

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE ENFERMAGEM**

**MARIANA RAQUEL SOARES**

**A UTILIZAÇÃO DE COBERTURAS OCLUSIVAS:  
A INFLUÊNCIA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EXCISIONAIS EM  
CAMUNDONGOS**

**BELO HORIZONTE**

**2018**

**MARIANA RAQUEL SOARES**

**A UTILIZAÇÃO DE COBERTURAS OCLUSIVAS:  
A INFLUÊNCIA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EXCISIONAIS EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Área de concentração: Saúde e Enfermagem

Linha de pesquisa: Cuidar em Saúde e Enfermagem

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eline Lima Borges

**BELO HORIZONTE**

**2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Soares, Mariana Raquel.

A utilização de coberturas oclusivas [manuscrito]: a influência sobre a cicatrização de feridas excisionais em camundongos / Mariana Raquel Soares. - 2018.

75 f.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eline Lima Borges.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Enfermagem. 2. Feridas. 3. Cicatrização de Ferida Cutânea. I. Borges, Eline Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Enfermagem. IV. Título.

Escola de Enfermagem da UFMG  
Colegiado de Pós-Graduação em Enfermagem  
Av. Alfredo Balena, 190 | 30130-100  
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil  
+55 31 3409-9836 | 31 3409-9889  
caixa postal: 1556 | colpgrad@enf.ufmg.br



UFMG  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE MINAS GERAIS

**ATA DE NÚMERO 569 (QUINHENTOS E SESSENTA E NOVE) DA SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA MARIANA RAQUEL SOARES PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM ENFERMAGEM.**

Aos 2 (dois) dias do mês de março de dois mil e dezoito, às 09:00 horas, realizou-se no Anfiteatro Roseni da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação "*A UTILIZAÇÃO DE COBERTURAS OCLUSIVAS: O IMPACTO SOBRE A CICRATIZAÇÃO DE FERIDAS EXCISIONAIS EM CAMUNDONGOS*", da aluna *Mariana Raquel Soares*, candidata ao título de "Mestra em Enfermagem", linha de pesquisa "Cuidar em Saúde e Enfermagem". A Comissão Examinadora foi constituída pelas seguintes professoras doutoras: Eline Lima Borges (orientadora), Tânia Couto Machado Chianca e Luciola da Silva Barcelos, sob a presidência da primeira. Abrindo a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

- ( ) APROVADA;  
(X) APROVADA COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;  
( ) REPROVADA.


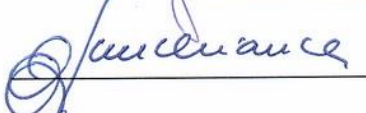

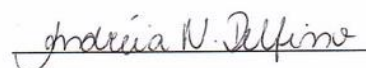
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Andréia Nogueira Delfino, Secretária do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 02 de março de 2018.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Eline Lima Borges  
Orientadora (EEUFMG)


Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tânia Couto Machado Chianca  
(Esc.Enf/UFMG)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciola da Silva Barcelos  
(ICB/UFMG)

Andréia Nogueira Delfino  
Secretária do Colegiado de Pós-Graduação

HOMOLOGADO em reunião do CPG  
em 05/03/2018

  
Prof.ª. Dra. Adriana Oliveira  
Coordenadora do Colegiado de  
Pós-Graduação em Enfermagem  
Escola de Enfermagem / UFMG

### MODIFICAÇÃO EM DISSERTAÇÃO

Modificações exigidas na Dissertação de Mestrado da Senhora **MARIANA RAQUEL SOARES**.




As modificações foram as seguintes:

Alteração do título para: "A utilização de coberturas oclusivas: a influência sobre a cicatrização de feridas excisionais em camundongo".

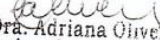
#### NOMES

Profª. Drª Eline Lima Borges  
Profª. Drª. Tânia Couto Machado Chianca  
Profª. Drª. Luciola da Silva Barcelos

#### ASSINATURAS

HOMOLOGADO em reunião do CPG  
Em 05/03/2018

  
Profª. Dra. Adriana Oliveira  
Coordenadora do Colegiado de  
Pós-Graduação em Enfermagem  
Escola de Enfermagem / UFMG

*Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.  
Provérbios 16:3*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus, por sempre me dar força e graça para realizar meus sonhos. E por permitir, a cada manhã, sentir o seu amor por mim.

À minha família, sobretudo minha mãe, por ser um exemplo de guerreira. Meu amado pai, que mesmo não estando presente, me deixou o legado de sempre lutar e prosseguir. Ao meu marido, amigo e companheiro, por me impulsionar e empoderar, além de tornar meus dias mais alegres e leves. Ao meu irmão, pelo qual desejo a cada dia ser um exemplo de perseverança e de caráter. Ao meu amigo Carlos, por ser um irmão que a vida me deu de presente.

Aos meus mentores, Fernando e Débora, por serem um exemplo de excelência e, constantemente, me inspirar a ser minha melhor versão.

À minha querida professora e orientadora, Eline Lima Borges, por seu exemplo, paciência, carisma, amizade e força. É uma honra e um prazer ser sua orientanda, foram dois anos repletos de aprendizado. Agradeço, imensamente, por ter acreditado no meu potencial, mesmo na ausência de conhecimento de bancada.

Ao Puebla Vieira e Gilmara Amorim, colegas enfermeiros queridos, pela ajuda e ensinamentos dispensados. Não seria capaz de chegar aqui sem a colaboração de vocês. Serei eternamente grata.

Ao professor Antônio Carlos Guedes, pelas sugestões e colaboração ao longo do trabalho. À professora Lucíola Barcelos e ao Laboratório de Angiogênese e Células-tronco do ICB/UFMG, pela parceria, apoio e auxílio com os materiais necessários para a execução deste trabalho, bem como aceitar participar da minha banca. À professora Tânia Chianca, também pelo aceite em participar da banca e contribuir para o meu crescimento.

À Natália Virtude, pela imensa ajuda com o WB. À Mariane Felipeto, pela ajuda na execução de algumas atividades experimentais. Ao José Pires, pela colaboração na elaboração do projeto inicial.

A todos os pacientes e colegas enfermeiros que me impulsionaram para sair da minha zona de conforto e buscar conhecimento.

A todos vocês deixo minha eterna gratidão e os meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O cuidado do paciente com feridas é um constante desafio na prática clínica do enfermeiro. As coberturas oclusivas e não oclusivas são utilizadas no tratamento de feridas e existe uma lacuna de conhecimento sobre a influência dessas indicações no processo de cicatrização. **OBJETIVO:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de coberturas oclusivas sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos C57BL/6. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo translacional pré-clínico, comparativo e controlado. Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais e o tratamento das feridas excisionais deles foram classificados como: animais que receberam oclusão com hidrocolóide (HD), animais que receberam oclusão com filme transparente de poliuretano (FT) e animais sem oclusão (SO). Os grupos foram avaliados quanto: a taxa de fechamento das feridas, o infiltrado de neutrófilos e macrófagos, dosagem da citocina TNF- $\alpha$ , o fator de crescimento angiogênico VEGF, a expressão protéica de HIF-1 $\alpha$  e, histologicamente, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. As cicatrizes das feridas foram analisadas por juízes independentes quanto à apresentação estética no décimo quarto dia de segmento. **RESULTADO:** No terceiro dia do processo de cicatrização, foi possível observar, macroscopicamente, que o fechamento das feridas cutâneas excisionais foi acelerado nos animais cuja ferida foi ocluída, utilizando-se tanto filme transparente quanto o hidrocolóide. Ainda no período de três dias, observou-se diminuição nos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  nas feridas ocluídas com hidrocolóide quando comparada com os grupos SO e FT. O acúmulo de neutrófilos também diminuiu, significativamente, ao terceiro dia de cicatrização no grupo tratado com hidrocolóide, quando comparado aos grupos SO e FT, respectivamente. O conteúdo dos macrófagos apresentou níveis significativamente mais altos ao terceiro dia no grupo FT quando comparado a SO. Ao sexto dia de estudo, evidenciaram-se dosagens significativamente aumentadas de macrófagos no grupo HD, contrastando com os grupos SO e FT. Os níveis de VEGF apresentaram-se expressivamente aumentados ao sexto dia de cicatrização, nos animais cujas feridas estavam ocluídas com filme transparente de poliuretano e hidrocolóide. Houve aumento dos níveis do fator indutor de hipóxia 1-alfa nos animais submetidos a oclusão quando comparados aos sem oclusão. A análise qualitativa do reparo em cicatriz das feridas permitiu afirmar que houve concordância moderada e significativa entre os juízes no grupo HD e concordância substancial e significativa nas cicatrizes dos animais SO. **CONSIDERAÇÕES FINAIS:** Considerando-se que a resposta inflamatória é um processo imunológico fundamental para o processo de reparo de feridas, quando ocorre de forma controlada, sugere-se que a oclusão modula a resposta inflamatória. Tal achado é evidenciado por meio da inibição parcial da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , da redução de acúmulo de neutrófilos e dos níveis mais altos de macrófagos. A oclusão das feridas não evidenciou aumento quantitativo de capilares em relação ao grupo sem oclusão.

**Palavras-chave:** Feridas, Cicatrização de Ferida Cutânea, Coberturas Oclusivas, Hidrocolóide, Inflamação, Angiogênese, Enfermagem.



## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The care of the wounded patient is a constant challenge in the nurse's clinical practice. Occlusive and non-occlusive coverages are used to treat wounds and there is a lack of knowledge about the impact of these indications on the healing process. **OBJECTIVE:** The objective of the present study was to evaluate the influence of occlusive coatings on the cicatrization of cutaneous excisional wounds in C57BL / 6 mice. **MATERIALS AND METHODS:** It is a pre-clinical, comparative and controlled translational study. The mice were divided into three experimental groups and the treatment of excisional wounds of these were classified as: animals that received occlusion with hydrocolloid (HD), animals that received occlusion with transparent polyurethane film (FT) and animals without occlusion (SO). The groups were evaluated for: wound closure rate, neutrophil and macrophage infiltration, TNF- $\alpha$  cytokine dosing, VEGF angiogenic growth factor, HIF-1 $\alpha$  protein expression and, histologically, the development of new blood vessels. Wound scars were analyzed by independent judges regarding the aesthetic presentation on the fourteenth day of the segment. **RESULTS:** On the third day of the healing process it was possible to observe, macroscopically, that the closure of excisional skin wounds was accelerated in animals whose wound was occluded using both transparent and hydrocolloid films. Also, in the three-day period, there was a decrease in TNF- $\alpha$  proinflammatory cytokine levels in the hydrocolloid occluded wounds when compared to the SO and FT groups. Neutrophil accumulation also significantly decreased on the third day of healing in the group treated with hydrocolloid occlusion when compared to the SO and FT groups, respectively. Macrophage content had significantly higher levels, on day 3, in the FT group, when compared to OS. On the sixth day of the study, significantly increased dosages of macrophages were detected in the HD group, contrasting with the SO and FT groups. VEGF levels were expressively increased on the sixth day of healing in animals whose wound was occluded with transparent polyurethane film and hydrocolloid film. There was an increase in levels of the factor inducing 1-alpha hypoxia in the animals submitted to occlusion when compared to those without occlusion. The qualitative analysis of the wound healing repair allowed to affirm that there was moderate and significant agreement, between the judges, in the HD group and substantial and significant concordance in the scars of the SO animals. **FINAL CONSIDERATIONS:** Considering that the inflammatory response is a fundamental immunological process for the wound repair process, when it occurs in a controlled way, it is suggested that the occlusion modulates the inflammatory response. Such a finding is evidenced by partial inhibition of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , reduction of neutrophil accumulation, and higher levels of macrophages. The wounds occlusion did not show a quantitative increase of capillary vessels in relation to the group without occlusion.

**Keywords:** Wounds, Cutaneous Wound Healing, Occlusive Dressings, Hydrocolloid, Inflammation, Angiogenesis, Nursing.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang	Angiogenina
Ang-1	Angiopietina-1
BSA	Albumina bovina
CEBIO	Centro de Biotério
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEUA	Comitê de Ética Animal
CF	Cinética de fechamento
EDTA	Acidoetilenoamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FNC	Ferida não cicatrizada
FPC	Ferida parcialmente cicatrizada
FT	Filme transparente de poliuretano
FTC	Ferida totalmente cicatrizada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HD	Hidrocolóide
HIF-1 $\alpha$	Fator indutor de hipóxia 1-alfa
HIF-1 $\beta$	Fator indutor de hipóxia 1-beta
HTAB	Brometo de hexadecil trimetilamônio
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alpha
IL-6	Interleucina 6
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos

MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NAG	N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase
NaPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio
O.D.	Densidade óptica
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OPD	O-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SO	Sem oclusão
TBS-T	Solução salina Tris com Tween
TC	Troca de curativo
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TSP1	Trombospondina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WB	Western Blotting

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Componentes da resposta inflamatória associada ao reparo de feridas....	21
Figura 2 - Fluxograma representando o processo de cicatrização.....	24
Figura 3 - Excisão do Dorso.....	30
Figura 4 - Excisão do Dorso.....	30
Figura 5 - Padronização de feridas para análise.....	31
Figura 6 - Animal submetido ao modelo de feridas cutâneas excisionais sem oclusão (SO).....	32
Figura 7 - Animal submetido ao modelo de feridas cutâneas excisionais ocluída com filme transparente de poliuretano (FT). ....	33
Figura 8 - Animal submetido ao modelo de feridas cutâneas excisionais ocluída hidrocolóide (HD). ....	33
Figura 9 - Esquema de seguimento dos grupos.....	34
Figura 10 - Influência da oclusão sobre o perfil temporal de fechamento de feridas cutâneas excisionais em camundongos.....	44
Figura 11 - Influência da oclusão sobre a produção do mediador inflamatório TNF- $\alpha$ em feridas cutâneas excisionais em camundongos no período de 3 a 14 dias.....	45
Figura 12 - Influência da oclusão sobre a acúmulo de neutrófilos em feridas cutâneas excisionais em camundongos. ....	46
Figura 13 - Influência da oclusão sobre a acúmulo de macrófagos em feridas cutâneas excisionais em camundongos. ....	47
Figura 14 - Influência da oclusão sobre VEGF em feridas cutâneas excisionais em camundongos.....	48
Figura 15 - Níveis de expressão de HIF-1 $\alpha$ em feridas nas condições com oclusão e sem oclusão. ....	49
Figura 16 - Influência da oclusão sobre a contagem de capilares nas feridas cutâneas excisionais em camundongos. ....	50
Figura 17 - Imagem representativa da Influência da oclusão sobre a contagem de capilares nas feridas cutâneas excisionais em camundongos .....	51

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Apresentação dos Grupos Controle e Intervenção.....	32
Quadro 2 - Protocolo da classificação da qualidade da cicatrização das feridas excisionais dos camundongos no 14º dia.....	36
Quadro 3 - Descrição dos anticorpos primário e secundário utilizados para o Western Blotting .....	41
Quadro 4 - Escala de interpretação do coeficiente Kappa. ....	42
Quadro 5 - Análise de concordância para a classificação das cicatrizes das feridas	52

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
1.1. Objetivo geral .....	19
1.2. Objetivos específicos .....	19
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1. Fundamentos da Pele .....	20
2.2. Cicatrização de Feridas Cutâneas.....	20
2.3. A Angiogênese .....	24
2.4. As coberturas e a cicatrização de feridas .....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
3.1. Tipo de Estudo e Campo de Estudo.....	28
3.2. População e Amostra.....	28
3.2.1 Animais.....	28
3.3. Cálculo Amostral.....	29
3.4. Procedimentos e Delineamento Experimental.....	29
3.4.1 Modelo de Feridas Cutâneas Excisionais.....	29
3.4.2 Grupos Experimentais e Procedimentos .....	32
3.5. Cinética de fechamento das feridas .....	35
3.6. Análise qualitativa do reparo em cicatriz das feridas.....	35
3.7. Quantificação do infiltrado de neutrófilos na região da ferida .....	36
3.8. Quantificação do infiltrado de macrófagos na região da ferida .....	37
3.9. Avaliação Histológica .....	38
3.10. Dosagem de Citocinas.....	39
3.11. Western Blotting.....	40
3.12. Análise Estatística .....	41

<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4.1. Influência da oclusão sobre o perfil temporal de fechamento de feridas cutâneas excisionais em camundongos .....	43
4.2. Influência da oclusão sobre a produção do mediador inflamatório TNF- $\alpha$ em feridas cutâneas excisionais em camundongos. ....	45
4.3. Influência da oclusão sobre o perfil de leucócitos em feridas cutâneas excisionais em camundongos.....	45
4.4. Influência da oclusão sobre a angiogênese em feridas cutâneas excisionais em camundongos. ....	47
4.5. Influência da oclusão sobre a expressão proteica de HIF-1 $\alpha$ em feridas cutâneas excisionais em camundongos .....	48
4.6. Influência da oclusão sobre a contagem de capilares.....	50
4.7. A influência da oclusão sobre análise qualitativa do processo de reparo em cicatriz de feridas cutâneas excisionais em camundongos .....	51
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>73</b>

## INTRODUÇÃO

A prática clínica, em conformidade com as evidências científicas, é imperativa mediante a necessidade de segurança do paciente e a qualidade da assistência à saúde. A prática baseada em evidências configura-se como uma forma de direcionar as ações da Enfermagem nos desafios para estabelecer o cuidado preventivo, terapêutico e tomar decisões assertivas como resposta aos diversos agravos à saúde que um indivíduo pode apresentar. (BANDEIRA, et al., 2017)

A mudança significativa no perfil dos pacientes institucionalizados, a introdução de novos tratamentos, o desenvolvimento tecnológico, a crescente expectativa de vida e o aumento no índice de adoecimento por doenças crônicas são fatores que predisõem o desenvolvimento de feridas nos pacientes com várias etiologias. Por conseguinte, internações hospitalares ou domiciliares, principalmente as de longa permanência, podem resultar em alterações cutâneas devido às combinações de fatores de risco. De modo geral, as feridas podem ser ocasionadas por traumas, processos degenerativos, circulatórios, bem como por distúrbios do metabolismo ou por alterações genéticas. Dessa forma, a perda da integridade cutânea é um dos problemas mais frequentes na prática clínica dos enfermeiros e a condução do restabelecimento integral do indivíduo com lesões de pele pode ser permeada por intervenções implementadas de forma empírica. Diante disso, a cada dia aumenta a demanda por esforços na busca de avanços científicos nessa temática. (GURTNER et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2013; CHAYAMITI, et al., 2016)

Após o estabelecimento da ferida, é necessário tratar imediatamente, a fim de recuperar de forma breve a integridade da pele, concomitante ao restabelecimento da função e da aparência do local. A cicatrização ocorre quando a perda tecidual envolve camadas da pele, além da derme profunda. A cicatrização é um processo biológico complexo, na qual ocorre uma série de interações dinâmicas entre células e matriz extracelular, com objetivo de controlar o sangramento, impedir a entrada de microrganismos, produzir tecido de granulação para substituir o que foi destruído, além de estimular a reepitelização e a formação de cicatriz. (SCHULTZ et al., 2011; SZWED, SANTOS, 2016)

A cicatrização de feridas ocorre por meio da interação entre células epiteliais, mesenquimais, residentes, bem como células da circulação sanguínea recrutadas e



uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares (NAYAK et al., 2009; WILLENBORG; EMING, 2014). O processo cicatricial pode ser subdividido em três fases, denominadas: fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento.

