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with picosirius-polarization. **Wound Repair and Regeneration**, St. Louis, v.13, n.2, p. 198-204, Mar-Apr. 2005.

ELIASHAR, R.; ELIACHAR, I.; ESCLAMADO, R.; GRAMLICH, T.; STROME, M. Can topical mitomycin-c prevent laryngotracheal stenosis? **Laryngoscope**, St. Louis, v. 109, n.10, p. 1594-1600, Oct. 1999.

FECHINE, F. V. **Quantificação de angiogênese corneana *in vivo* através de processamento de imagens digitais**. 2006. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FERGUSON, M. W.; WHITBY, D. J.; SHAH, M.; ARMSTRONG, J.; SIEBERT, J. W.; LONGAKER, M. T. Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v.97, n.4, p. 854-860, Apr. 1996.

GARRETT, C. G.; SOTO, J.; RIDDICK, J.; BILLANTE, C. R.; REINISCH, L. Effect of mitomycin-c on vocal fold healing in a canine model. **The Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, St. Louis, v.110, n.1, p. 25-30, Jan. 2001.

GILMAN, T. H. Parameter for measurement of wound closure. **Wounds**, King of Prussia, v.2, n.3, p. 95-101, 1990.

HABIF, T. Hypertrophic Scars and Keloids. **Clinical Dermatology: a color guide to diagnosis and therapy**. 5th ed. Mosby, 2009. Disponível em: <http://www.mdconsult.com/book/player/book.do?method=display&type=bookPage&decorator=header&eid=4-u1.0-B978-0-7234-3541-9..00029-8--s0125&uniq=182090954&isbn=978-0-7234-3541-9&sid=949034635#lpState=open&lpTab=contentsTab&content=4-u1.0-B978-0-7234-3541-9..00029-8--st0100%3Bfrom%3Dcontent%3Bisbn%3D978-0-7234-3541-9%3Btype%3DbookPage>. Acesso em: 05 jan. 2010.

HENRY, G.; GARNER, W. L. Inflammatory mediators in wound healing. **The Surgical Clinics of North America**, United States, v.83, n.3, p. 483-507, Jun. 2003.

HILLMER, M. P.; MACLEOD, S. M. Experimental keloid scar models: a review of methodological issues. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v.6, n.4, p. 354-359, Jul/Aug. 2002.

IHNAT, M. A.; LARIVIERE, J. P.; WARREN, A. J.; LA RONDE, N.; BLAXALL, J. R.; PIERRE, K. M.; TURPIE, B. W.; HAMILTON, J. W. Suppression of P-glycoprotein expression and multidrug resistance by DNA cross-linking agents. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 3, p. 1339-1346, Aug. 1997.

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

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. R. Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. **Arquívum Histologicum Japonicum**, Japão, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

KELLY, A. P. Medical and surgical therapies for keloids. **Dermatologic Therapy**, Denmark, v. 17, n. 2, p. 212-218, 2004.

KORMAN, N.; MOY, R.; LING, M.; MATHESON, R.; SMITH, S.; MCKANE, S.; LEE, J. H. Dosing With 5% Imiquimod Cream 3 Times per Week for The treatment of Actinic Keratosi: results of two phase 3, randomized, double-blind, parallel-group, vehicle-controlled trials. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 141, n. 4, p. 467-473, Apr. 2005.

LIMA JUNIOR, E. M.; SERRA, M. C. **Tratado de queimaduras**. São Paulo: Atheneu, 2004.

MARNEROS, A. G.; KRIEG, T. Keloids-clinical diagnosis, pathogenesis and treatment options. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, Berlim, v.2, n.11, p. 905-913, Dec. 2004.

MEDEIROS, A. C.; RAMOS, A. M. O.; DANTAS FILHO, A. M.; AZEVEDO, R. C. F.; ARAÚJO, F. L. F. B. Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.14, n.4, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/acb>>. Acesso em: 05 jan. 2010.

MESQUITA, C. J. G. **Efeito do Imiquimode na Cicatrização de Queimadura em Ratos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

MESQUITA, C. J. G.; LEITE, J. A. D.; FECHINE, F. V.; ROCHA, J. L. C.; LEITE, J. G. S.; LEITE FILHO, J. A. D.; BARBOSA FILHO, R. A. Effect of imiquimod on partial-thickness burns. **Burns**, Netherlands, v. 36, p. 97-108, 2010.