A fase inflamatória precoce é caracterizada pela liberação de quimiocinas e citocinas, indutoras, principalmente, da infiltração de neutrófilos e macrófagos para o leito da ferida. Ambos têm a função crítica de eliminar os agentes potencialmente infecciosos, como bactérias, fungos e vírus. Além de, no caso dos macrófagos, secretar uma série de citocinas pró-angiogênicas e pró-fibróticas fundamentais para a progressão das fases posteriores. Os macrófagos também são responsáveis por promover o recrutamento e ativação de outras células necessárias para as etapas subsequentes. (GILLITZER; GOEBELER, 2001; DELAVARY, et al., 2011; MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2017)

Na fase proliferativa, evidencia-se o estímulo do desenvolvimento do tecido de granulação, realizado pelos macrófagos, via síntese de mediadores lipídicos, como os eicosanóides, mediadores peptídicos, por exemplo citocinas e fatores de crescimento, além de proteínas necessárias ao reparo, como frações do complemento, fatores de coagulação, colagenases e metaloproteinases. Ainda nessa fase, ocorre a proliferação e migração dos ceratinócitos presentes na borda da ferida para o centro da mesma, promovendo a reepitelização. (BALBINO, et al., 2005; EMING, et al. 2007)

A fase de remodelamento caracteriza-se pela reparação final da matriz extracelular, a fim de melhorar a resistência mecânica do tecido. Ocorre a regressão dos vasos, deixando uma cicatriz avascular e o tecido resultante é caracterizado pelo aumento da densidade do colágeno (CUMMING et al., 2010; GERIS et al., 2010).

A angiogênese, que também é conhecida como neoformação vascular, destaca-se no processo de cicatrização, sendo primordial para a resolução da ferida, principalmente nas fases de inflamação e proliferação. Os capilares recém-formados direcionam a chegada das células inflamatórias, permitem a nutrição e a oxigenação do tecido que está em formação, bem como possibilitam a remoção de detritos presentes no local. Existem muitas moléculas que induzem a angiogênese. Inicialmente, a ativação desse processo foi atribuída ao fator de crescimento fibroblástico (FGF) e ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). (FOLKMAN, D'AMORE, 1996; RIDIANDRIES; et al., 2017)

Atualmente, outras moléculas foram identificadas como angiogênicas, tais como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), a angiogenina, a

angiotropina e a angiopoetina-1. Muitas dessas moléculas são proteínas e induzem a angiogênese de forma indireta, estimulando a produção de FGF e VEGF pelos macrófagos e células endoteliais, sendo, portanto, considerados indutores diretos da angiogênese. Outros fatores também podem estimular a angiogênese, como elevados níveis de ácido láctico, baixa tensão de oxigênio e aminas bioativas. (FOLKMAN, D'AMORE, 1996; RIDIANDRIES; et al., 2017)

A baixa tensão de oxigênio ( $O_2$ ) é um dos principais fatores que estimulam a angiogênese. No entanto, estudos revelam que tecidos isquêmicos e acometidos pela hipoxemia arterial, ou seja, baixa concentração de  $O_2$  no sangue apresentam um atraso no processo de cicatrização. Dessa forma, a hipóxia tecidual controlada na superfície da ferida parece ser fundamental para a angiogênese e, conseqüentemente, para uma cicatrização efetiva. Muitos autores demonstraram que o fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1  $\alpha$ ), presente mediante hipóxia, é um importante componente para a fechamento das feridas cutâneas. (GARRET et al., 1990; ZHAO et al., 1994; WU, MOSTOE, 1995; FOLKMAN, D'AMORE, 1996; SHEIKH, et al., 2000)

O HIF-1 $\alpha$  desempenha importante papel no processo de cicatrização de feridas por meio da participação ativa em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos associados ao metabolismo energético e a angiogênese. O HIF-1 $\alpha$  em condições normais de oxigênio é sintetizado e degradado durante a reação de hidroxilação e, por outro lado, mantém-se estável em condições de hipóxia. Observa-se, ainda, que os níveis de HIF-1 $\alpha$  aumentam, exponencialmente, à medida que a concentração de oxigênio diminui. (HOU et al., 2013; ESKANDANI, et al., 2017; LIN, et al., 2017)

A hipóxia no leito da ferida é uma característica que parece contribuir para o fechamento. A terapia tópica para o tratamento de feridas deve propiciar as condições ideais para a cicatrização, tais como, a umidade fisiológica, a temperatura em torno de 37°C e a baixa tensão de oxigenação. Com esta finalidade, destaca-se que a utilização de cobertura oclusivas, denominadas interativas, visa garantir o meio adequado para facilitar o processo cicatricial.

A cobertura oclusiva diminui a perda de calor e fluidos através da superfície da ferida, auxilia no debridamento autolítico e na absorção do excesso de exsudato presente na ferida, principalmente na fase inflamatória da cicatrização. A cobertura oclusiva ainda garante a hipóxia fisiológica no leito da ferida, mantendo um ambiente adequado para a angiogênese, resultando em menor tempo para a cura e,

consequentemente, maior taxa de cicatrização. (BRADLEY et al., 1999; STUCHI et al., 2010; BORGES, et al., 2008)

As coberturas oclusivas estão disponíveis no Brasil em diversos tipos de composição e estruturas, como: placa de hidrocolóide, hidrofibra, alginato de cálcio, carvão e espumas. Ressalta-se que, independentemente da composição e apresentação da cobertura, a maioria é comercializada como oclusiva, sob a argumentação de que possuem a capacidade de reduzir a tensão de O<sub>2</sub> na superfície lesada, inclusive aquelas compostas por gaze ou rayon, o que provavelmente levaria à estimulação da angiogênese. No entanto, não há estudos independentes que comprovem tal assertiva. As coberturas ditas oclusivas, geralmente, têm o custo mais elevado, pois os benefícios oferecidos são maiores quando comparadas com a gaze simples. (BRADLEY et al. 1999)

Ressalta-se que, mediante os benefícios apresentados, as coberturas oclusivas são primordialmente recomendadas para o tratamento de feridas, especialmente, as crônicas, ou seja, aquelas que demandam mais tempo e custo para cicatrizar. Dentre as tecnologias disponíveis no mercado, destaca-se o hidrocolóide como uma das coberturas oclusivas mais utilizadas e disponibilizadas em serviços de saúde brasileiro. O hidrocolóide geralmente é composto por carboximetilcelulose sódica, pectina e gelatina. Os produtos variam na espessura das placas e na estrutura da camada externa, que pode ser formada por filme ou espuma de poliuretano. De forma geral, as coberturas são autoadesivas e impermeáveis à água. (THOMAS, 1992; SKÓRKOWSKA-TELICHOWSKA et al., 2013)

Apesar da placa hidrocolóide ser um material rotineiramente prescrito pelos profissionais de saúde, principalmente pelos enfermeiros, até o momento não há estudos realizados e publicados no Brasil que comprovem alterações moleculares, morfológicas e histológicas na ferida decorrentes da ação das coberturas oclusivas. Diante do exposto, a cobertura oclusiva do tipo hidrocolóide foi escolhida para o desenvolvimento deste estudo.

A hipótese do trabalho em questão é de que a hipóxia tecidual controlada na superfície da ferida parece ser fundamental para a angiogênese e, consequentemente, uma cicatrização efetiva. Tal fato suscitou o seguinte questionamento: qual a influência da oclusão sobre a angiogênese e a cicatrização de feridas?

Dada a importância da pele para o organismo humano, faz-se necessário conhecer os processos biológicos associados ao fechamento das feridas. Ainda há uma lacuna de conhecimento, por parte dos profissionais da saúde, sobre o efeito da oclusão na cicatrização de feridas que, quando crônicas, podem permanecer abertas por meses ou anos. Portanto, torna-se necessário o entendimento desse processo com o auxílio de pesquisas que investiguem o tema e corroborem para a adoção de medidas assertivas a serem adotadas na prática clínica. Para esse fim, a adoção do modelo experimental animal é crucial para obter resultados controlados, evitando vieses que advêm de pesquisas clínicas.

Estudos experimentais que utilizam modelos animais e atendem aos preceitos éticos são validados e bem aceitos pela comunidade científica, pois conceitua-se como sendo modelo que tem seu início na pesquisa básica e a sua conclusão na aplicação prática. Os objetivos dos estudos translacionais são fornecer evidências que auxiliem no esclarecimento das lacunas do conhecimento supracitadas e elucidar informações para a identificação e a solução de problemas que minam a transferência efetiva do avanço científico para conhecimento aplicado e útil. Nesse sentido, este estudo visa avaliar a influência de coberturas oclusivas sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos C57BL/6.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1. Objetivo geral**

Avaliar a influência de coberturas oclusivas sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos C57BL/6.

### **1.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o perfil temporal de fechamento de feridas cutâneas excisionais;
- Avaliar o infiltrado de neutrófilos, macrófagos e a produção do mediador TNF-  $\alpha$  na área das feridas;
- Avaliar a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$  (HIF - 1 $\alpha$ ) na área das feridas;
- Avaliar, histologicamente, a densidade de capilares na área das feridas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Fundamentos da Pele**

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha várias funções fisiológicas necessárias à sobrevivência, como as funções de proteção, imunidade, metabólica, termorregulação, sendo por meio dela que as pessoas, em alguns aspectos, comunicam-se e interagem com o mundo. Essas funções não se limitam aos seres humanos e também apresentam atribuições e características, similares ou específicas, em outros seres vivos, como os camundongos, seres avaliados neste estudo. (TREUTING et al., 2011)

A epiderme do camundongo, sobretudo na região do dorso, é em torno de cinco vezes mais delgada quando comparada à espessura do humano. A camada espinhosa, por exemplo, em humanos, é formada por 4 a 10 fileiras de células cuboides ou ligeiramente achatadas. No camundongo, é composta por apenas uma camada celular, sendo que o focinho, os pés, os rabos e as pálpebras são as regiões em que a pele do camundongo é mais espessa. (TREUTING et al., 2011)

Em relação à derme, há poucas diferenças anatômicas além da espessura quando comparada à composição dérmica humana. Os camundongos possuem uma derme mais delgada, como nos humanos, e ambos contêm vasta quantidade de colágeno e fibras elásticas. Os mastócitos dispersos ao longo da derme são semelhantes entre camundongos e humanos. Uma diferença notável entre a derme humana e dos camundongos refere-se ao padrão de vascularização. A derme humana apresenta um sistema altamente vascularizado, bem como extensa capilaridade, sendo uma característica essencial para a termorregulação. A derme de camundongos, em contraste, é pobremente vascularizada e predomina redes capilares associadas aos folículos pilosos. A hipoderme nos camundongos apresenta tecido adiposo marrom, diferentemente do tecido adiposo de amarelo encontrado em humanos. (TREUTING et al., 2011)

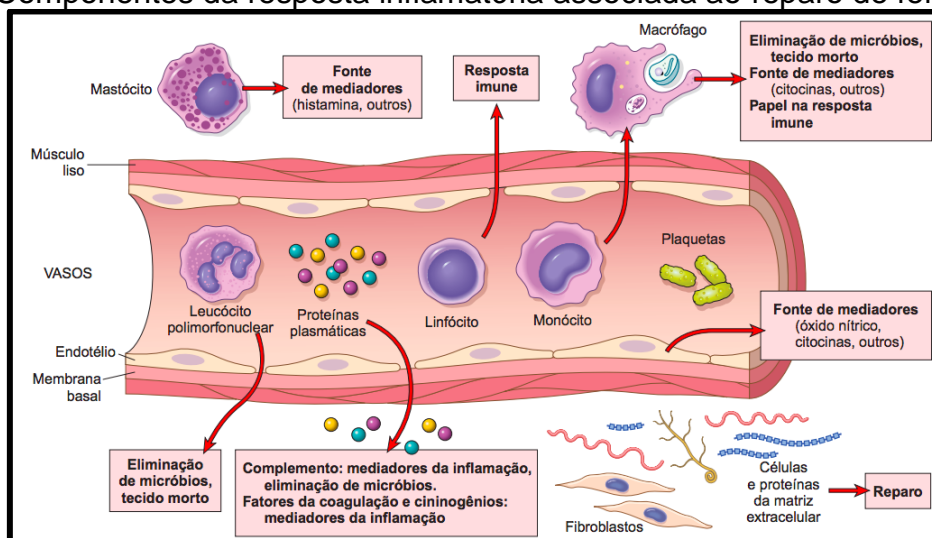
### **2.2. Cicatrização de Feridas Cutâneas**

As feridas, principalmente as ditas complexas, são um problema de saúde pública no Brasil, contribuindo fortemente para o afastamento do convívio social,

interfere negativamente na qualidade de vida e compromete a capacidade funcional do sujeito. (TAVARES, et al., 2017)

Por conseguinte, existe uma busca incessante, principalmente dos profissionais da Enfermagem para compreender os processos que podem propiciar a recuperação de feridas de forma breve. Compreender esses processos pode facilitar a prática clínica, acima de tudo, no momento de decidir qual metodologia adotar para a assistência ao paciente. A cicatrização de feridas é um processo complexo que ocorre de forma coordenada e envolve componentes celulares, bioquímicos e moleculares, interagindo para que a reconstituição tecidual seja bem-sucedida. Os principais componentes envolvidos na cicatrização, tais como, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, citocinas, entre outros, estão representados na Figura 1. (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007)

Figura 1- Componentes da resposta inflamatória associada ao reparo de feridas.



Fonte: Kumar; Abbas; Aster; 2013.

Segundo Sibbald e colaboradores (2014), a cicatrização bem-sucedida de uma ferida perpassa pelo tratamento centrado no paciente, preparação do leito e tratamento das causas subjacentes. No entanto, é fundamental interpretar os fatores que afetam os eventos cicatrizantes. Para que ocorra a restauração da homeostase cutânea após uma lesão, três fases se sobrepõem: a inflamatória, a proliferativa e a remodelação, ou seja, a maturação tecidual.

O primeiro estágio de reparação de feridas é a inflamação, ou seja, alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas que ocorrem imediatamente após o dano tecidual, por um período de até 48 horas. Dentre os fatores necessários para que o

processo inflamatório ocorra estão os componentes da cascata de coagulação e a ativação do sistema imunológico.

A participação do sistema imunológico se inicia pela infiltração dos leucócitos para o leito da ferida. Os leucócitos são células que têm como função importante participar ativamente da eliminação de microrganismos. Este arcabouço é vital para evitar perdas contínuas de sangue e fluidos, para remover os tecidos mortos e desvitalizados e para prevenir infecções. (PORTOU et al., 2015)

Dessa forma, a cicatrização de feridas é um processo dinâmico e interativo, envolvendo mediadores solúveis, células sanguíneas, matriz extracelular e células parenquimatosas. A lesão tecidual provoca a ruptura dos vasos sanguíneos e o extravasamento de constituintes sanguíneos. O coágulo sanguíneo restabelece a hemostasia e fornece uma matriz extracelular provisória para a migração celular. As plaquetas não só facilitam a formação de um *plug* hemostático, mas também secretam vários mediadores da cicatrização, como o fator de crescimento derivado das plaquetas, que atraem e ativam macrófagos e fibroblastos. (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015)

Os neutrófilos são células que atuam como coletores de resíduos e, na presença de lesões, são expostos a um gradiente de quimioquinas dentro da pele. Estas células migram para o local da ferida e lá permanecem pelo período de 2 a 5 dias. Os neutrófilos podem executar o processo fagocítico e remover patógenos e detritos celulares, exercendo, também, a função de debridamento da ferida, liberando várias substâncias antimicrobianas. Além disto, os neutrófilos produzem citocinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ), interleucinas e todos amplificadores de resposta à inflamação. (LANDÉN; STÁHLE, 2016)

Os monócitos também podem infiltrar-se para o local da ferida, transformando-se em macrófagos ativados que liberam fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF - *Platelet-derived growth factor*) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*), iniciando, assim, a formação de tecido de granulação. Essa transformação do monócito em macrófago ocorre em resposta à quimioatraentes específicos, tais como fragmentos de proteína da matriz extracelular, fator de transformação do crescimento  $\beta$  (ou - *transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) e proteína quimioatraente de monócitos. (WILLENBORG; EMING, 2014)



Os macrófagos são o tipo de célula inflamatória mais abundante em todas as fases da cicatrização tecidual e possuem uma importante moldabilidade funcional. Além disto, podem exercer diferentes funções a partir de uma situação específica em que forem convocados, variando, da ativação clássica (M1), entre funções pró-inflamatórias, imunes e removendo detritos. A ativação alternativa (M2) estimula angiogênese, a remodelação tecidual e a resolução da fase inflamatória.

A fase inflamatória mostra-se essencial, uma vez que leva à homeostase e recrutamento imunológico inato, capaz de manter o local da ferida de agentes patogênicos e remoção de tecidos mortos. Caso a inflamação persista, os neutrófilos e macrófagos produzem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias e criam um ambiente proteolítico no local do ferimento. (LANDÉN; STÁHLE, 2016)

O segundo estágio, o proliferativo, ou seja, de formação do novo tecido, ocorre entre três e dez dias após a lesão e é caracterizado pela proliferação e migração de diferentes tipos de células. O primeiro evento é a migração de queratinócitos sobre a derme lesada, logo após são formados novos vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese. São formados, ainda, os brotos de capilares associados a fibroblastos e macrófagos que substituem a matriz de fibrina por tecido de granulação, e constitui um novo substrato para a migração de queratinócitos nos estágios posteriores do processo de reparo. (EMING et al., 2014)

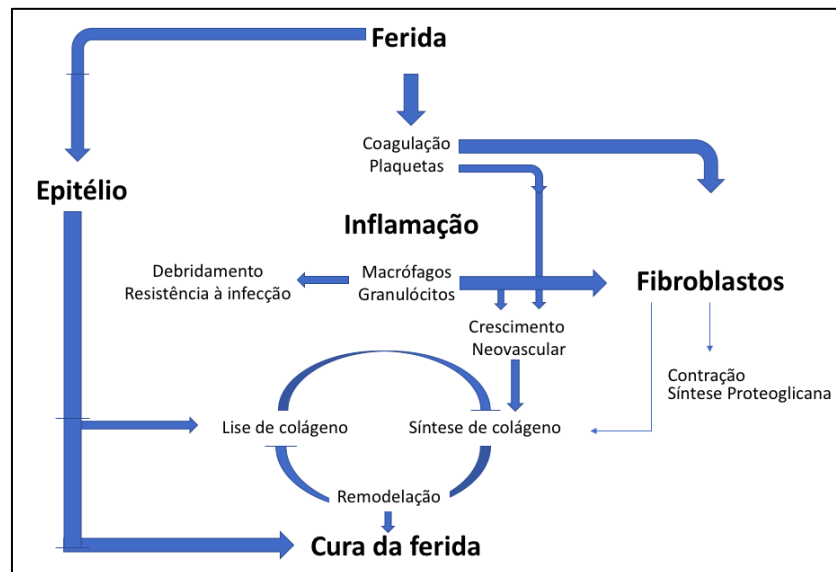
Um novo estroma, também chamado de tecido de granulação, começa a invadir o espaço da ferida, aproximadamente quatro dias depois da lesão. Numerosos capilares novos dotam o novo estroma com sua aparência granular e macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos se movem para o espaço da ferida. Os macrófagos fornecem uma fonte contínua de fatores de crescimento necessários para estimular a fibroplasia e angiogênese. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária para suportar o crescimento e os vasos sanguíneos transportam oxigênio e nutrientes necessários para sustentar o metabolismo celular. (DECKER et al, 2016)

Os fatores de crescimento, especialmente o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), juntamente com as moléculas da matriz extracelular, possivelmente estimularão os fibroblastos do tecido ao redor da ferida para proliferar receptores de integrina apropriados e migrar para o espaço interno da ferida. De fato, o PDGF acelera a cicatrização de lesões por pressão e as úlceras em pessoas diabéticas. Portanto, o PDGF tem sido utilizado com algum sucesso no tratamento dessas feridas. (DECKER et al., 2016)

O terceiro estágio de reparação de feridas é a remodelação que começa entre duas e três semanas após a lesão e dura um ano ou mais. Durante essa fase, todos os processos ativados após a lesão diminuem e cessam. A maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos, sofrem apoptose, isto é, morte celular programada, ou migram para outros locais, deixando uma massa que contém poucas células, consistindo, principalmente, de colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular. (DARBY et al., 2014)

Essa matriz extracelular provisória, por sua vez, é progressivamente substituída por uma matriz colágena, provavelmente como resultado da ação de TGF- $\beta$ . Após uma abundante matriz ser depositada na ferida, os fibroblastos param de produzir colágeno e o tecido de granulação, rico em fibroblastos, é substituído por uma cicatriz relativamente acelular (Figura 2). As células na ferida sofrem apoptose. A desregulação desses processos ocorre em distúrbios fibróticos, como a formação de quelóide, morféia e esclerodermia. (XUE; JACKSON, 2015)

Figura 2 - Fluxograma representando o processo de cicatrização.



Fonte: Adaptado de Ruh et al., 2013.

### 2.3. A Angiogênese

A angiogênese possui papel fundamental no processo de reparo da ferida. O controle exercido sobre o crescimento e regressão dos vasos é feito por meio de sinalizações que atuam sobre as células do endotélio, diretamente advindos do microambiente dinâmico da ferida, portanto, a angiogênese é induzida e controlada

durante todo o processo, restaurando a homeostase vascular tecidual. (KRUSE et al., 2015; MAEDA et al., 2017)

A formação de novos vasos sanguíneos é necessária para sustentar o tecido de granulação recém-formado. A angiogênese é um processo complexo, que se baseia na matriz extracelular presente no leito da ferida, bem como na migração e na estimulação mitogênica das células endoteliais. (DUSCHER et al., 2015).

A indução da angiogênese foi inicialmente atribuída ao fator de crescimento de fibroblastos ácidos ou básicos. Posteriormente, foi verificado que muitas outras moléculas também têm atividade angiogênica, incluindo o VEGF, TGF- $\beta$ , angiogenina (Ang), angiotropina, angiopoietina-1 (Ang – 1), trombospondina (TSP1), entre outros. (DUSCHER et al., 2015)

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) se destaca por tratar-se de um indutor angiogênico que atua como um fator de crescimento modulador do processo de cicatrização e de granulação. A regulação de VEGF, produzido, principalmente, por macrófagos e queratinócitos no local da ferida, é realizada por citocinas pró-inflamatórias, induzindo a expressão de VEGF em outras células. O VEGF é também produzido por células endoteliais, sendo conhecido por fazer parte dos processos de angiogênese e síntese de colágeno nas feridas. (WIETECHKA et al, 2012)

Outra característica comumente observada em novas feridas é a hipóxia, resultante da interrupção do fluxo sanguíneo no local da ferida, bem como pelo alto consumo de oxigênio pelas células que se dividem rapidamente no local. Esse fenômeno hipóxico causa a ativação de uma proteína que atua como fator de indução de hipóxia, denominada HIF-1 $\alpha$ , que é expressa por uma variedade de células participantes do processo de cicatrização. O HIF-1 $\alpha$  é responsável pela ativação da transcrição de genes que produzem proteínas que aumentam a entrega de oxigênio no local da ferida ou adaptam à redução do suprimento de O<sub>2</sub>.

A hipóxia é considerada o regulador transcricional mestre da resposta celular e de desenvolvimento à hipóxia. A desregulação e a superexpressão de HIF-1 $\alpha$  por hipóxia ou alterações genéticas têm sido fortemente implicadas na biologia do câncer, bem como uma série de outras fisiopatologias, especificamente em áreas de neovascularização, metabolismo energético, sobrevivência celular e invasão tumoral. (SEMENZA, 2003)

Essas fisiopatologias, por sua vez, aumentam o metabolismo glicólico, controlam o tônus dos vasos sanguíneos e o processo de angiogênese. O HIF-1 $\alpha$  ainda regula a homeostasia do O<sub>2</sub>, estimulando a ativação de receptores de quimiocinas, além de outras funções no processo de cicatrização da ferida. (SEMENZA, 2000; KIMMEL, et al., 2016; TRUJILLO et al., 2017)

Durante o estado de hipóxia, as células sobrevivem por meio de mecanismos e metabolismo anaeróbios que possuem, como característica, a produção e o aumento dos níveis de lactato, redução do pH e ativação de fatores de indução, como por exemplo a HIF, fatores de regulação de vasodilatação, tal como o óxido nítrico, e a angiogênese, por meio do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Coloca-se, ainda, que as HIFs, de maneira geral, estimulam vários sinalizadores angiogênicos por meio de VEGF e NO, exercendo-se, assim, mediação na sobrevivência celular. (KRUSE et al., 2015).

A perda de HIF-1 $\alpha$  é geradora de grave defeito no processo de reepitelização, como observado por Haertel e colaboradores (2014), em seu estudo utilizando camundongos idosos, uma vez que a migração de ceratinócitos é prejudicada. Por fim, a falta de HIF-1 $\alpha$  aliada ao quadro de hipóxia, leva à defeitos na diferenciação de miofibroblastos, uma reduzida deposição de colágeno e angiogênese tardia, alterando-se, assim, o processo de cicatrização. Apesar de já ser consolidada a resposta de HIF-1 $\alpha$  em relação à hipóxia, não se pode afirmar, até o momento, se a baixa tensão de oxigênio no leito da ferida pode estimular a neovascularização.

Mesmo diante do fato de que o HIF-1 $\alpha$  é responsável por induzir transcrição de mais de 60 genes, incluindo VEGF e eritropoietina, que estão envolvidos em processos biológicos, como angiogênese e eritropoiese, que ajudam a promover e aumentar a distribuição de oxigênio para regiões hipóxicas, seu papel biológico dinâmico em resposta aos níveis sistêmicos de oxigênio precisa ser investigado. (SEMENZA, 2003)

O uso de curativos oclusivos tem, por finalidade, auxiliar a redução de tensão de O<sub>2</sub> no leito da ferida, além de manter o ambiente do ferimento úmido, uma vez que esse fator propicia melhoras na qualidade do tratamento e diminui o tempo necessário para a cura. Os curativos oclusivos facilitam, ainda, a cicatrização de feridas pelo efeito positivo sobre o trabalho de migração das células epiteliais, redução da inflamação no local do ferimento, redução da taxa de necrose e diminuição do tempo de fechamento da ferida. (ZHAI; MAIBACH, 2007; KRUSE et al., 2015)

## 2.4. As coberturas e a cicatrização de feridas

Nos primórdios do tratamento de feridas, vários materiais foram utilizados como mecanismo de terapia tópica, dentre eles, o mel, variados tipos de óleos e plantas, a fim de prevenir infecções e reduzir a dor do paciente. Ao longo das últimas décadas, os produtos tiveram crescimento exponencial, em qualidade e variedade, e todos são ditos capazes de influenciar o ambiente da ferida e, por consequência, o processo de cicatrização. Atualmente, acredita-se que um material apto a oferecer capacidade protetiva, aliada à influência positiva no processo de cicatrização seria clinicamente vantajoso e, por isso, materiais têm sido continuamente desenvolvidos e atualizados. (KRUSE et al., 2015)

Assim, surgiu o conceito de cobertura ideal, ou seja, um produto que garanta um ambiente adequado para a cicatrização de feridas conforme supracitado. Neste estudo, faz-se necessário o uso de coberturas oclusivas, pois a oclusão cria um ambiente que favorece a hidratação da epiderme, a inicialização da resposta imune, regulando o comportamento dos fibroblastos presentes na derme, influenciando a síntese de colágeno e promovendo uma melhor cicatrização. Além disso, essas coberturas são capazes de manter a temperatura adequada e possibilitam a hipóxia no leito da ferida por meio da diminuição da tensão do oxigênio local. (BORGES, et al., 2008; O'SHAUGHNESSY et al., 2009)

O hidrocolóide é um curativo oclusivo, amplamente utilizado no Brasil em todos os níveis de atenção à saúde do paciente com feridas. A apresentação mais comum é a placa. Os produtos de hidrocolóide são compostos de carboximetilcelulose sódica e gelatina. As placas possuem duas camadas, compostas por filme e/ou espuma de poliuretano. A parte externa da cobertura é impermeável a água, vapor úmido, bactérias e outros agentes externos. Já a parte interna é composta por partículas hidroativas, à base de carboximetilcelulose, pectina e gelatina que interagem com o exsudato da ferida, formando um gel e mantendo o ambiente úmido. A camada impermeável da cobertura isola a ferida do ar atmosférico, provocando hipóxia no leito da ferida e estimulando a angiogênese (BORGES, et al., 2008; DUMVILLE et al., 2012). Ressalta-se que o hidrocolóide, selecionado para o presente estudo, é do tipo placa com filme transparente de poliuretano.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Tipo de Estudo e Campo de Estudo**

Esta pesquisa tratou-se de um estudo pré-clínico translacional comparativo controlado. Os procedimentos deste estudo ocorreram no Laboratório de Angiogênese e Células-Tronco do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e no Núcleo de Experimentação Animal da Escola de Medicina da UFMG.

#### **3.2. População e Amostra**

##### **3.2.1 Animais**

Os animais utilizados foram camundongos machos, saudáveis, da linhagem C57BL/6, com idades entre 7 a 8 semanas e peso de 17 a 20 gramas. Esses animais foram obtidos do Centro de Biotério (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no biotério do Núcleo de Experimentação Animal da Escola de Medicina da UFMG, sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro 12h), em gaiolas individuais, com livre acesso a ração e a água, sendo a limpeza das gaiolas realizada duas vezes por semana.

Após o procedimento cirúrgico, os camundongos permaneceram no Núcleo de Experimentação Animal, em gaiolas, separados individualmente, mantendo livre acesso a ração e a água. Os procedimentos experimentais nas lesões foram conduzidos sob condições assépticas para evitar infecções.

Todos esses procedimentos foram realizados em conformidade com as normas estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Bethesda, Md, 1996)*, nas condições aprovadas pelo Comitê de Ética Animal local, CEUA/UFMG (protocolo número 117/15) e Comitê Institucional do Bem-Estar Animal da UFMG (ANEXO A).

### 3.3. Cálculo Amostral

O tamanho da amostra foi calculado a partir da análise de um intervalo de confiança de 95% para média (nível de significância de 5%) e 80% de chance de detecção de diferença entre as médias (poder estatístico de 80%), conforme a fórmula descrita por Eng (2003). Ainda, a mesma fórmula descrita foi utilizada para calcular o número de animais por grupo [ $N = (4\sigma^2 (Z_{crit} + Z_{pwr})^2) / D^2$ ], tendo como referência a média e o desvio padrão de experimentos anteriores: parâmetro analisado-ferida excisional; média 1 (1132); média 2 (921,8); diferença esperada entre médias (18,57); desvio padrão 1 (126,1); desvio padrão 2 (115,9); DP em % (11,9); DP em decimais (0,12); critério de significância (95%); Zcrit (1,95); poder estatístico (85%); Zpwr (1,036),  $Z_{crit}+Z_{pwr}^2$  (8,916); diferença esperada (0,19 % em decimais); N amostral / grupo (7,27014), sendo considerado 8 animais por grupo (ENG J. 2003).

O estudo consistiu em três grupos, tendo intervenção com hidrocolóide (HD), filme transparente de poliuretano (FT) e sem oclusão (SO). Cada grupo foi acompanhado individualmente e com eutanásia prevista para 3, 6 e 14 dias após a origem do ferimento excisional.

### 3.4. Procedimentos e Delineamento Experimental

#### 3.4.1 Modelo de Feridas Cutâneas Excisionais

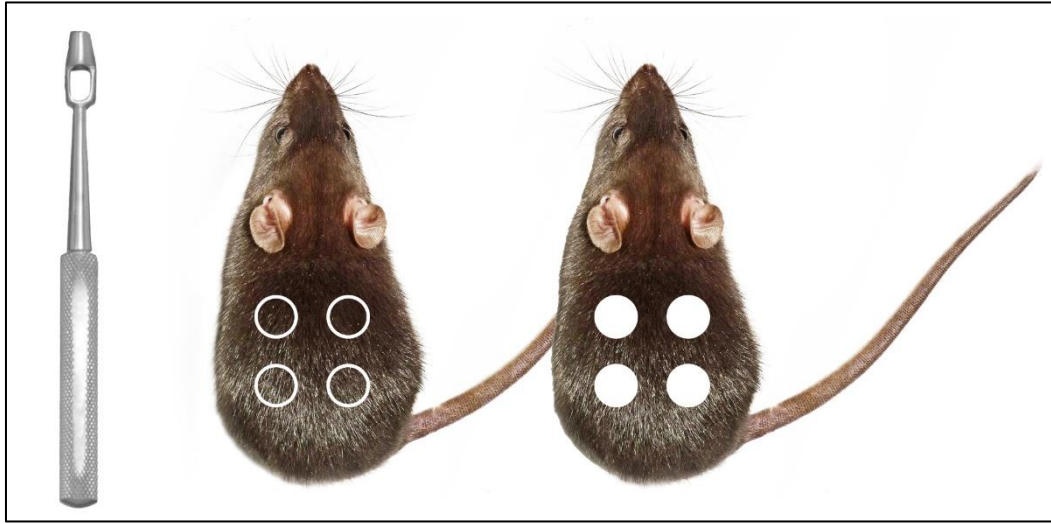
Os animais permaneceram por, aproximadamente, cinco dias no Núcleo de Experimentação Animal para ambientação e adaptação, nas condições previamente expostas. Somente após esse período, iniciaram-se os procedimentos cirúrgicos.

Utilizou-se o modelo de feridas cutâneas excisionais, conforme descrito por Canesso e colaboradores (2014), e por Moreira e colaboradores (2015). Para tanto, animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg) por via intraperitoneal, dose preconizada pelo CEUA. Em seguida, foi realizada a tricotomia com aparelho portátil e antisepsia com solução alcoólica a 70% da região dorsal do animal e confeccionadas as feridas (Figura 3 e Figura 4).

As feridas cutâneas excisionais foram originadas por meio de pressão na pele da região dorsal dos camundongos com um *punch* cirúrgico dermatológico de 5mm de diâmetro. Considerando a quantidade de material necessário para as análises

propostas, foram feitas quatro feridas excisionais no dorso dos camundongos. O procedimento consistiu da retirada de toda a extensão do tecido cutâneo, incluindo epiderme, derme e hipoderme. As feridas foram originadas com uma distância de, aproximadamente, 0,5 a 1,0 cm entre si. Além disso, as feridas foram padronizadas quanto às análises realizadas (Figura 5).

Figura 3 - Excisão do Dorso



Fonte: Adaptado de GALIANO et al. 2004.

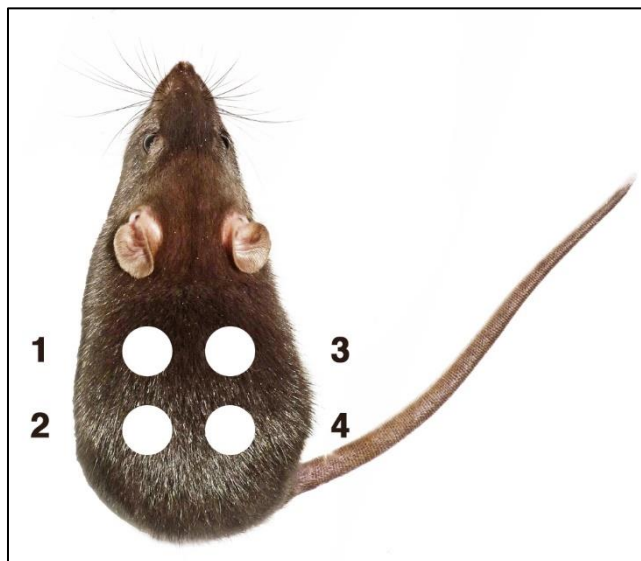
Figura 4 - Excisão do Dorso



Fonte: Fotos da autora (2017)



Figura 5 - Padronização de feridas para análise



Finalidade das amostras Ferida 1- Western Blotting. Ferida 2 – Histologia. Ferida 3 – NAG/MPO. Ferida 4 – Extra. Fonte: Adaptado de GALIANO et al. 2004.

Após a confecção das feridas, elas foram higienizadas com solução salina 0,9% e realizados procedimentos de aplicação das coberturas, conforme desenho experimental. Em seguida, os animais permaneceram em ambiente sem ruídos e sob manta térmica durante todo o período de recuperação anestésica, sendo continuamente avaliados. Posteriormente, os animais foram distribuídos em gaiolas individualizadas.

Ao final do seguimento experimental desses animais (dias 3, 6 e 14), foi realizada a remoção das feridas com o auxílio de um *punch* cirúrgico de 8mm de diâmetro. Ao término de cada período experimental, todos os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico (xilazina (20 mg/kg) + cetamina (160 mg/kg), preparada em solução salina a 0,9% estéril, administrada por via intraperitoneal, seguida por deslocamento cervical conforme recomendado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

### 3.4.2 Grupos Experimentais e Procedimentos

Os camundongos (n=24) foram divididos, aleatoriamente, em três grupos (n=8/grupo) distintos e, conforme o desenho experimental, aplicou-se coberturas de filme transparente de poliuretano ou hidrocolóide sobre as lesões do dorso do animal, exceto os animais alocados no grupo sem oclusão (Quadro 1, Figura 6, Figura 7 e Figura 8).

Quadro 1 - Apresentação dos Grupos Controle e Intervenção

Grupo	Características
<b>Controle 1 – SO</b>	Animais submetidos ao modelo de feridas cutâneas excisionais <b>sem oclusão (SO)</b> , eutanasiados nos dias 3, 6 e 14 após a cirurgia.
<b>Controle 2 – FT</b>	Animais submetidos ao modelo de feridas cutâneas excisionais <b>ocluída com filme transparente de poliuretano (FT)</b> eutanasiados nos dias 3, 6 e 14 após a cirurgia.
<b>Intervenção – HD</b>	Animais submetidos ao modelo de feridas cutâneas excisionais, <b>ocluída com hidrocolóide (HD)</b> , eutanasiados nos dias 3, 6 e 14 após a cirurgia.

Figura 6 - Animal submetido ao modelo de feridas cutâneas excisionais sem oclusão (SO).



Fonte: Acervo da autora (2017).

Figura 7 - Animal submetido ao modelo de feridas cutâneas excisionais ocluída com filme transparente de poliuretano (FT).



Fonte: Acervo da autora (2017).

Figura 8 - Animal submetido ao modelo de feridas cutâneas excisionais ocluída hidrocolóide (HD).



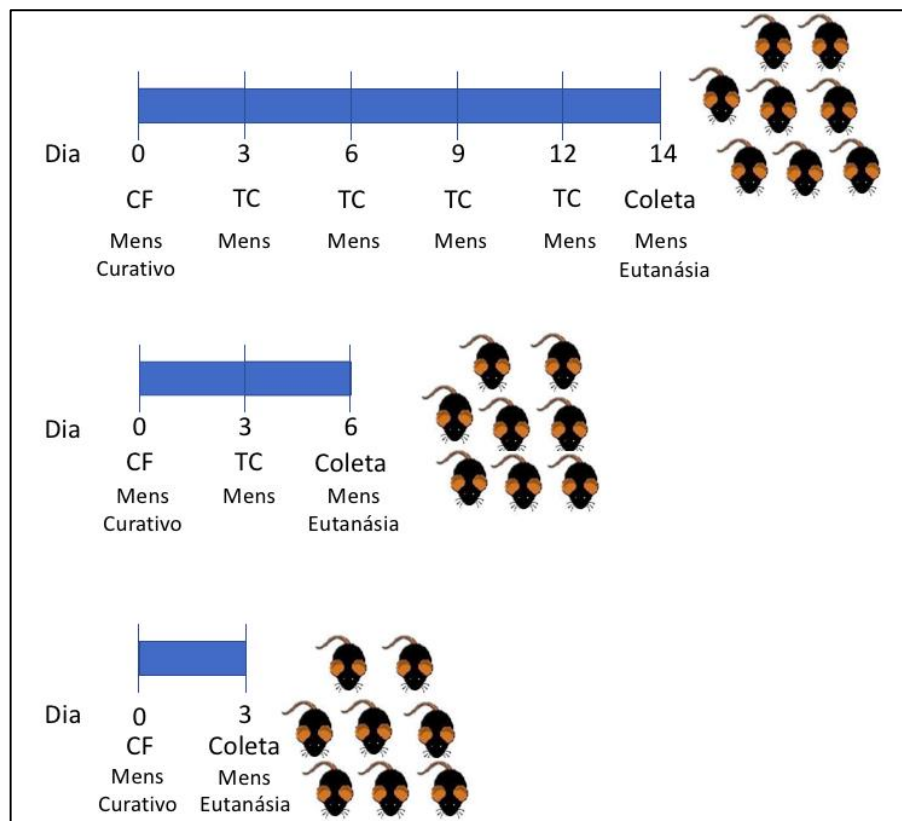
Fonte: Acervo da autora (2017).

As trocas das coberturas ocorreram a cada 72h, sendo esse intervalo definido por ser um tempo favorável de permanência das coberturas no dorso do animal, conforme modelo padronizado por Amorim e colaboradores (2016), e por ser um intervalo médio no qual a cobertura oclusiva permanece em feridas de humanos.

As trocas das coberturas foram acompanhadas de procedimentos e avaliação, sendo, primeiramente, removida a cobertura anterior (grupos FT e HD), a seguir realizada limpeza da ferida com solução salina 0,9% morna, em jato único, com pressão obtida por meio da conexão de uma agulha 25x8mm na bolsa de solução salina 0,9% de 100 ml; mensurada a área da ferida e feito o registro fotográfico e, por fim, aplicadas novas coberturas, conforme alocação dos grupos (Figura 9).

Os procedimentos descritos foram realizados com o animal sob o efeito de anestésicos, minimizando a dor, o desconforto e o estresse durante as manipulações. Ao término de cada etapa experimental (dias 3, 6 e 14) e após os procedimentos descritos, coletou-se as feridas e a pele periférica com o auxílio de um *punch* de 8mm. Esta coleta fez-se necessária para a realização das análises propostas neste estudo.

Figura 9 - Esquema de seguimento dos grupos.



Legenda: CF: cinética de fechamento; TC: troca de curativo; Mens: mensuração  
 Fonte: Elaborado pela autora (2017).

### **3.5. Cinética de fechamento das feridas**

A análise da cinética permite averiguar o perfil temporal de fechamento de feridas cutâneas excisionais por meio de mensuração da área lesada. Para tanto, nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 14 foram realizados o registro fotográfico e a mensuração da ferida com um paquímetro digital, da marca Dexter, com sensibilidade mínima de 0,01mm e máxima de 150mm.




Os resultados foram expressos em porcentagem de fechamento relativo ao tamanho original da ferida, utilizando-se a seguinte fórmula:  $[1 - (\text{área da ferida}) / (\text{área original da ferida}) \times 100]$ , conforme descrito por Canesso e colaboradores (2014).

### **3.6. Análise qualitativa do reparo em cicatriz das feridas**

Conforme descrito anteriormente, as feridas do 14º dia foram fotografadas com máquina digital Samsung NX1, lente 60mm, e analisadas, macroscopicamente, por dois avaliadores quanto ao fechamento da ferida e a estética da cicatriz. Para tanto, os juízes receberam as fotos dos animais de todos os grupos (24 imagens) no segmento estabelecido e, de forma “mascarada”, classificaram as feridas conforme a descrição apresentada a seguir (Quadro 2).



Quadro 2 - Protocolo da classificação da qualidade da cicatrização das feridas excisionais dos camundongos no 14º dia.

Características	Imagem Representativa
<p>Ferida Totalmente Cicatrizada (esteticamente adequada, uniforme, linear)</p>	
<p>Ferida Parcialmente Cicatrizada (presença de descamação e/ou crosta, não linear, esteticamente inadequada)</p>	
<p>Ferida Não Cicatrizada</p>	

Fonte: Proposta elaborada pela autora (2017).

### 3.7. Quantificação do infiltrado de neutrófilos na região da ferida

O indicador de infiltração neutrofílica nas feridas foi avaliado por meio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). As feridas e a pele periférica foram removidas com o auxílio de um *punch* dermatológico de 8mm, congeladas e

estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o dia da homogeneização do tecido. (SOUZA et al., 2002; CASSINE-VIEIRA et al., 2014).

Após o descongelamento das amostras de tecido, elas foram pesadas e homogeneizadas em tampão (0,1 M NaCl; 0,02 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ; 0,015 M NaEDTA - pH 4,7), na proporção de 1 mL de tampão para cada 100 mg de tecido, utilizando-se o homogeneizador de tecidos (Ultra-turrax). Após esse procedimento, o material foi centrifugado a 10.000g/10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% - 30s após).

Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em tampão 2 ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,05 M; *Hexadecyl trimethyl ammonium bromide* – HTAB - Sigma 0,5% p/v - pH 5,4), na proporção de 1 mL para cada 100mg de tecido. Após essa etapa, o homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g/15 minutos e foi recolhido o sobrenadante para a realização do ensaio. As amostras foram diluídas no tampão 2 na razão 1:6 (CANESSO et al., 2014).

A atividade da mieloperoxidase foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando a reação entre tetramethylbenzidine diluído em dimetilsulfóxido (1,6 mM) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 mM). A reação foi parada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro. Os resultados obtidos foram expressos como unidade relativa, de acordo com curva padrão do número de neutrófilos versus OD que foi obtida pelo processamento de neutrófilos purificados (>95% pureza) e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase, padronização esta realizada anteriormente em laboratório (SOUZA et al., 2002; CASSINE-VIEIRA et al., 2014).

### **3.8. Quantificação do infiltrado de macrófagos na região da ferida**

A N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica presente em níveis elevados no macrófago ativado. Sendo assim, a infiltração de células mononucleares na ferida foi quantificada utilizando-se esses indicadores (MARQUES et al., 2011).

Conforme Canesso e colaboradores (2014), as feridas e a pele periferida foram extraídas com o auxílio de um *punch* dermatológico de 8mm, congeladas imediatamente e estocadas a -20°C até o dia da homogeneização do tecido. Após o descongelamento do tecido, este foi pesado e homogeneizado, utilizando-se o homogeneizador de tecidos (Ultra-turrax) com solução salina 0,9% (4°C) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Merck) na proporção de 1,9 mL de solução para cada 100mg de tecido. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 4°C 3.000g/10min. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio da N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG).

A reação foi iniciada após a adição de 100  $\mu$ L de p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (Sigma-Aldrich), dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH=4,5), concentração final de 2,24 mM, a 100  $\mu$ L da amostra (sobrenadante recolhido após centrifugação do tecido) diluída em tampão citrato/fosfato (1:10). A reação processou-se a 37°C/10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 $\mu$ L de tampão glicina 0,2 M (pH=10,6) e quantificada em espectrofotômetro a 405 nm.

### 3.9. Avaliação Histológica

A remoção da ferida e da pele periferida ocorreu conforme descrito anteriormente. Em um primeiro momento, as amostras foram fixadas utilizando solução formalina, seguida das etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina com 12 banhos sequenciais, usando processador de tecidos marca LUPTEC (modelo PT05).

Os blocos de parafina, por sua vez, foram submetidos à microtomia com secções de 5  $\mu$ m de espessura de 5 $\mu$ m (MICROS, modelo Razor). Em seguida, os cortes foram corados com Picrosirius *red*, que foram analisados em microscópio óptico (objetiva de 40X, ocular de 10X) e registrados fotograficamente por uma câmera digital acoplada ao microscópio por meio do software ImageProPlus, versão 4.5.0.29 para Windows 98/NT/2000. Em todos os cortes, a área total da ferida foi fotografada.

A fim de evidenciar a angiogênese, foi realizada a contagem do número de capilares na região da ferida nos segmentos D3 e D6. As análises histomorfométricas



foram realizadas por dois avaliadores independentes, de “forma mascarada”. A contagem dos capilares ocorreu nos primeiros 20 campos fotografados.

### 3.10. Dosagem de Citocinas

As citocinas avaliadas foram TNF- $\alpha$  e VEGF. A avaliação ocorreu por meio da reação imunoenzimática de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se anticorpos adquiridos do fabricante R&D Systems (Minneapolis, USA) de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

Para dosagem das citocinas, amostras de ferida foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato (PBS) (0,4 M NaCl e 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) contendo inibidor de proteases (0,1 mM *phenylmethanesulfonyl fluoride*, 0,1 mM *benzethonium chloride*, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% *Tween* 20, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução. Também foi utilizado homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - *Fischer Scientific Pennsylvania*, USA).

As amostras foram mantidas a -20° C para posterior realização do ensaio enzimático. Todos esses ensaios enzimáticos foram realizados em placas de 384 poços, que foram sensibilizadas com 10 $\mu$ L/poço de solução dos respectivos anticorpos monoclonal anti-camundongo para quimiocinas/citocinas a serem analisadas e incubadas a 4°C *overnight*. Após quatro lavagens (*Bio-Tek Instruments*, INC) com PBS-Tween 20 (0,05% - pH=7,4), adicionou-se às placas 30 $\mu$ L por poço de tampão bloqueio (1% albumina bovina-BSA em tampão fosfato salino - PBS pH=7,4) que foram, então, incubadas a temperatura ambiente por, no mínimo, uma hora. Após nova etapa de lavagem, adicionou-se 10 $\mu$ L/poço dos padrões e das amostras diluídas (1:3) em BSA-PBS (0,1% - pH=7,4) e prosseguiu-se nova incubação a 4°C *overnight*. Após lavagem das placas, adicionou-se 10 $\mu$ L/poço de solução de anticorpo de detecção anti-camundongo para as citocinas/quimiocinas em questão e incubaram-se as placas por duas horas. Após nova lavagem, adicionou-se 15 $\mu$ L/poço de solução de estreptavidina (1 $\mu$ L de estreptavidina em 15mL de solução BSA 0,1%) e incubou-se por 1 hora. Após esse intervalo de tempo foi adicionado 15 $\mu$ L/poço o substrato OPD (o-fenilenodiamina, Sigma), diluído em tampão citrato (pH=5,0) acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v). As placas foram encubadas ao abrigo da luz por 30 minutos ou até que a reação ocorresse. A reação foi interrompida com a adição de 15 $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M

e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm. Todos os passos de incubação (exceto *overnight*) foram feitos à temperatura ambiente.

### 3.11. Western Blotting

Os tecidos epiteliais, coletados de cada grupo submetido à indução de feridas, foram pesados e transferidos para *eppendorfs* de 2,0 mL. Para cada 50-100 mg de tecido foi adicionado 500 µL de tampão de lise (*RIPA Buffer*). A seguir, os tecidos foram homogeneizados no *TissueLyser II* (Qiagen), contendo uma *bead*, para facilitar o processo de homogeneização, com velocidade de 30 Hz (1.800 oscilações por minuto) por 5 minutos. Em seguida, os lisados foram removidos do *TissueLyser II* (Qiagen) e centrifugados por 5 minutos à 800 x g (800 rotações por minutos) a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo *eppendorf* de 0,5 mL, enquanto o *pellet* (material descartado) e a *bead* recuperada.

Após homogeneização, os tecidos lisados foram mantidos no gelo por 20 minutos, enquanto alíquotas de cada lisado eram submetidas à quantificação de proteínas e armazenadas a -80°C até análises posteriores.

A quantificação proteica foi realizada como descrita no método de Bradford. Entre 1,0 e 2,0 µL de extrato proteico era adicionado ao reagente de Bradford em microplacas de 96 poços. Após a homogeneização, a mistura foi levada para leitura das absorbâncias no leitor de microplacas Victor™ X4 no comprimento de onda de 595 nm. Em cada dosagem, uma curva de calibração com albumina sérica bovina (0,2 a 2,0 µg) foi utilizada como padrão (BRADFORD, 1976).

Quantidades iguais de proteína (30-50 µg) foram incubadas a 95°C por cinco minutos e, em seguida, separadas em gel de poliacrilamida. As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120 volts e com tempo máximo de duas horas.

Sequencialmente, foi realizada transferência para membrana PVDF (fluoreto de polivinilideno hidrofóbico) (0,45µm; 300 mm x4m - GE *Healthcare Life Science, Fairfield* – EUA), previamente ativada em metanol, utilizando-se o aparato semi-dry com voltagem fixa de 20 volts e tempo de transferência de 25 a 30 minutos. Todas as membranas foram coradas com Ponceau S para monitorar a qualidade da transferência.

As membranas de PVDF foram lavadas com TBS-T (tampão) por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos) e incubadas à temperatura ambiente por uma hora, em solução de leite 5% com TBS-T. As membranas foram incubadas *overnight* (por 12 horas) a 4°C com os anticorpos primários de interesse (Quadro 3), diluídos em solução de leite 1% cm TBS-T.

Quadro 3 - Descrição dos anticorpos primário e secundário utilizados para o Western Blotting

Anticorpo	Número de Catálogo	Diluição	Fornecedor
HIF-1 $\alpha$	SC-53546	1:200	Santa Cruz
$\beta$ -Actina	SC-69789	1:1000	Santa Cruz

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos) e incubadas à temperatura ambiente, por uma hora, em solução de TBS-T.

Sequencialmente, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários específicos diluídos em solução de leite 1% com TBS-T, por uma hora, sob agitação, em temperatura ambiente.

Após nova lavagem com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos), as membranas foram submetidas à detecção de quimioluminescência, conforme instruções do kit ECL Plus (GE Healthcare Life Science, Fairfield – EUA), e visualizadas no equipamento ImageQuant 4000. Os valores obtidos foram normalizados pelos valores da Beta-Actina.

### 3.12. Análise Estatística

Os dados dos experimentos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os resultados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Múltipla Comparação Newman-Keuls. O teste Two-way ANOVA foi utilizado para gráficos de linhas para verificar a interação entre as variáveis independentes tempo e grupo seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Os dados dos experimentos de *western blotting* foram normalizados e plotados em um gráfico em que era expressa a razão entre anticorpos fosforilados pelos totais para cada grupo experimental. Os resultados obtidos representam a média de cinco experimentos realizados de forma independente. Os resultados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Múltipla Comparação Newman-Keuls.

A quantificação e a análise estatística dos resultados foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prisma*, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software. La Jolla, CA, USA).

Para avaliar a concordância entre os avaliadores em relação à classificação qualitativa das cicatrizes das feridas, foi utilizado o coeficiente Kappa ( $k$ ) (COHEN, 1960) que é um índice de concordância entre dois avaliadores, utilizando uma escala nominal. Como análise auxiliar, foram calculados os intervalos percentílicos *bootstrap*, com 95% de confiança para o coeficiente  $k$ . O método *bootstrap* (EFRON, TIBISHIRANI, 1993) é muito utilizado na realização de inferências quando não se conhece a distribuição de probabilidade da variável de interesse.

De acordo com Topf (1986) e Wynd (2002), o coeficiente Kappa é usualmente recomendado para avaliar medidas de concordância interavaliadores na área de saúde. O índice mostra-se especialmente útil, quando utilizado por avaliadores que observam objetos ou sujeitos em categorias nominais.

Para interpretação dos coeficientes Kappa, foi utilizada a proposta de Landis e Koch (1977), que se dá de acordo com a descrição da Quadro 4.

Quadro 4 - Escala de interpretação do coeficiente Kappa.

<b>Kappa</b>	<b>Nível de concordância</b>
< 0,00	Não existe Concordância
0,00 - 0,20	Concordância mínima
0,21 - 0,40	Concordância razoável
0,41 - 0,60	Concordância moderada
0,61 - 0,80	Concordância substancial
0,81 - 1,00	Concordância perfeita

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

O software utilizado nas análises foi o R (versão 3.4.3).

## 4. RESULTADOS

A utilização das coberturas foi tolerada por todos os animais do estudo. Não houve exclusão de animais pela presença de sinais de infecção durante o processo de desenvolvimento da ferida. Entretanto, 13 camundongos dos 16 animais do segmento de 14 dias, pertencentes aos grupos FT e HD, apresentaram dermatite irritativa relacionada ao uso de adesivos médicos. Os animais desses grupos, dos segmentos 3 e 6 dias, não apresentaram essa alteração.

### 4.1. Influência da oclusão sobre o perfil temporal de fechamento de feridas cutâneas excisionais em camundongos

No terceiro dia após a confecção da lesão, houve aumento estatisticamente significativo na porcentagem de fechamento de feridas dos animais do grupo FT e HD comparados ao grupo SO ( $p < 0,001$ ). A diferença se manteve entre os grupos FT e HD ( $p < 0,001$ ).

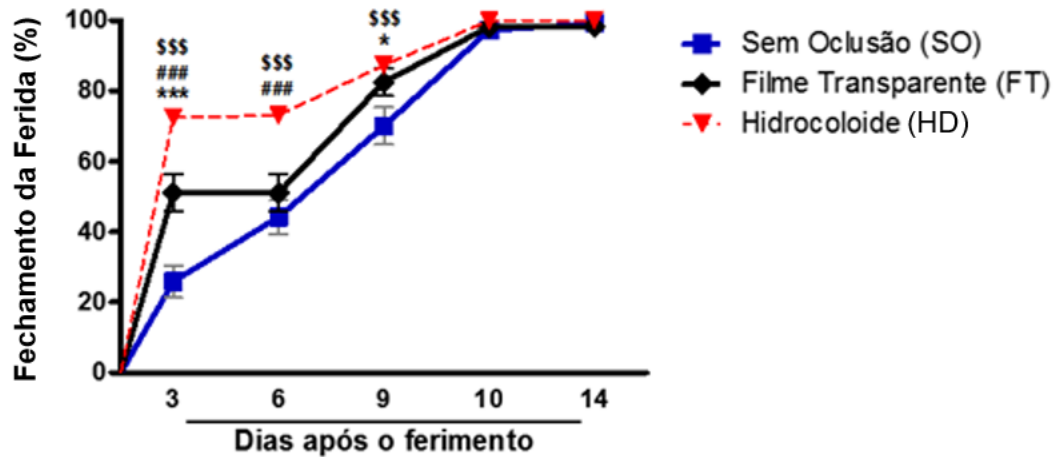
No sexto dia de acompanhamento, os animais dos grupos SO e FT apresentaram feridas de tamanho semelhante. No entanto, no mesmo período, ao comparar o grupo HD com os demais observou-se diferença significativa da taxa de fechamento da ferida ( $p < 0,001$ ) (Figura 10).

Avaliando o nono dia, ao contrapor a porcentagem da redução da área lesada, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos SO e FT, bem como FT e HD. Nesse segmento, revela-se um aumento significativo na porcentagem de fechamento de feridas do grupo HD, quando comparado ao grupo SO ( $p < 0,05$ ). Após esse período, houve equivalência entre os grupos quanto à cicatrização das feridas até o último dia de avaliação experimental (Dia 14 - Figura 10).

Os resultados macroscópicos apresentados demonstram que o fechamento de feridas cutâneas excisionais em camundongos é acelerado nos animais cuja ferida é ocluída, tanto com hidrocolóide quanto com filme transparente de poliuretano, sobretudo na avaliação realizada no terceiro dia. Essa tendência também permanece nos dias seis e nove nos animais com oclusão por hidrocolóide.

Figura 10 - Influência da oclusão sobre o perfil temporal de fechamento de feridas cutâneas excisionais em camundongos.

**A**



**B**

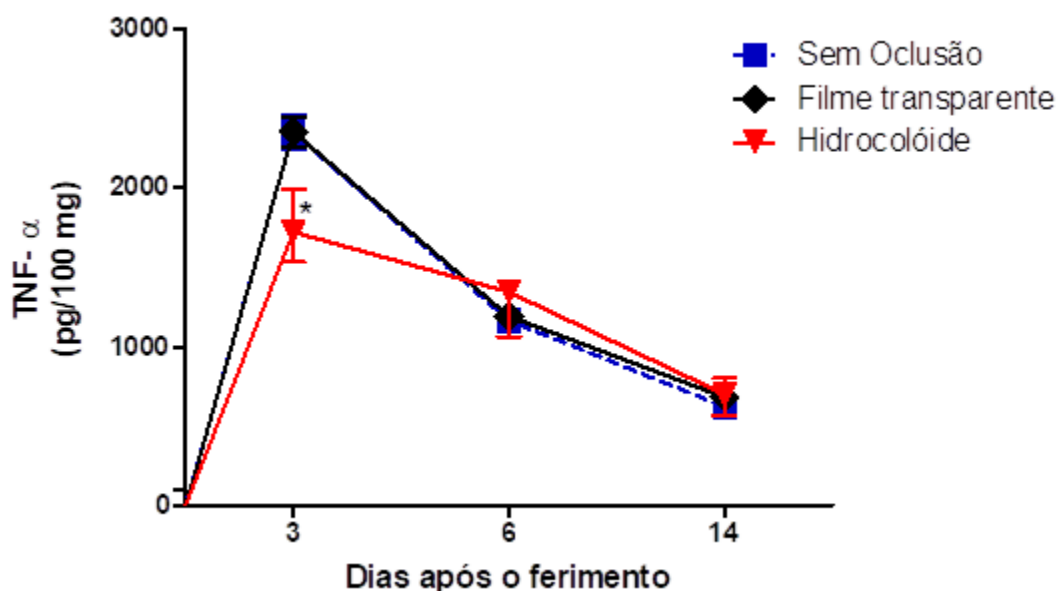


Legenda: (A) Cinética de fechamento de feridas nos animais dos grupos SO, FT, HD. Os resultados da taxa de fechamento da ferida foram expressos em porcentagem de fechamento relativo ao tamanho original da ferida. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.,  $n=7-8$  camundongos por cada grupo e tempo avaliado. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ . (B) Fotos representativas da evolução do fechamento das feridas cutâneas excisionais nos animais pertencentes aos grupos SO, FT, HD. Elaborado pela autora (2017).

#### 4.2. Influência da oclusão sobre a produção do mediador inflamatório TNF- $\alpha$ em feridas cutâneas excisionais em camundongos.

O efeito da oclusão sobre a produção do mediador inflamatório TNF- $\alpha$  resultou na diminuição nos níveis da citocina nas feridas do grupo que utilizou hidrocolóide. Essa diminuição foi evidente no terceiro dia quando comparado aos grupos SO e FT ( $p < 0,001$ ). Nos demais dias, 6 e 14, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 11).

Figura 11 - Influência da oclusão sobre a produção do mediador inflamatório TNF- $\alpha$  em feridas cutâneas excisionais em camundongos no período de 3 a 14 dias.



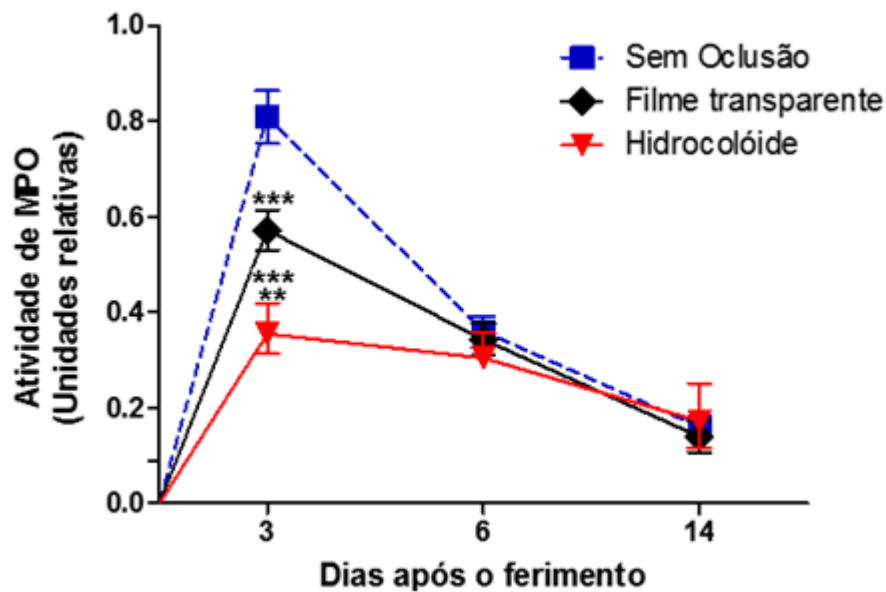
Legenda: A concentração de TNF- $\alpha$  mostrou-se significativamente reduzida no terceiro dia, no grupo que utilizou hidrocolóide (em vermelho) em comparação aos grupos SO (em azul) e FT (em preto) (\* $p < 0,001$ ). Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 7-8 animais por grupo. Elaborado pela autora (2017).

#### 4.3. Influência da oclusão sobre o perfil de leucócitos em feridas cutâneas excisionais em camundongos

O perfil de leucócitos foi alterado quando a oclusão das feridas foi realizada com hidrocolóide. A presença de oclusão com hidrocolóide diminuiu, significativamente, o acúmulo de neutrófilos no terceiro dia, quando comparado aos grupos FT e SO ( $p < 0,001$ ). Do mesmo modo, ao comparar os grupos SO e FT, a oclusão com filme transparente de poliuretano reduziu, significativamente, o conteúdo

de neutrófilos avaliados por meio de MPO ( $***p < 0,001$ ). Ao comparar a oclusão com HD e FT, o primeiro diminuiu significativamente o infiltrado de neutrófilos ( $**p < 0,01$ ). Nos dias 6 e 14 não houve diferença significativa nas avaliações entre os grupos (Figura 12).

Figura 12 - Influência da oclusão sobre a acúmulo de neutrófilos em feridas cutâneas excisionais em camundongos.

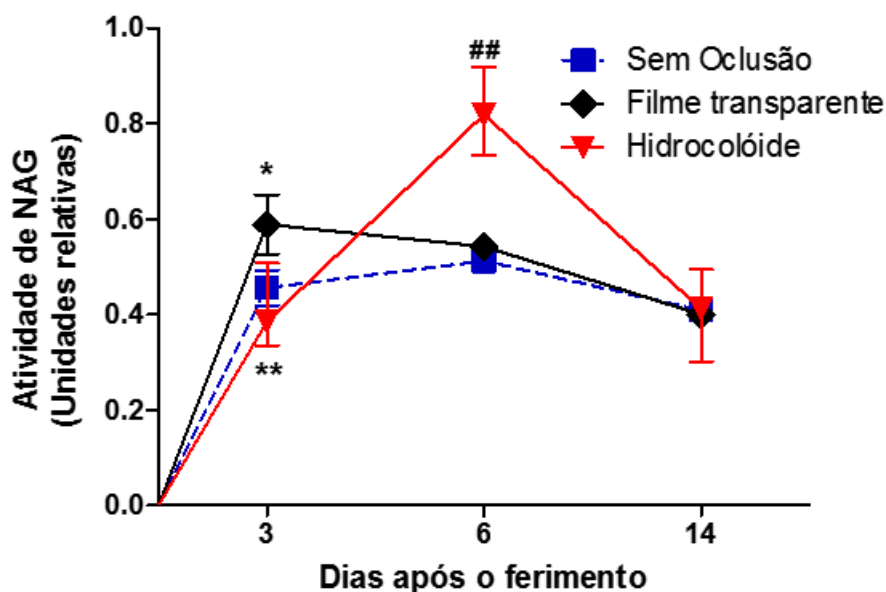


Legenda: A influência da oclusão sobre o acúmulo de neutrófilos em feridas cutâneas apresentou redução estatisticamente significativa no terceiro dia,  $***p < 0,001$  quando comparado aos grupos FT e SO,  $***p < 0,001$  ao comparar os grupos SO e HD e  $**p < 0,01$  ao comparar FT e HD. HD (em vermelho) SO (em azul) e FT (em preto). Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 7-8 animais por grupo. Elaborado pela autora (2017).

A quantidade de macrófagos apresentou níveis significativamente mais altos ao terceiro dia no grupo FT, quando comparado a SO ( $*p < 0,05$ ). Ainda no mesmo segmento, o grupo HD evidenciou níveis reduzidos de NAG em analogia ao grupo FT ( $***p < 0,001$ ). O dia 6 foi marcado por dosagens mais altas de macrófagos no grupo ocluído com hidrocolóide, contrastando com os grupos de feridas sem oclusão ou ocluídas com filme transparente de poliuretano ( $***p < 0,001$ ). (Fig 13).



Figura 13 - Influência da oclusão sobre a acúmulo de macrófagos em feridas cutâneas excisionais em camundongos.

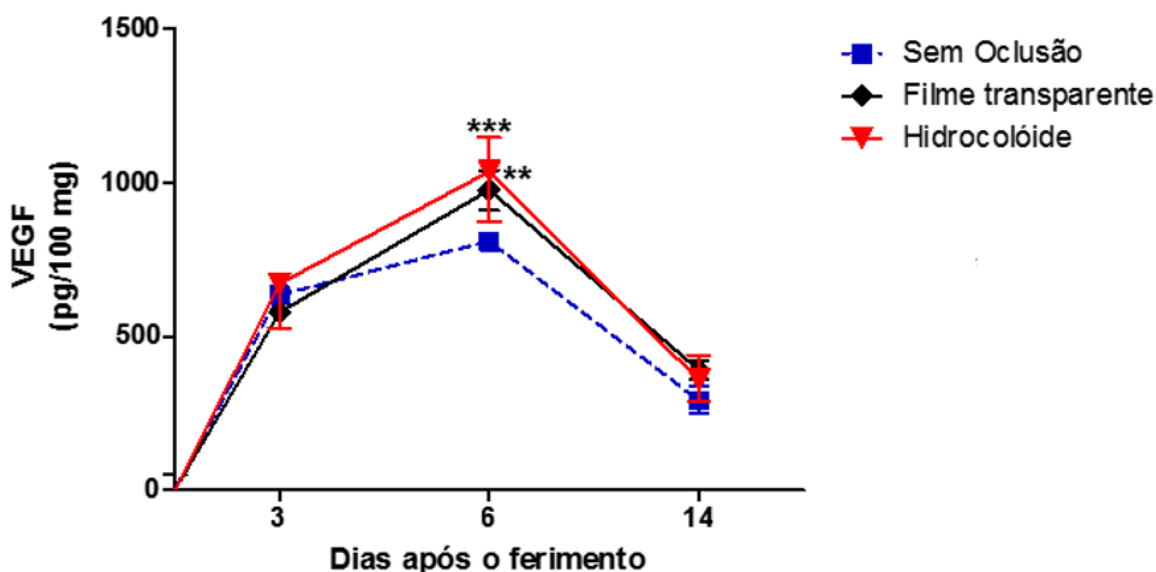


**Legenda:** A influência da oclusão sobre o acúmulo de macrófagos em feridas cutâneas apresentou aumento estatisticamente significativo, ao terceiro dia, no grupo FT (em preto), quando comparado a SO (em azul), \* $p < 0,05$ . Ainda no terceiro dia o grupo HD (em vermelho) apresentou níveis reduzidos de NAG em comparação ao grupo FT (em preto) \*\* $p < 0,001$ . No sexto dia houve aumento significativo de NAG no grupo ocluído com HD, em comparação com os grupos SO e FT # $p < 0,001$ . Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 7-8 animais por grupo. Elaborado pela autora (2017).

#### 4.4. Influência da oclusão sobre a angiogênese em feridas cutâneas excisionais em camundongos

Os níveis de VEGF apresentaram-se significativamente aumentados no sexto dia nos animais cuja ferida estava ocluída com filme transparente de poliuretano (\*\* $p < 0,01$ ) e hidrocolóide (\*\* $p < 0,001$ ), quando comparados ao grupo sem oclusão (Figura. 14).

Figura 14 - Influência da oclusão sobre VEGF em feridas cutâneas excisionais em camundongos.

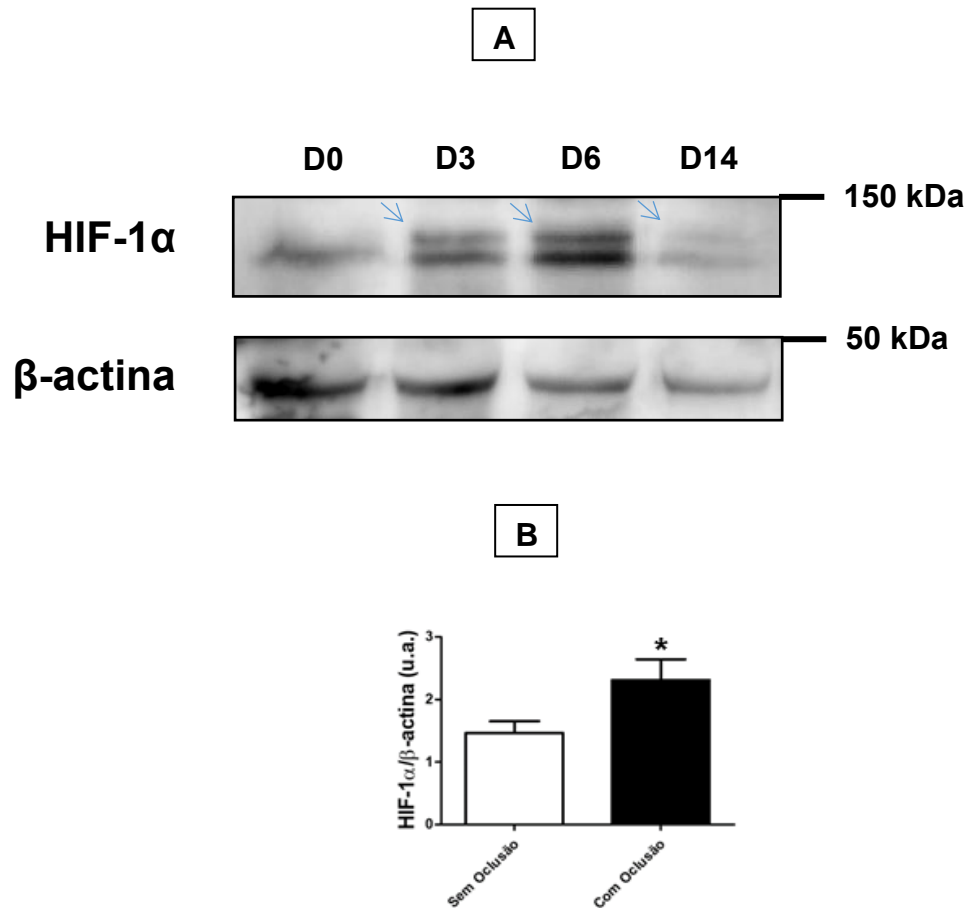


Legenda: Influência da oclusão sobre VEGF em feridas cutâneas apresentou aumento estatisticamente significativo no sexto dia, no grupo FT (em preto)  $p < 0,01$  e HD (em vermelho)  $*p < 0,001$  em comparação ao grupo SO (em azul). Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 7-8 animais por grupo. Elaborado pela autora (2017).

#### 4.5. Influência da oclusão sobre a expressão proteica de HIF-1 $\alpha$ em feridas cutâneas excisionais em camundongos

A fim de confirmar, bioquimicamente, a relação entre o mecanismo de oclusão no leito da ferida, independente do material e sua interferência na expressão proteica de HIF-1 $\alpha$ , foram realizadas extrações proteicas de tecidos da pele, tanto dos animais submetidos a oclusão (hidrocolóide e filme transparente de poliuretano) quanto aqueles sem oclusão, nos dias D0, D3, D6 e D14. As alterações ocorridas estão expressadas na Figura 15.

Figura 15 - Níveis de expressão de HIF-1 $\alpha$  em feridas nas condições com oclusão e sem oclusão.

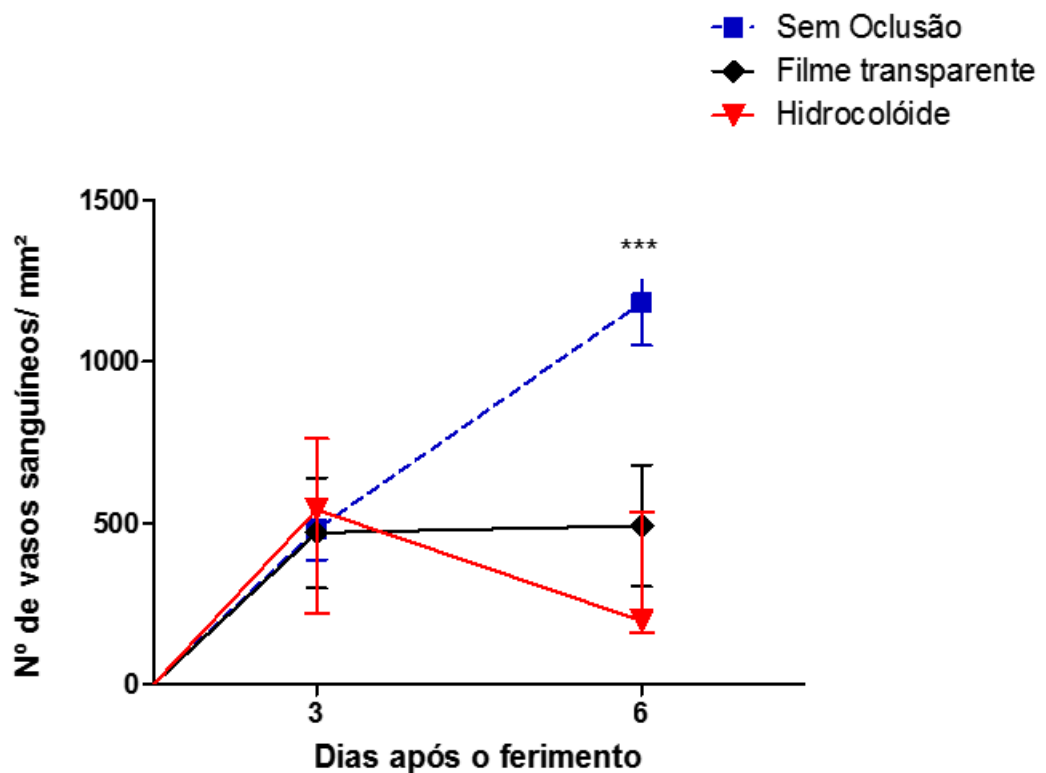


Legenda: A imagem (A) representa corrida representativa de gel para HIF-1 $\alpha$  nas condições com oclusão e sem oclusão. As setas indicam as bandas proteicas esperadas. O gráfico (B) quantifica as respostas obtidas em (A) em função da razão do HIF-1 $\alpha$  pelo controle  $\beta$ -actina (controle). (B) Dados representativos de cinco experimentos independentes. As barras representam média + E.P.M. (\*  $p < 0.05$ ). Elaborado pela autora (2017).

#### 4.6. Influência da oclusão sobre a contagem de capilares

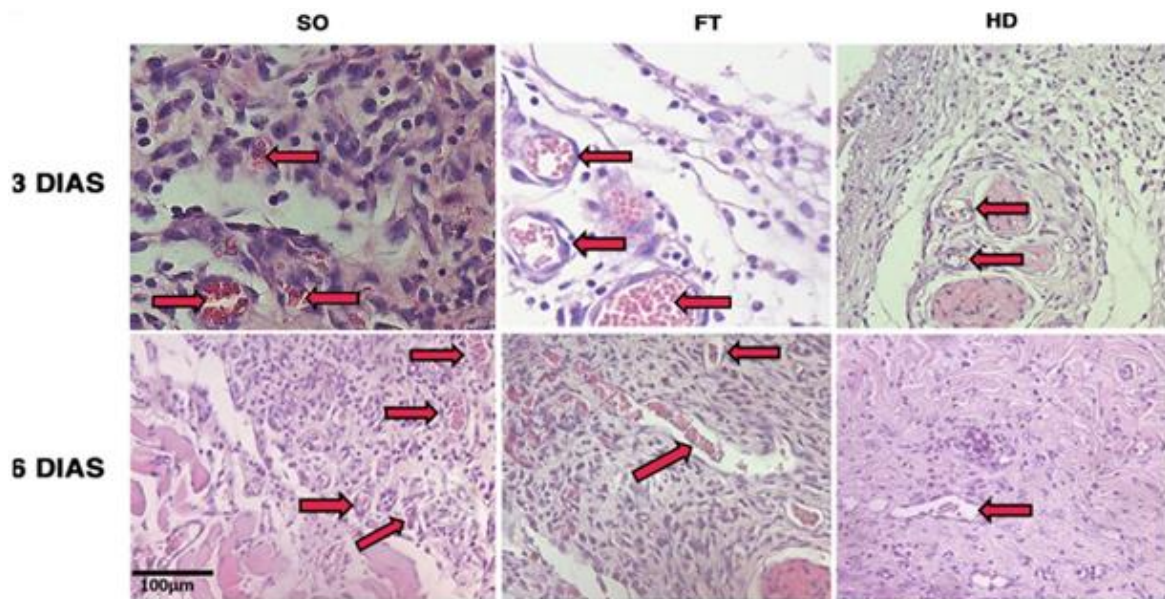
Em relação à contagem de capilares no terceiro dia, não houve diferença significativa entre as feridas com ou sem oclusão. No entanto, o grupo SO apresentou, significativamente, mais vasos quando comparados ao grupo com filme transparente de poliuretano ( $p < 0,001$ ) e hidrocolóide ( $p < 0,001$ ) (Figura 16 e Figura 17).

Figura 16 - Influência da oclusão sobre a contagem de capilares nas feridas cutâneas excisionais em camundongos



Legenda: No sexto dia foi possível observar aumento do número de vasos sanguíneos / mm<sup>2</sup> nas feridas cutâneas do grupo SO (em azul), quando comparados aos grupos FT (em preto) ( $p < 0,001$ ) e HD (em vermelho) ( $p < 0,001$ ). Os valores representam as médias (e.p.m) dos grupos de 6-7 animais por grupo. Elaborado pela autora (2017).

Figura 17 - Imagem representativa da Influência da oclusão sobre a contagem de capilares nas feridas cutâneas excisionais em camundongos



Legenda: Angiogênese na região das feridas. Fotomicrografias representativas de seções coradas em H&E 3 e 6 dias após a confecção da ferida evidenciando os capilares (setas). A densidade dos capilares foi avaliada por contagem cega em seções de tecido corados em H&E e está representado como números de vasos por mm<sup>2</sup> de tecido de granulação. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m., n 6-7 camundongos por cada grupo e tempo avaliado. Elaborado pela autora (2017).

#### 4.7. A influência da oclusão sobre análise qualitativa do processo de reparo em cicatriz de feridas cutâneas excisionais em camundongos

O quadro 5 apresenta os resultados do Kappa para a classificação das feridas por grupo e geral. No quadro, observações fora da diagonal principal indicam discordância entre os avaliadores.

Quadro 5 - Análise de concordância para a classificação das cicatrizes das feridas

Grupo	A.1/ A.2	FTC	FPC	FNC	Kappa	I.C.-95% <sup>1</sup>	Valor-p
HD (n=8)	FTC	<b>2</b>	1	0	0,53	[0,00; 1,00]	0,048
	FPC	0	<b>4</b>	0			
	FNC	0	1	<b>0</b>			
FT (n=8)	FTC	<b>5</b>	2	0	-0,20	[-0,50; 0,00]	0,537
	FPC	1	<b>0</b>	0			
	FNC	0	0	<b>0</b>			
SO (n=8)	FTC	<b>3</b>	0	0	0,75	[0,18; 1,00]	0,029
	FPC	1	<b>4</b>	0			
	FNC	0	0	<b>0</b>			
Geral (n=24)	FTC	<b>10</b>	3	0	0,52	[0,19; 0,83]	0,006
	FPC	2	<b>8</b>	0			
	FNC	0	1	<b>0</b>			

Legenda: A.1 = Avaliador 1. A.2 = Avaliador 2. FTC= Feridas Totalmente Cicatrizadas. FPC= Ferida Parcialmente Cicatrizada. FNC = Ferida Não Cicatrizada. <sup>1</sup> Intervalo de Confiança *Bootstrap*. Elaborado pela autora (2017).

Os resultados permitiram identificar quatro fatos: no grupo HD, os avaliadores discordaram na classificação de duas feridas. Houve concordância moderada ( $k = 0,53 [0,00; 1,00]$ ) e significativa (valor-p=0,048) entre os avaliadores. Já no grupo FT, os avaliadores discordaram na classificação de três feridas. De acordo com o Kappa, ( $k=-0,20 [-0,50; 0,00]$ ) não houve concordância significativa entre os avaliadores (valor-p=0,537). Enquanto isso, ao avaliar o grupo SO, os avaliadores discordaram na classificação de uma ferida. Houve concordância substancial ( $k=0,75 [0,18; 1,00]$ ) e significativa (valor-p=0,29) entre os avaliadores. Por fim, de modo geral, os avaliadores discordaram na classificação de 6 feridas. Houve concordância moderada ( $k=0,52 [0,19; 0,83]$ ) e significativa entre os avaliadores (valor-p=0,006).

## 5. DISCUSSÃO

O cuidado de Enfermagem perpassa por uma construção de atitudes que visam promover, manter ou recuperar a dignidade humana. Constitui-se, autenticamente, em agir mediante uma necessidade de cuidado e colaborar para o bem-estar do outro e para o desenvolvimento de sua plenitude integral. O cuidado assume a essência da profissão do enfermeiro, reflete-se no compromisso de pensar e gerar estratégias para propiciar a promoção da vida e a qualidade para vivê-la. (SANTOS, et al., 2010)

Ressalta-se que, os indivíduos envolvidos no cuidado, o enfermeiro e o paciente, constroem necessidades, continuamente, por meio de vivências e relações. Focando no processo de trabalho, torna-se possível determinar as facetas dessas necessidades, sejam políticas, sociais, culturais ou técnicas. Sendo assim, o profissional tende a assumir um paradigma de cuidado, cujo ponto de partida, para o cuidar, são as demandas apresentadas pelos pacientes. (OLIVEIRA, et al., 2014)

O cuidado, apesar de ser majoritariamente uma ação interativa, deve ser feito também em prol do sujeito cuidado, abarcando envolvimento e comprometimento. Sendo assim, o estudo em questão foi, a princípio, a tentativa de ser uma resposta ao paciente com ferida e um enfrentamento inerente ao crescimento profissional oriundo da prática e do lidar com o sofrimento dos pacientes.

Santos e colaboradores (2010) enfatizam o cuidado de Enfermagem como ações fundamentadas no conhecimento científico, experiência e pensamento crítico. Igualmente, essas características devem ser consideradas no âmbito do tratamento de feridas, a fim de que a assistência integral forneça resultados eficazes junto aos pacientes, por meio das melhores alternativas. E, para tanto, quando existem lacunas no conhecimento, torna-se uma opção transladar o problema da prática clínica para as ciências básicas, a fim de gerar conhecimento e, posteriormente, a partir dela, na prática clínica, criar e utilizar mecanismos que aumentam a taxa de fechamento e, conseqüentemente, a qualidade de vida dos pacientes.

Nos últimos anos, iniciativas para o desenvolvimento de pesquisas na área da Enfermagem foram exploradas e ampliadas em âmbito mundial. Visando a melhora dos processos de cuidado, com foco no paciente, na efetividade das práticas de saúde, na segurança dos métodos e nas técnicas empregadas no cuidado, as pesquisas clínicas, baseadas em evidências e sistemáticas, promovem inegável contribuição para a atualização da área.

A pesquisa translacional surgiu nesse contexto, aproximando os pesquisadores da Enfermagem. O termo, como conhecido atualmente, é advindo da publicação editorial do *Journal of the American Medical Association* (JAMA), de 2002, quando foi estabelecida como essência para a saúde humana, transitando pelos novos conhecimentos, mecanismos e técnicas das pesquisas mais atuais. Em ano posterior, o *National Institute of Nursing Research/EUA* criou um consórcio de instituições de saúde e centros de pesquisa focados em pesquisa translacionais. A partir da criação desse consórcio, foi possível financiar pesquisas translacionais naquele país, objetivando acelerar as investigações e resolver problemas reais dos pacientes e aumentar a qualificação dos profissionais da área, tanto dos clínicos, quanto dos pesquisadores. (PADILHA, 2011; LOPES-JÚNIOR, 2015)

A pesquisa translacional pode ser contextualizada no processo de transformação das descobertas provenientes das pesquisas de bancada de laboratórios e de estudos epidemiológicos. A ideia desta linha de pesquisa é unir o conhecimento da prática laboratorial, envolvendo condições de laboratório, seja *in vitro* ou modelo animal, com a identificação de novos métodos e ferramentas científicas que melhor atendam a uma demanda e estabeleçam uma ligação entre a prática clínica e a pesquisa.

O resultado dessa ligação contribui para a formação de novas relações e propicia uma melhor investigação e percepção de fenômenos ocorridos durante a prática dos cuidados diários dos profissionais da Enfermagem. Apesar dos enfermeiros brasileiros ainda não adotarem esta linha de pesquisa como central, têm envidado esforços para o seu desenvolvimento. (PADILHA, 2011; LOPES-JÚNIOR, 2015)

O enfermeiro está envolvido no cuidado aos pacientes com feridas em todos os níveis de atenção à saúde. É o profissional responsável pelo manejo de intervenções que envolvem identificação, monitoramento, segurança do paciente e implantação de medidas necessárias à aceleração do processo cicatricial. Portanto, torna-se relevante a discussão sobre lacunas de conhecimento nesta área do cuidado. (SANTOS, et al., 2017)

As controvérsias existentes sobre o processo de cuidar de feridas podem influenciar, negativamente, a tomada de decisão do enfermeiro em relação à escolha da terapia tópica adequada. A utilização de coberturas oclusivas ou a troca diária de curativos convencionais com pomadas é, ainda na prática, um grande hiato. Dessa



forma, o presente estudo teve o intuito de avaliar o impacto da oclusão causada por coberturas sobre a angiogênese e cicatrização de feridas excisionais em camundongos C57BL/6. Optou-se em estudar a oclusão, uma vez que, na prática clínica, esta proporciona um ambiente adequado para a cicatrização de feridas. (SIBBALD et al.,2014)

A oclusão é definida por cobrir a pele ou ferida, direta ou indiretamente, com filmes, coberturas ou outros dispositivos, tais como fitas. A oclusão das feridas pode favorecer a cicatrização pela manutenção do ambiente úmido, prevenção do ressecamento, diminuição da dor, aumento das taxas de cicatrização e estimulação dos fatores de crescimento e neoformação de vasos. (ZHAI; MAIBACH, 2007, OLIVEIRA, et al.,2016)

As primeiras coberturas oclusivas ou semi-oclusivas foram os filmes transparentes de poliuretano, introduzidos na década de 60, primariamente para o tratamento de feridas excisionais em modelos animais e, posteriormente, direcionados para o tratamento de feridas em humanos. Estes são produtos de fina camada, elásticos, normalmente compostos de poliuretano ou outros tipos de copolímeros e polímeros sintéticos e, normalmente, são impermeáveis aos líquidos e bactérias, mas permeáveis ao vapor úmido e gases atmosféricos. Tratam-se de filmes não absorventes e que podem criar acúmulo de exsudato entre a pele e o curativo. Esse fato em si, no entanto, não prejudica a cicatrização, mas o seu excesso pode romper a barreira adesiva do curativo, causando o escoamento do exsudato. (HELFMAN, et al., 1994)

Outra cobertura oclusiva, amplamente conhecida, é o hidrocolóide, considerado uma terapia tópica eficaz para promover a cicatrização de feridas crônicas. Seus benefícios incluem a manutenção de um ambiente úmido, temperatura da lesão em torno de 37°C, hipóxia na superfície lesada, além de prevenir contaminações. Esses efeitos positivos, nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização, resultam do efeito migratório celular que, possivelmente, favorecem o aumento da epitelização. (SINGH, et al., 2004)

A contração da ferida é um parâmetro do processo de cicatrização que está altamente correlacionada com o processo de cicatrização. Schunck e colaboradores (2005) avaliaram o comportamento das coberturas oclusivas no tocante à redução da área lesada em camundongos. Dessa forma, os animais foram divididos em três grupos em relação à cobertura utilizada, sendo cobertura de hidrocolóide, de látex

(tipo luva) e sem oclusão. A troca dos materiais estudados ocorreu a cada dois dias durante os 14 dias de avaliação. Ressalta-se que, durante a primeira semana de tratamento, a contração das feridas excisionais foi significativamente reduzida quando utilizados materiais oclusivos. No entanto, a partir da segunda semana houve significativa redução da área lesada mediante o uso das coberturas. (SCHUNCK et al., 2005). Em contrapartida, o presente estudo constatou que, o fechamento das feridas foi acelerado utilizando-se hidrocolóide ou filme transparente de poliuretano, sobretudo no terceiro dia. A redução da área lesada manteve-se significativa mediante a oclusão com hidrocolóide nos dias 6 e 9.

Uma metanálise composta por 12 estudos clínicos, randomizados e controlados, com o total de 819 feridas de várias etiologias, teve o objetivo de verificar a efetividade do hidrocolóide em relação aos curativos não oclusivos convencionais (gaze). O desfecho principal do estudo foi a cicatrização total, sendo que a epitelização completa ocorreu em 51% das úlceras do grupo tratado com hidrocolóide e em 38% do grupo de curativos convencionais. Portanto, o hidrocolóide foi clinicamente superior na cicatrização das feridas. (SINGH, et al., 2004)

O fechamento total das feridas é um importante fator avaliado em estudos clínicos, uma vez que esse advento causa impactos positivos na qualidade de vida dos pacientes. No entanto, a cicatrização de feridas é um processo dinâmico e interativo envolvendo mediadores solúveis, células sanguíneas, matriz extracelular e células parenquimatosas. Compreender todo esse processo, à luz das coberturas oclusivas, poderá ajudar o enfermeiro da prática clínica a atingir o seu objetivo principal: uma lesão cicatrizada e um paciente reabilitado. (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015)

Estudos em camundongos foram utilizados para testar, individualmente, a contribuição da maioria das linhagens de células imunes, no processo de reparação de feridas. Há consenso de que os neutrófilos lidam diretamente com a morte de microrganismos invasores. Essas células possuem capacidade fagocitária, responsáveis pelo controle dos processos inflamatórios a partir da remoção das células mortas e patógenos. Os neutrófilos são rapidamente atraídos para a região da ferida, liberando enzimas proteolíticas, eliminando, assim, os restos bacterianos e necróticos. (XIAO et al.; 2017; WILLENBORG; EMING, 2014)

No presente estudo, a oclusão com hidrocolóide e filme transparente de poliuretano reduziu os níveis de neutrófilos no terceiro dia após a confecção da ferida.

Esses dados sugerem que, o reduzido infiltrado de neutrófilo, mediante oclusão, relaciona-se com o baixo potencial de contaminação por microrganismos nestas feridas. À medida em que os microrganismos invadem a ferida, de fato eles podem produzir metabólitos que são destrutivos aos tecidos e estimulam as células a migrarem para o local da ferida. Contudo, há possibilidade de que o menor contato das feridas com o ambiente propicia uma menor chance de presença de microrganismos invasores e, por consequência, atividade neutrofílica atenuada. (SIBBALD et al., 2014)

A avaliação de artigos publicados no período de 1961 a 1988, sobre curativos hidrocolóides e filme transparente de poliuretano, possibilitou identificar pesquisa sobre a taxa de infecção em feridas, sendo 2,6% naquelas tratadas com curativos oclusivos e 7,1% com curativos não oclusivos (HUTCHINSON et al., 1990). Esse fato corrobora a redução de contaminação no emprego de coberturas oclusivas.

Por sua vez, os macrófagos, um dos tipos celulares mais numerosos, desempenham suas funções tanto na fase inflamatória, participando da fagocitose de detritos e induzindo a proliferação de fibroblastos, quanto na fase tardia, atuando, principalmente, no remodelamento tecidual. Estes mostram-se fundamentais no processo de limpeza de neutrófilos apoptóticos e coordenam o fechamento precoce da ferida. Não havendo a presença de macrófagos, a limpeza das feridas mostra acumulação de neutrófilos, aumentando o nível de citocinas pró-inflamatórias. Algumas evidências sugerem que os macrófagos regulam o fechamento da ferida, a formação de cicatrizes e vislumbram que a ativação adequada dos macrófagos se mostra fundamental no reparo de feridas. (HESKETH, 2017; ALVES FILHO, et al., 2018)

Nesta pesquisa, ao contrário do reduzido infiltrado de neutrófilos, os achados sugerem que a oclusão com hidrocolóide resulta em um maior nível de macrófagos, evidenciando um pico no segmento D6. Portanto, pode-se conjecturar que os macrófagos, evidenciados nesta pesquisa, são ativados pela via alternativa. Os macrófagos M2, nesta fase, atuam como fornecedores de fatores de crescimento, realizam fagocitose, induzem a proliferação de fibroblastos, e atuam, principalmente, no mecanismo de remodelamento tecidual. Fato este que pode evidenciar a presença, estatisticamente significativa, de macrófagos, mediante oclusão com hidrocolóide, bem como o fechamento acelerado das feridas cutâneas em camundongos cuja ferida é ocluída com hidrocolóide. (WILLENBORG; EMING, 2014)

As citocinas são fundamentais em todas as etapas do processo de cicatrização. O TNF- $\alpha$ , uma potente citocina pró-inflamatória, destaca-se por amplificar a quimiotaxia dos neutrófilos, estimular macrófagos e os fatores de crescimento necessários na angiogênese (MEDEIROS; CUNHA 2017). Os dados do estudo atual sugerem que a intervenção com hidrocolóide inibe, parcialmente, a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , uma vez que sua concentração se mostrou significativamente reduzida no grupo que utilizou a cobertura, no terceiro dia após o ferimento.

A expressão elevada do TNF- $\alpha$  está associada à recuperação tardia da ferida e apresenta níveis reduzidos em feridas com processo de reparação tecidual acelerado (SINGLA, R. et al., 2017). KLOETERS e colaboradores (2008) elucidaram as mudanças histológicas e alguns sinais moleculares envolvidos na semi-oclusão de feridas em ratos. As feridas que receberam tratamento semi-oclusas demonstraram níveis de citocinas pró-inflamatórias interleucina 1-alfa - IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  diminuíram, significativamente, após o terceiro dia pós-cirúrgico, se comparadas feridas não oclusas.

Em ratos diabéticos, o aumento das células apoptóticas leva ao aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , no leito do tecido e no fluido da ferida, concomitantemente com a redução da citocina anti-inflamatória IL-10, que, normalmente, agiria para diminuir a resposta inflamatória. Além disso, os níveis de TNF- $\alpha$  mostram-se aumentados em feridas crônicas, e esse aumento apresenta uma relação com o aumento da expressão das metaloproteinases e estas degradam, excessivamente, a matriz extracelular local. (EMING et al., 2014; HESKETH, 2017)

Fatores de crescimento foram encontrados em fluidos de feridas ocluídas por coberturas e demonstraram importante ligação com a estimulação de células endoteliais (VARGHESE et al., 1986; SCHUNCK, et al., 2005). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é liberado por uma variedade de células, dentre elas os macrófagos, e estimula componentes múltiplos da cascata angiogênica. Este fator é regulado durante os primeiros dias de cura, quando o crescimento capilar é máximo. Os dados experimentais suportam a hipótese de que o VEGF estimula a epitelização e a deposição de colágeno em uma ferida, ou seja, estimula a cicatrização de feridas, não apenas por meio da angiogênese, mas, provavelmente, promove deposição de colágeno e epitelização (WANG et al., 2016). Neste estudo, os níveis de VEGF apresentavam-se significativamente aumentados no dia 6, naqueles animais cuja ferida estava ocluída com filme transparente de poliuretano, ou hidrocolóide, em

comparação ao grupo sem oclusão. Esse fato pode evidenciar o benefício deste fator no reparo das feridas, uma vez que, a privação de VEGF, por fatores proteolíticos, tem sido considerada como uma causa subjacente da dificuldade de cicatrização. (DE MASI, et al., 2016)

Na década de 1980, resultados de pesquisa mostravam que curativos sintéticos criam condições de hipóxia nos quais a cura da ferida ocorra, seja o curativo sintético permeável ou impermeável ao oxigênio (VARGHESE et al., 1986). A fim de lograr um ambiente adequado para a cicatrização, uma cobertura deve ser capaz de reduzir a tensão de oxigênio na superfície lesada (PINHEIRO et al., 2013). É sabido que os níveis de HIF-1 $\alpha$  aumentam, exponencialmente, à medida que a concentração de oxigênio diminui. A transcrição do HIF-1 $\alpha$ , por sua vez, contribui para o processo normal do reparo da ferida, por meio da liberação local de fatores de crescimento e estimuladores da formação da matriz. (ASADI et al., 2017).

Em condições de hipóxia, o HIF-1 $\alpha$  liga-se a subunidade HIF-1 $\beta$  para formar a transcrição ativa do HIF-1. Por sua vez, este é translocado para o núcleo, em que se ligam elementos reguladores da hipóxia e, juntamente com a região promotora dos genes indutores do HIF, promove a expressão de genes alvo do HIF, tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Esse VEGF atua estimulando a diferenciação de angioblastos, bem como a formação de novos capilares sanguíneos (HONG, et al., 2014). No presente estudo, evidenciou-se níveis aumentados de expressão de HIF-1 $\alpha$  em feridas submetidas à oclusão em relação às não ocluídas, corroborando o papel benéfico do HIF-1 $\alpha$  no processo de reparação de feridas.

Evidências científicas demonstram que a não ativação do HIF mantém a interrupção do fluxo sanguíneo, levando a isquemia, hipóxia e, conseqüentemente, a necrose do tecido. Portanto, a deficiência do HIF-1 $\alpha$  está associada às feridas crônicas, caracterizada pela inflamação persistente, ausência da fase proliferativa e aumento da atividade proteolítica, evitando a deposição de componentes da matriz. Os níveis de HIF-1 $\alpha$  mostraram-se reduzidos em modelos animais diabéticos, quando comparados com animais não diabéticos (CATRINA, ZHENG, 2016). Essa alteração pode ser uma das justificativas para que pacientes diabéticos apresentem demora na cicatrização das feridas

No presente estudo, apesar da oclusão ter apresentado significância em relação ao VEGF e HIF1 $\alpha$ , não repercutiu em neoformação de vasos. Portanto, neovascularização similar no grupo FT e SO provavelmente não implicou em

uma resposta compensatória a um fornecimento insuficiente de oxigênio ambiente. Todavia, em relação à redução da área lesada, as feridas ocluídas tiveram um resultado positivos.

Sano e colaboradores (2012) introduziram um novo modelo e elucidaram a influência do oxigênio do ambiente na cicatrização de feridas. Para tanto, as feridas foram ocluídas com materiais impermeáveis e permeáveis ao oxigênio. O grupo com curativo permeável manteve concentrações de oxigênio equivalente ao da atmosfera (150mmHg), enquanto o grupo do curativo impermeável mostrou tensão extremamente baixa de oxigênio, de forma que o grupo permeável e impermeável foram definidos como grupo normóxia e grupo hipóxia, respectivamente. O tamanho da ferida diminuiu significativamente no grupo normóxia, se comparado com o grupo hipóxia no dia 5 e 7. A espessura da granulação e a densidade vascular foram menores no grupo normóxia se comparado ao grupo hipóxia. Percebeu-se que esse modelo controlou com sucesso a concentração local de oxigênio no entorno da feridas. As feridas hipóxicas mostraram angiogênese provavelmente desregulada, mas com menor quantidade de tecido de granulação e fechamento retardado da ferida.

Resultados distintos foram obtidos em estudo realizado com objetivo de descrever os efeitos da proteína 35k sobre o processo de cicatrização. Para tanto, no grupo tratamento foram confeccionadas feridas e aplicada proteína 35k, isolada, e filme transparente de poliuretano, enquanto no grupo controle utilizou-se PBS (solução tampão). Houve aumento da taxa de cicatrização na fase média do reparo tecidual no grupo controle. Condizente aos níveis de VEGF, não foi notado aumento desse fator, mostrando que os níveis deste mediador não estariam envolvidos na aceleração da cura de feridas e no processo de angiogênese. Apesar de permanecer estável, o aumento do número de novos vasos foi observado, mesmo não havendo mudanças no nível de VEGF e HIF-1 $\alpha$ . O aumento da angiogênese não correu pelas vias de VEGF e HIF-1 $\alpha$  (RIDIANDRES et al., 2017). Similarmente, o presente estudo mostrou angiogênese com correlação entre os níveis de VEGF e HIF-1 $\alpha$  e a neovascularização. Entretanto, o HIF-1 $\alpha$  é importante para a resolução da inflamação, tendo destaque o segmento D6, interferindo na resolução da inflamação.

Os resultados do teste da eficiência de três curativos oclusivos: membrana de silicone "NanoClik" (membrana de nanogel), membrana colágena com silicone e apenas membrana de silicone, no fechamento de feridas em camundongos, não

mostrou diferença significativa entre os grupos, na relação com a formação de novos vasos, seja no 7º ou 14º dia do experimento. Tal constatação permitiu inferir que não houve correlação entre o uso de curativos oclusivos e o posterior aumento da angiogênese. Não obstante, todos os grupos apresentaram eficiência no processo de redução da área lesada e reepitelização, independentemente da relação com a revascularização do local da ferida. (MAEDA et al., 2015)

Estudos que analisam a reparação de feridas em camundongos embrionários e fetais, além de pacientes humanos submetidos à cirurgia fetal, indicaram que, antes do início de uma resposta inflamatória da ferida, os tecidos imaturos são capazes de reparar sem cicatriz. A inflamação pode, portanto, ser uma causa de fibrose da ferida. (EMING et al., 2014)

Na pele humana, pode-se dividir as cicatrizes em dois tipos básicos, hipertróficas e queloides, sendo, normalmente, advindas de intervenção cirúrgica, traumatismos ou feridas de várias etiologias. As cicatrizes notáveis são um desafio para a área de cuidados de pele e feridas, necessitando de constantes estratégias, uma vez que sua ocorrência piora a qualidade de vida dos pacientes. Assim, a saúde do paciente e a profundidade acometida pode influenciar na restauração da pele, perpassando pela barreira epidérmica mais eficiente e a recomposição da camada dérmica menos eficiente, instigando a formação de cicatrizes. (KRUSE et al., 2015; MARTIN; NUNAN, 2015)

No presente estudo, optou-se por realizar uma avaliação macroscópica da cicatrização, que demonstrou ser de crucial importância para o acompanhamento do reparo cutâneo. Na prática atual, este é o método mais usual, de baixo custo de execução e gerador de excelentes resultados, tratando-se do comportamento dos eventos biológicos durante o procedimento de reparação tanto do tecido conjuntivo quanto do epitelial. Além disso, em humanos não é justificada a retirada de tecidos cirurgicamente, apenas para propósito de acompanhamento da evolução de uma ferida ou processo de reparo na tentativa de controlar a eficácia do tratamento. (ALVES et al., 2011)

Sendo assim, dois avaliadores com experiência no tratamento de feridas em humanos avaliaram as fotos do segmento D14. Houve concordância entre a avaliação das cicatrizes, cuja oclusão ocorreu com hidrocolóide, e nos animais controle, ou seja, sem oclusão. Em ambos os casos, as classificações foram de feridas totalmente

cicatrizadas e de feridas parcialmente cicatrizadas. Logo, neste estudo, não houve diferenças estéticas qualitativas das cicatrizes das feridas, ocluídas ou não.

Em estudos realizados com humanos, a eficácia no uso de filme transparente de poliuretano e folha de silicone gel no tratamento de cicatrizes hipertróficas foi comprovada na redução dos sinais hipertróficos durante tratamento de 12 semanas, em comparação a outros dois produtos. No entanto, o filme transparente de poliuretano mostrou-se significativamente mais eficaz na redução dos sinais hipertróficos, redução da vermelhidão da pele, coloração da pele e na opinião dos pacientes sobre o antes e depois do tratamento. (WIGGER-ALBERT et al, 2009)

Em relação ao modelo animal, é observado que a formação de cicatrizes é reduzida em áreas mantidas úmidas, quando comparadas com feridas secas. O'shaughnessy e colaboradores (2009) investigaram em modelo animal de coelhos o papel da barreira epidérmica em relação às cicatrizes hipertróficas. A comparação entre a ferida ocluída, em relação ao controle, demonstrou que a oclusão apresenta menor celularidade e espessura epitelial, independente do agente oclusivo utilizado. Além disso, os autores também afirmam que a teoria da oclusão é baseada no restabelecimento da homeostase da barreira hidrofílica epidermal, ou seja, previne a perda da hidratação das camadas abaixo da epiderme, o que sugere uma cicatrização menos exuberante.

O microambiente da ferida é suscetível a diversos fatores de influência, tais como a cobertura, as células circundantes da ferida e a atmosfera que está em contato. Da mesma forma, fatores como umidade, teor de oxigênio, pH, carga microbiana e temperatura influenciam diretamente, cada qual à sua forma, no reparo da ferida. Ressalta-se a importância da avaliação e monitoramento deste microambiente, a fim de se escolher com propriedade qual deve ser o método de tratamento, objetivando-se otimizar o ambiente da ferida para que a cura ocorra de maneira dinâmica, eficiente, com a melhor qualidade possível, seguindo-se as diretrizes clínicas. (KRUSE et al., 2015)

O presente estudo disserta sobre algumas considerações viáveis, como, em um primeiro momento, de que maneira a oclusão, principalmente com hidrocolóide, traduz-se em um reparo tecidual benéfico. No entanto, o impacto positivo analisado em VEGF e HIF-1 $\alpha$  não necessariamente culminaram em uma neoformação de vasos. Desse ponto de vista, pode-se especular que o estímulo hipóxico para a angiogênese parece ser mais importante quando ocorre por meio de estímulos causados à rede de



vasos sanguíneos. Vale ressaltar que os camundongos do presente estudo são saudáveis, sendo assim, depreende-se que a cicatrização ocorre por meio do controle da inflamação, em detrimento da angiogênese. Portanto, mais estudos são necessários para melhor compreender a relação entre coberturas oclusivas, redução de oxigênio no leito da ferida e angiogênese.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considera-se que a resposta inflamatória é um processo imunológico fundamental para o reparo de feridas quando ocorre de forma controlada. Este trabalho sugere que a oclusão modula a resposta inflamatória. Esses achados são evidenciados por meio da inibição parcial da citocina pró-inflamatória TNF-  $\alpha$ , da redução de acúmulo de neutrófilos e níveis mais altos de macrófagos.

A angiogênese, molecularmente, foi associada com as coberturas oclusivas pelos níveis elevados de VEGF e HIF1- $\alpha$ . No entanto, não houve diferença entre a oclusão com filme e a não oclusão de feridas no que relaciona-se à contagem de capilares. A oclusão com hidrocolóide evidenciou quantitativo atenuado de capilares em camundongos saudáveis, evidenciando-se como uma proposta importante para próximos estudos. Por fim, sugere-se replicar o presente estudo no modelo animal com patologia crônica, como *Diabetes mellitus*, pois especula-se que, nesta situação, a cicatrização é prejudicada, sendo necessária a neovascularização.

## REFERÊNCIAS

ALVES-FILHO, João Alberto Garcia; CABRERA, Renan Rocha; DO AMARAL, Valéria. Análise da atividade cicatrizante do complexo homeopático m8 em feridas induzidas em ratos. **Revista Uningá**, v. 48, n. 1, 2018.

ALVES, Helio; MACHADO, Michele Teixeira; NORONHA, Anaci Maria Nogueira Wood. Análise Qualitativa do Processo de Reparo em Cicatriz Cirúrgica de Ratos Tratados com Extrato de Musa Sapientum, Aloe Vera e Colagenase/Qualitative Analysis of the Repair Process in Surgical Scar in Treated Rats with Musa Sapientum Extract, Aloe Vera an. **Revista Ciências em Saúde**, v. 1, n. 2, p. 8-18, 2011.

AMORIM, Gilmara Lopes. **Ensaio pré-clínico de uma nova cobertura no tratamento de lesão cutânea**. Monografia (Monografia em Enfermagem) – UFMG. Belo Horizonte, p. 45. 2016.

ASADI, Mohammad Reza et al. Angiogenic effects of low-intensity cathodal direct current on ischemic diabetic foot ulcers: A randomized controlled trial. **Diabetes research and clinical practice**, v. 127, p. 147-155, 2017.

BALBINO C.A. et al. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazil J. of Pharmaceutic Science**. 41(1):27-51.2005.

BANDEIRA, Andrea Gonçalves et al. A utilização de um referencial metodológico na implementação de evidências como parte da investigação em enfermagem. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 26, n. 4, 2017.

BARRIENTOS, Stephan et al. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 5, p. 569-578, 2014.

BODNAR, Richard J. Chemokine regulation of angiogenesis during wound healing. **Advances in wound care**, v. 4, n. 11, p. 641-650, 2015.

BORGES, Eline Lima et al. Feridas: como tratar. 2 o ed. **Belo Horizonte (BH): Coopmed**, 2008.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADLEY M. et al. Systematic reviews of wound care management: (2) dressings and topical agents used in the healing of chronic wounds. **Health Technol Assess** 1999;3(17):1-35.

CAMPOS, Antonio Carlos Ligoeki; BORGES-BRANCO, Alessandra; GROTH, Anne Karoline. Cicatrização de feridas. **ABCD, arq. bras. cir. dig.**, São Paulo , v. 20, n. 1, p. 51-58, Mar. 2007 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-)

67202007000100010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 Jan. 2018.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-67202007000100010>.

CANESSO, M. C. C. et al. Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 10, p. 5171–5180, 2014.

CASSINI-VIEIRA, Puebla et al. Estimation of wound tissue neutrophil and macrophage accumulation by measuring myeloperoxidase (MPO) and N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) activities. **The Journal of Immunology**, 2014.

CATRINA, S.; ZHENG, X. Disturbed hypoxic responses as a pathogenic mechanism of diabetic foot ulcers. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, 32, n. S1, 2016. 179-185.

CHAYAMITI, E.M.P.C, et al. Dificuldades para uso de inovações: assistência às pessoas com feridas crônicas nas unidades de saúde de Ribeirão Preto. **Revista Estima** 5.3 (2016).

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, 20, 37-46, 1960.

CUMMING B.D. et al. A mathematical model of wound healing and subsequent scarring. **Journal of the Royal Society Interface**, v.7: 19-34, 2010.

DARBY, Ian A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 7, p. 301, 2014.

DECKER, Caitlin G. et al. Fibroblast growth factor 2 dimer with superagonist in vitro activity improves granulation tissue formation during wound healing. **Biomaterials**, v. 81, p. 157-168, 2016.

DA SILVA PINHEIRO, Luciane; LIMA BORGES, Eline; VIECCCELLI DONOSO, Miguir Terezinha. Uso de hidrocolóide e alginato de cálcio no tratamento de lesões cutâneas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 66, n. 5, 2013.

DE MASI, Elen Carolina David João et al. The influence of growth factors on skin wound healing in rats. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 82, n. 5, p. 512-521, 2016.

DELAVARY, Babak Mahdavian et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753-762, 2011.

DOS SANTOS, Renata Oliveira Maciel et al. Cuidado de Enfermagem no Tratamento de Feridas: Uma Pesquisa Bibliográfica. **Revista Estima**, v. 6, n. 4, 2016.

DUMVILLE, Jo C. et al. Hydrocolloid dressings for healing diabetic foot ulcers. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, 2012.

DUSCHER, Dominik et al. Fibroblast-specific deletion of hypoxia inducible factor-1 critically impairs murine cutaneous neovascularization and wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 136, n. 5, p. 1004-1013, 2015.

EFRON, B. E TIBSHIRANI, R. J. An Introduction to the Bootstrap. Chapman & Hall, 1993.

EMING, S.A. et al. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514-525, 2007.

EMING, Sabine A.; MARTIN, Paul; TOMIC-CANIC, Marjana. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science translational medicine**, v. 6, n. 265, p. 265sr6-265sr6, 2014.

ENG J. Sample size estimation: how many individuals should be studied? **Radiology**, 227(2), 309–13, 2003.

ESKANDANI, M. et al. Cell physiology regulation by hypoxia inducible factor-1: targeting oxygen-related nanomachineries of hypoxic cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, 99, 2017. 46-62.

FOLKMAN J., D'AMORE P.A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell**. 1996;87:1153-5.

GALIANO RD, MICHAELS V, DOBRYANSKY M et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair Regen** 2004; 12:485–492.

GARRET I.R. et al. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. **J Clin Invest** 1990; 85(3): 632-639.

GERIS L. et al. In silico design of treatment strategies in wound healing and bone fracture healing. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.368: 2683-2706, 2010.

GILLITZER R., GOEBELER M. Chemokines in cutaneous wound healing, **J. Leukoc. Biol.** 69, 513-521, 2001.

GOLEBIEWSKA, Ewelina M.; POOLE, Alastair W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. **Blood reviews**, v. 29, n. 3, p. 153-162, 2015.

GURTNER G.C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature** 453(7193):314–321. 2008.

HAERTEL, Beate et al. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. **Biomolecules & therapeutics**, v. 22, n. 6, p. 477, 2014.

HELFMAN, Todd; OVINGTON, Liza; FALANGA, Vincent. Occlusive dressings and wound healing. **Clinics in dermatology**, v. 12, n. 1, p. 121-127, 1994.

HESKETH, Mark et al. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1545, 2017.

HONG, W. et al. The role of hypoxia-inducible factor in wound healing. **Advances in wound care**, 3, n. 5, 2014.

HOU, Z. et al. Deferoxamine enhances neovascularization and accelerates wound healing in diabetic rats via the accumulation of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ . **Diabetes Research and Clinical Practice**, 10, n. 1, 2013. 62-71.

HUTCHINSON, J. J.; MCGUCKIN, Maryanne. Occlusive dressings: a microbiologic and clinical review. **American journal of infection control**, v. 18, n. 4, p. 257-268, 1990.

KIMMEL, Howard M.; GRANT, Anthony; DITATA, James. The Presence of Oxygen in Wound Healing. **Wounds: a compendium of clinical research and practice**, v. 28, n. 8, p. 264-270, 2016.

KLOETERS, O. et al. The use of a semioclusive dressing reduces epidermal inflammatory cytokine expression and mitigates dermal proliferation and inflammation in a rat incision model. **Wound Repair and Regeneration**, 16, Mar 2008. 568-575.

KRUSE, Carla R. et al. The external microenvironment of healing skin wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 4, p. 456-464, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; ASTER, J. C.; **Robbins Patologia Básica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: 2013.

LANDÉN, Ning Xu; LI, Dongqing; STÅHLE, Mona. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 3861-3885, 2016.

LANDIS, J.R., e G.G. KOCH. "The measurement of observer agreement for categorical data." **Biometrics** , 159–174. 1977.

LOPES-JÚNIOR, LUÍS. (2015). EDITORIAL. Translational research and nursing: the lab bench to bedside. **Journal of Nursing UFPE On Line**. 9. 1.

MAEDA, Hiroki et al. Effects of a polysaccharide nanogel-crosslinked membrane on wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 3, p. 544-550, 2017.

MAEDA, S., Fujimoto, M., Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Takehara, K., & Hasegawa, M. (2011). Inducible costimulator (ICOS) and ICOS ligand signaling has pivotal roles in skin wound healing via cytokine production. **Am J Pathol**, 179(5), 2360-2369. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.048.

MARQUES, S.M. et al. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. **Microvasc Res.**, v. 82, n. 3, p. 246-252, nov. 2011.

MARTIN, Paul; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 370-378, 2015.

MARTINO, Mikaël M. et al. Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. **Science**, v. 343, n. 6173, p. 885-888, 2014.

MEDEIROS, Aldo Cunha; DANTAS-FILHO, Antônio Medeiros. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of surgical and clinical research**, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Anexo 2. Protocolo para Prevenção de Úlcera por Pressão. Brasília, 2013.

MOREIRA, Camila Francisco et al. Skin wound healing model-excisional wounding and assessment of lesion area. 2015.

NAYAK, B.S. et al. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morindacetrifolia* L. Leaf. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v.6, n.3, p.351-356, 2009.

OLIVEIRA, Denize Cristina de et al. Construção de um paradigma de cuidado de enfermagem pautado nas necessidades humanas e de saúde. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 15, n. 4, p. 838-844, 2011.

OLIVEIRA, Rosângela A. et al. Análise das intervenções de enfermagem adotadas para alívio e controle da dor em pacientes com feridas crônicas: estudo preliminar. **Revista Estima**, v. 3, n. 2, 2016.

O'SHAUGHNESSY, K. et al. Homeostasis of the epidermal barrier layer: a theory of how occlusion reduces hypertrophic scarring. **Wound Repair and Regeneration**, 17, Jul 2009. 700-708.

PADILHA, Maria Itayra. Pesquisa translacional: qual a importância para a prática da enfermagem?. **Texto contexto - enferm.**, Florianópolis, v. 20, n. 3, p. 419-424, Sept. 2011. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-07072011000300001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-07072011000300001&lng=en&nrm=iso)>. access on 26 Jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-07072011000300001>.

PINHEIRO, Luciane da Silva; BORGES, Eline Lima; DONOSO, Miguir Terezinha Vieccelli. Use of hydrocolloid and calcium alginate in the treatment of skin lesions. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 66, n. 5, p. 760-770, 2013.

PORTOU, M. J. et al. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. **Vascular pharmacology**, v. 71, p. 31-36, 2015.

RIDIANDRIES, Anisyah; BURSILL, Christina; TAN, Joanne. Broad-Spectrum Inhibition of the CC-Chemokine Class Improves Wound Healing and Wound Angiogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 155, 2017.

RUH, Anelice C. et al. Inflammation: between regeneration and healing. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde.**, Ponta Grossa, v.19, n.1, p. 11-19, jan./jun. 2013. Disponível em: <http://www.revistas2.uepg.br/index.php/biologica>. Acesso em: 21 Jan. 2018

SANO, H.; ICHIOKA, S.; SEKIA, N. Influence of oxygen on wound healing dynamics: assessment in a novel wound mouse model under a variable oxygen environment. **PLOSone**, 17, Nov 2012. e50212.

SANTOS, Érick Igor et al. Representações sociais de autonomia profissional do enfermeiro na prevenção e tratamento de feridas. **Revista Cubana de Enfermería**, v. 33, n. 2, 2017.

SANTOS, Iraci dos et al. Fundamentos filosóficos e teóricos para novas concepções do cuidar em enfermagem: contribuição da sociopoética. **Rev Bras Enferm**, p. 644-651, 2010.

SEMENZA, Gregg L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. **Biochemical pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 47-53, 2000.

SEMENZA, Gregg. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. p. 721-732, 2003.

SCHULTZ G.S. et al. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair Regen** 19(2):134–148. 2011.

SCHUNCK, Michael; NEUMANN, Claudia; PROKSCH, Ehrhardt. Artificial barrier repair in wounds by semi-occlusive foils reduced wound contraction and enhanced cell migration and reepithelization in mouse skin. **Journal of investigative dermatology**, v. 125, n. 5, p. 1063-1071, 2005.

SHEIKH A.Y. et al. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. **Arch. Surg.** 2000; 135: 1293-1297.

SIBBALD, R. Gary et al. Wound bed preparation 2014 update: management of critical colonization with a gentian violet and methylene blue absorbent antibacterial dressing and elevated levels of matrix metalloproteases with an ovine collagen extracellular matrix dressing. **Advances in skin & wound care**, v. 27, n. 3, SUPPL. 1, p. 1-6, 2014.

SINGH, Aparajita et al. Meta-analysis of randomized controlled trials on hydrocolloid occlusive dressing versus conventional gauze dressing in the healing of chronic wounds. **Asian journal of surgery**, v. 27, n. 4, p. 326-332, 2004.

SINGLA, R. et al. In vivo diabetic wound healing potential of nanobiocomposites containing bamboo cellulose nanocrystals impregnated with silver nanoparticles. **Biological macromolecules**, 2017.



SKÓRKOWSKA-TElichowska, Katarzyna et al. The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 4, p. e117-e126, 2013.

SOARES, Rodrigo Zon et al. Evaluation of the role of the cannabidiol system in an animal model of ischemia/reperfusion kidney injury. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 27, n. 4, p. 383-389, 2015.

SOUZA, D. G., Soares, A. C., Pinho, V., Torloni, H., Reis, L. F., Teixeira, M. M., & Dias, A. A. (2002). Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor- stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am J Pathol**, 160(5), 1755-1765.

STUCHI, Lídia A. Rossi et al. Cuidados locais com as feridas das queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 2, p. 54-59, 2010.

SZWED, Dayane Nayara; SANTOS, Vera Lucia Pereira dos. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, 2017.

TAVARES, Ana Paula Cardoso et al. Qualidade de vida de idosos com úlceras de perna. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 21, n. 4, p. 1-9, 2017.

THOMAS, S. Hydrocolloids *Journal of Wound Care* 1992:1;2, 27-30

TOPF M. Three estimates of interrater reliability for nominal data. *Nurs Res* 1986; 35(4):253-245.

TREUTING, Piper M. et al. (Ed.). **Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas (expert consult)**. Academic Press, 2011.

TRUJILLO, Valentin et al. Calcitriol promotes proangiogenic molecules in keratinocytes in a diabetic foot ulcer model. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 174, p. 303-311, 2017.

VARGHESE, Mathew C. et al. Local environment of chronic wounds under synthetic dressings. **Archives of dermatology**, v. 122, n. 1, p. 52-57, 1986.

WANG, Ningning et al. E2F1 hinders skin wound healing by repressing vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, neovascularization, and macrophage recruitment. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0160411, 2016.

WIETECHKA, Mateusz S.; CERNY, Wendy L.; DIPIETRO, Luisa A. Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. In: **New Perspectives in Regeneration**. Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 3-32.

WIGGER-ALBERTI, W. et al. Efficacy of a polyurethane dressing versus a soft silicone sheet on hypertrophic scars. **Journal of wound care**, v. 18, n. 5, 2009.

WILLENBORG, Sebastian; EMING, Sabine A. Macrophages – sensors and effectors coordinating skin damage and repair. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 12, n. 3, p. 214-21, 2014.

WU L., MUSTOE T.A. Effect of ischemia on growth factor enhancement of incisional wound healing. *Surgery* 1995; 117: 570.

WYND CA, Schaefer MA. The Osteoporosis Risk Assessment Tool: establishing content validity through a panel of experts. *Appl Nurs Res* 2002; 16(2):184-188

XIAO, Weirong et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Bioscience reports**, v. 37, n. 6, p. BSR20170658, 2017.

ZHAI, Hongbo; MAIBACH, Howard I. Effect of Occlusion and Semi-occlusion on Experimental Skin Wound Healing: A Reevaluation. **Wounds: a compendium of clinical research and practice**, v. 19, n. 10, p. 270-276, 2007.

ZHAO L.L.et al. Effect of hyperbaric oxygen and growth factors on rabbit ear ischemic ulcers. **Arch. Surg.** 1994;129:1043–9.

## ANEXO

**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Eline Lima Borges,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto EFEITO DA OCLUSÃO SOBRE A ANGIOGÊNESE E CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EXCISIONAIS EM CAMUNDONGOS, submetido a esta comissão pelo protocolo 117 / 2015, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 26/10/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 27/10/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)