MESQUITA, C. J. G.; LEITE, J. A. D.; LEITE FILHO, J. A. D.; SILVA, F. R. S.; LEITE, J. G. S. Novo modelo experimental de queimadura. **Anais da XVI Jornada Anual de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará**, 2006.

MEYER, T.N.; SILVA, A.L.; A standard burn model using rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.14, n.4, p.199-2002, out./dez. 1999.

MIYAMURA, S.; SHIGENO, N.; MATSUI, S.; WAKAKI, S.; UZU, K. The biological studies on mitomycin, I: antibacterial activities of mitomycin derivatives. **The Journal of Antibiotics**, Tokio, v.20, n.2, p. 72–76, Mar. 1967.

MODOLIN, M.; BEVILACQUA, R. G.; RUY, G. Cicatrização das feridas: síntese das aquisições recentes. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, São Paulo, v.14, n. 6, p. 208-213, 1985.

OBOSHI, S.; MATSUI, M.; ISHII, S.; MASAGO, N.; WAKAKI, S. Antitumor studies in mitomycin and derivatives, II: effect on solid tumor of sarcoma-180. **Gann**, Tokyo, v.58, n.4, p. 315-321, Aug. 1967.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, New York, v.187, n.5A, p. 11S-16S, May. 2004.

PEREIRA, M. C. **Efeito da mitomicina-C tópica sobre os depósitos de colágenos total na submucosa das pregas vocais íntegras de suíno**. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

RABAU, M. Y.; DAYAN, D. Polarization microscopy of picosirius red stained sections: a useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. **Histology and Histopathology**, Spain, v. 9, n. 3, p. 525-528, 1994.

RAHBAR, R.; SHAPSHAY, S. M.; HEALY, G. B. Mitomycin: effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits, and complications. **The Annals of otology, rhinology & laryngology**, St. Louis, v.110, n.1, p. 1-6, Jan. 2001.

RIBEIRO, F. A. Q.; BORGES, J. P.; ZACCHI, F. F. S.; GUARALDO, L. O. comportamento clínico e histológico da pele do rato submetida ao uso tópico e injetável de mitomicina-C. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, Rio de Janeiro, v.69, n. 2, p.151-158, mar. 2003.

ROBSON, M. C. Proliferative scarring. **The Surgical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 83, n. 3, p. 557-569, Jun. 2003.

SANDERS, K. W.; GAGE-WHITE, L.; STUCKER, F. J. Topical mitomycin-C in the prevention of keloid scar recurrence. **Archives of Facial Plastic Surgery**, Chicago, v.7, n.3, p. 172-175, May/Jun. 2005.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 341, n.10, p. 738-746, 2004.

TALLMAN, P.; MUSCARE, E.; CARSON, P.; EAGLSTEIN, W. H.; FALANGA, V. Initial rate of healing predicts complete healing of venous ulcers. **Archives Dermatology**, Chicago, v. 133, n.10, p. 1231-1234, 1997.

TALMI, Y. P.; ORENSTEIN, A.; WOLF, M.; KRONENBERG, J. Use of mitomycin-c for treatment of keloid: a preliminary report. **Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, Rochester, v.132, n.4, p. 598-601, Apr. 2005.

TENNYSON, H.; HELLING, E. R.; WISEMAN, J.; DICK, E.; LYONS, R. C. The effect of topical mitomycin-c on full-thickness burns. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v.120, n.4, p.879-886, Sep. 2007.

VALE, E. C. S. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 1, p. 9-19. fev. 2005.

XU, R. X.; XIA, S.(Ed.); BRADFORD, S. W.(Co-editor). **Burns regenerative medicine and therapy**. Basel: Karger, 2004.

## ANEXO 1 – Declaração para a Comissão de Ética e Pesquisa Animal



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 51/07, sobre o projeto intitulado: “ESTUDO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO TÓPICO DA MITOMICINA C SOBRE A BIOMECÂNICA E MORFOLOGIA DA PELE DORSAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A QUEIMADURAS TÉRMICA” de responsabilidade do Prof. José Alberto Dias Leite, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 11 de abril de 2007.

Fortaleza, 24 de julho 2007

  
Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA